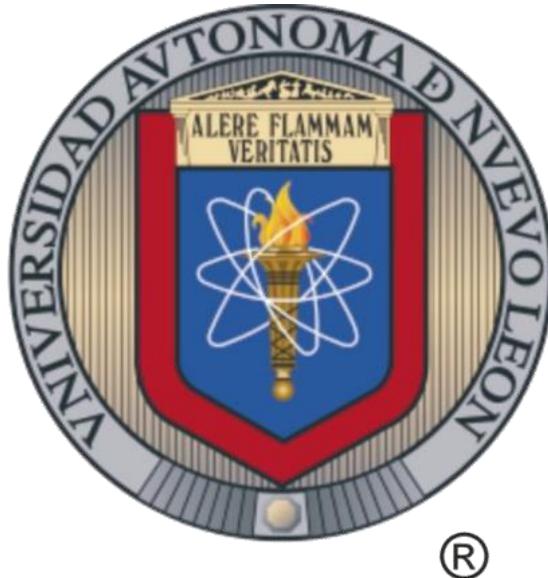


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE TNF- α E IL-4 MEDIANTE IHC EN
GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE
CON *Encephalitozoon cuniculi***

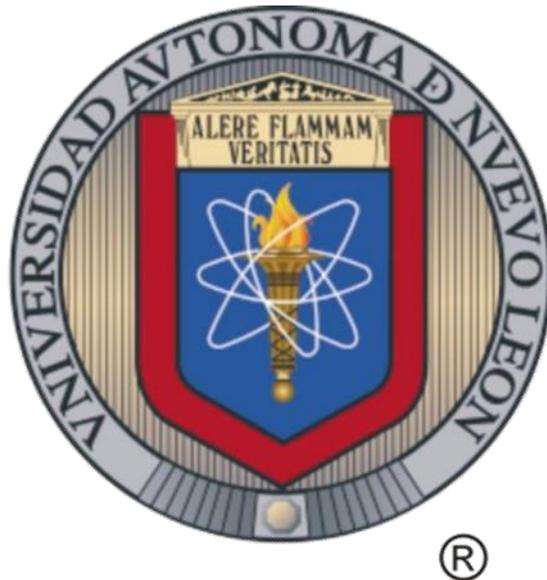
PRESENTA

IVONE SALINAS NAVARRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestría EN CIENCIA ANIMAL**

ABRIL 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE TNF- α E IL-4 MEDIANTE IHC EN
GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE
CON *Encephalitozoon cuniculi***

PRESENTA

MZV. IVONE SALINAS NAVARRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN,

ABRIL 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
POSGRADO CONJUNTO



TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE TNF- α E IL-4 MEDIANTE IHC EN
GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE
CON *Encephalitozoon cuniculi***

PRESENTA

MZV. IVONE SALINAS NAVARRO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

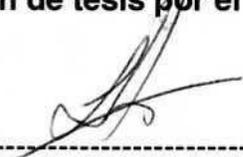
ESCOBEDO, NUEVO LEÓN,

ABRIL 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMIA

IDENTIFICACIÓN DE TNF- α E IL-4 MEDIANTE IHC EN GRANULOMAS DE
CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE CON *Encephalitozoon cuniculi*

Aprobación de tesis por el comité:



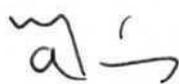
PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director



MSc. Alicia Magdalena Nevárez Garza
Co-Director



MC. Armando Trejo Chávez
Co-Director



Dr. Juan José Zarate Ramos
Co-Director

Agradecimientos

A todos mis asesores por su guía y apoyo durante la realización de esta tesis.

A al Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar por darme la oportunidad de trabajar con su equipo de investigación y en esta línea en particular. Ya nunca volveré a ver a los conejos de la misma manera.

Al Dr. Uziel Castillo Velázquez por sus consejos y experiencia. Por saber cuándo necesitaba calmar la marcha o acelerar el paso.

A la MSc. Alicia M. Nevárez Garza quien trabajó junto conmigo en toda esta investigación, siempre se aseguró el buen cuidado de nuestros conejos y no permitió que nada nos detuviera. Gracias.

Al Dr. Adolfo Soto Domínguez por su tiempo, el permitirme trabajar en el Laboratorio de Técnicas Histológicas, Depto. de Histología de la Facultad de Medicina, UANL y compartir sus conocimientos. No olvido el Frözt que quedó pendiente.

Al MC. Armando Trejo Chávez, la MC. Magda Celina Navarro Soto y a la Dra. Heidi Gisell Rodríguez Ramírez por su apoyo y el tiempo que dedicaron a este trabajo.

A todas las instituciones que participaron y permitieron que esta investigación fuera posible.

A la TSU. Elda Paola Garza Alemán por su soporte técnico en el laboratorio de Patología y por siempre darme galletas.

A mis compañeros de generación César Dávila, Adriana G. Espinosa, Stephany Castillo, que siempre encontraron la manera de ayudar y con quienes compartí muchas tazas de café.

A mi familia por su completo apoyo. A Ana Leticia Moreno Tamez por su amistad incondicional y a José Alberto Escamilla Aragus por siempre estar orgulloso de mí.

Y un agradecimiento especial a Alejandra Marroquín quien inicia su vida como profesionista y a Jesús Rubín González Machorro quien pronto obtendrá también su grado de maestría.

Un abrazo a todos.

Dedicatoria



Este trabajo está dedicado a todas las personas que han leído, leen o leerán toda la literatura que he escrito en mi vida, irónicamente muchos más individuos que aquellos que necesitarán, algún día, leer esta investigación del mundo real.

Abreviaturas

Ac	Anticuerpo
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Célula presentadora de antígenos
CIA	Prueba de inmunoensayo carbón
DAB	Sustrato-cromógeno Diaminobencidina
DC	Célula dendrítica
Ec	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
ELISA	Técnica de inmunoensayo ligado a enzima
FITC	Anticuerpo etiquetado con fluoresceína
G	Gramos
GAGs	Glicosaminoglicanos
GRANS	Granulocitos
h	Horas
HE	Hematoxilina y Eosina
HCT	Hematocrito
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
IFA	Inmunofluorescencia
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IM	Intramuscular
IHC	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
L/M	Linfocitos/Monocitos
M1	Macrófagos activados
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión
mg	Miligramos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NK	Asesinas Naturales
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PDFG	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNC	Sistema Nervioso Central
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TBST	Solución Tri-buffer salino con Tween 20
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRS	Solución recuperadora de antígenos
VCAM	Molécula vascular de adhesión celular
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE CONTENIDO



	Pagina
RESUMEN.....	13
1. Introducción.....	14
1.1. Justificación.....	17
1.2. Hipótesis.....	17
1.3. Objetivo General.....	17
1.4. Objetivos Específicos.....	17
2. Literatura Revisada.....	19
2.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	19
2.2. Estructura de la espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	21
2.3. Desarrollo y ciclo de vida de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en el conejo.....	24
2.4. Signos clínicos y lesiones asociadas a <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en el conejo.....	28
2.5. Diagnóstico de laboratorio de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	31
2.6. Respuesta inmune.....	35
3. Materiales y Métodos.....	47
3.1. Animales para el estudio.....	47
3.2. Diseño del experimento.....	47
3.3. Colección, preservación y procesamiento de las muestras.....	51
3.4. Detección de esporas en muestras.....	53

3.5. Detección de TNF- α e IL-4 mediante inmunohistoquímica.....	56
3.6. Análisis sanguíneo.....	59
3.7. Análisis Estadístico y Morfología.....	59
4. Resultados.....	60
4.1. Detección de espora.....	60
4.2. Detección de granulomas por histopatología con Hematoxilina y Eosina.....	71
4.3. Detección de TNF- α por inmunohistoquímica.....	75
4.4. Detección de IL-4 por inmunohistoquímica.....	82
4.5. Biometría Hemática.....	89
5. Discusión.....	93
6. Conclusión.....	104
7. Referencias.....	106
Apéndice A.....	116
Apéndice B.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS



	Pagina
Figuras	
Figura 1. Estructuras principales de la espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	23
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	26
Figura 3. Cascada de la respuesta inmune pro-inflamatoria y antiinflamatoria mediante citocinas.....	42
Figura 4. Línea de tiempo del tratamiento con Dexametasona.....	50
Figura 5. Resultado positivo a la presencia de IgG contra Ec mediante CIA en suero de conejo infectado.....	62
Figura 6. Resultado negativo a la presencia de IgG contra Ec mediante CIA en suero de conejo clínicamente sano.....	63
Figura 7. Tinción con Azul de Tricrómo de las heces de conejo perteneciente a un conejo infectado.....	64
Figura 8. Tinción con Calcofluor White en heces de conejo infectado.....	67
Figura 9. Inmunofluorescencia de riñón de un conejo perteneciente a un conejo infectado.....	68
Figura 10. Inmunohistoquímica de encéfalo perteneciente a un conejo infectado con Ec.....	70
Figura 11. Tinción con Hematoxilina y Eosina de encéfalo de un conejo infectado.....	73

Figura 12. Tinción con Hematoxilina y Eosina de riñón de un conejo infectado.....	74
Figura 13. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en riñón de un conejo perteneciente al grupo A.....	77
Figura 14. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo A.....	78
Figura 15. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en riñón de un conejo perteneciente al grupo B.....	79
Figura 16. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo B.....	80
Figura 17. Conteo celular de la marca positiva a la expresión de presencia de TNF- α en encéfalo y riñón de animales infectados con (grupo A) y sin Dexametasona (grupo B).....	81
Figura 18. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en riñón de un conejo perteneciente al grupo A.....	84
Figura 19. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo A.....	85
Figura 20. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en riñón de un conejo perteneciente al grupo B.....	86
Figura 21. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo B.....	87
Figura 22. Conteo celular de la marca positiva a la expresión de presencia de IL-4 en encéfalo y riñón de animales infectados con (grupo B) y sin Dexametasona (grupo A).....	88

ÍNDICE DE CUADROS



Página

Cuadros

Cuadro 1. Distribución de los grupos de animales de acuerdo al tratamiento y a la infección.....	49
Cuadro 2. Anticuerpos TNF-a e IL-4 para determinar su presencia en el granuloma microsporidiano.....	58

ÍNDICE DE TABLAS



Página

Tablas

Tabla 1. Comparaciones de medias de A dentro de B para el conteo de L/M.....	90
Tabla 2. Comparaciones de medias de B dentro de A para el conteo de L/M.....	90
Tabla 3. Comparaciones de medias de A dentro de B para el conteo de granulocitos.....	91
Tabla 4. Comparaciones de medias de B dentro de A para el conteo de granulocitos.....	91
Tabla 5. Comparaciones de medias de A dentro de B para el conteo de hematocrito.....	92
Tabla 6. Comparaciones de medias de B dentro de A para el conteo de hematocrito.....	92

RESUMEN

El *Encephalitozoon cuniculi* es un parásito intracelular formador de esporas que depende de la energía de la célula huésped que infecta. Las citocinas juegan un papel importante en la producción de señales para la iniciación y la orientación de la reacción inflamatoria y la formación de los granulomas. Este trabajo se enfocó en la detección de la presencia de las citocinas, TNF- α e IL-4, en los granulomas presentes en cerebro y riñón de conejos positivos, por medio de la técnica inmunohistoquímica y su comparación en animales inmunosuprimidos mediante Dexametasona. La presencia de estas citocinas se observaron en todos los cortes histológicos de los granulomas de los conejos positivos a esta infección. Los resultados obtenidos permitieron conocer las características pro-inflamatoria de los granulomas en el encéfalo y antiinflamatoria en los riñones de estos animales, así como los efectos inmunomoduladores de la espora y la reacción del organismo ante inmunosupresores como la Dexametasona. La información obtenida es clave para el desarrollo de futuras estrategias de control y prevención contra este microsporidio.

1. Introducción

Encephalitozoon cuniculi (Ec), es un microorganismo perteneciente al phylum Microsporidia, subphylum Sporozoa, y ha sido reconocido como un agente patógeno en conejos desde 1920. Los microsporidios son organismos intracelulares formadores de esporas, los cuales dependen del metabolismo energético de la célula huésped, ya que carecen de mitocondria.¹ En la última década, los microsporidios han recibido un creciente interés, ya que infectan a una amplia gama de mamíferos, desde conejos, roedores, caballos, carnívoros, hasta los seres humanos.² En estos últimos se les ha relacionado como una de las causas de diarrea crónica en pacientes infectados con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).³ Es por ello que las infecciones por Ec se consideran de alto riesgo para los individuos inmunosuprimidos.⁴ La encefalitozoonosis es muy frecuente en los conejos, siendo un problema serio y común en las tiendas de mascotas y en bioterios de investigación.⁵ La infección en conejos puede pasar desapercibida por la ausencia de signología clínica.⁶ Las pruebas serológicas disponibles en la actualidad son difíciles de interpretar debido a que el diagnóstico definitivo depende de la fase en que se encuentre la infección.⁵

La forma de transmisión de Ec en los conejos puede ser a través de la vía digestiva, la inhalación de las esporas o por la transmisión intrauterina. Inicialmente, la infección es inaparente y se encuentra localizada al nivel del

epitelio intestinal; aunque también puede infectar a las células inflamatorias residentes del tracto digestivo, como macrófagos y linfocitos inter e intraepiteliales. Posteriormente las esporas llegan por vía sanguínea o linfática a los ojos, los riñones, el encéfalo, el hígado y el pulmón. En el encéfalo ocasiona una severa meningoencefalitis granulomatosa, mientras que en riñón causa una nefritis intersticial y granulomatosa, y a nivel ocular puede causar cataratas e hipopión, las lesiones pueden presentarse individualmente o en combinación. Las lesiones a nivel sistémico, es decir de manera multiorgánica, pueden causar muerte por convulsiones o infarto.⁶⁻⁸

El papel de la inmunidad tanto humoral como celular en una infección con Ec ha sido reportada⁹, pero poco se sabe sobre el papel que las citocinas desempeñan en la respuesta inmune durante la formación del granuloma en una infección microsporidiana.¹⁰⁻¹¹ Se ha reportado que las citocinas proinflamatorias producidas por las células Th1, IFN- γ e IL-12, son importantes para promover una inmunidad protectora contra numerosas infecciones intracelulares. Las citocinas antiinflamatorias, como la IL-4 e IL-10, producidas por las células de tipo Th2, participan en la regulación de respuesta Th1 del sistema inmune, y es posible que desempeñen un papel similar en la infección por Ec.¹²

La detección de estas citocinas es primordial para entender su función durante la formación del granuloma microsporidiano. La evaluación de la concentración de citocinas en una infección por Ec suele hacerse generalmente mediante técnicas de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)¹³, pero este tipo de técnica detecta solamente la concentración de estas citocinas en fluidos sanguíneos o

sobrenadantes de cultivos celulares, por lo que se requiere de técnicas más sensibles que las detecten a nivel tisular, como la inmunohistoquímica (IHC). Las técnicas de IHC han sido utilizadas para detectar a las esporas de *Ec* dentro de las células infectadas, pero a la fecha no se han llevado a cabo estudios sobre la producción de citocinas durante la formación de los granulomas en infecciones por microsporidios. Por lo tanto, se necesita una investigación más extensiva para lograr comprender no solamente la formación y crecimiento del granuloma, sino también los mecanismos de interacción entre las esporas de *Ec* y las células inflamatorias del huésped durante la latencia del xenoma (la proliferación de parásitos microsporidios dentro de la célula huésped) o del granuloma y su posterior reactivación.

En este trabajo, se estudiaron las citocinas TNF- α e IL-4 en la dinámica de la formación del granuloma microsporidiano en individuos inmunocompetentes e inmunosuprimidos y se establecieron las diferencias clínicas y patológicas en ambos grupos utilizando al conejo como modelo natural. Así como también la determinación y análisis de las citocinas en los diferentes grupos de animales. La información obtenida en este trabajo es de relevancia científica en el área básica de la investigación ya que se pudo determinar la dinámica de la inmunomodulación en cuanto a producción de citocinas durante una infección por *Ec* en un modelo de infección natural en el conejo.

1.1. Justificación

El estudio de las citocinas pro y antiinflamatorias permitirá comprender el papel que la respuesta inmune juega durante el desarrollo del microambiente del granuloma microsporidiano, así como la interacción entre huésped y el agente infeccioso en conejos infectados de manera natural, ya que estos animales son considerados como el huésped definitivo de la encefalitozoonosis.

1.2. Hipótesis

Encephalitozoon cuniculi promueve la expresión de citocinas pro y antiinflamatorias dentro del granuloma microsporidiano.

1.3. Objetivo General

Demostrar mediante el uso de anticuerpos conjugados con avidina-biotina, la expresión TNF- α e IL-4 asociadas al granuloma microsporidiano.

1.4. Objetivos Específicos

1. Detectar conejos infectados con Ec mediante serología y examen coproparasitológico.
2. Identificar las esporas de Ec mediante histopatología y tinción con fluorescencia en granulomas de animales infectados naturalmente.

3. Identificar la expresión de TNF- α e IL-4 asociadas al granuloma microsporidiano.

2. Literatura Revisada

2.1. *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi (Ec) fue el primer microsporidio en ser reconocido como un parásito de mamíferos. Reportes desde el año 1920 describieron un síndrome de encefalitis que ocurría en el conejo doméstico y que estaba relacionado con la presencia de microsporidios en las lesiones histológicas. El organismo asociado a esta enfermedad neurológica fue nombrado *Encephalitozoon cuniculi* por Levaditi *et al.* (1923). Este nombre científico fue cambiado en el año 1964, a *Nosema* debido a las similitudes que presentaba con ciertos microorganismos patógenos identificados en los artrópodos, y por un período de tiempo, el nombre científico *Nosema cuniculi* fue ampliamente utilizado.¹⁴ En 1971, Shadduck y Pakes propusieron un retorno a la nomenclatura original, y desde entonces Ec ha sido el nombre usado para las especies de parásitos de conejos y roedores. La *Encefalitozoonosis* es ahora ampliamente reconocida como una enfermedad ocasionada por un microsporidio que afecta al conejo doméstico.¹⁵⁻¹⁶

La posibilidad de transmisión zoonótica de Ec de conejos a los seres humanos es sumamente alta. El primer caso reportado de infección por microsporidia en el ser humano fue en 1959 en un niño asiático de 9 años de edad, que padecía de convulsiones, espasmos, cefalea y náusea. Pruebas posteriores realizadas en este paciente confirmaron el diagnóstico positivo por infección con Ec. El siguiente caso reportado fue hasta un cuarto de siglo después, en un niño de 2 años de

edad en Suecia, donde se determinó también la presencia de microsporidios.¹⁷ En 1973 se documentaron dos casos de microsporidiosis corneal en pacientes que recibieron trasplantes infectados por la espora.¹⁸ Desde entonces, cientos de casos diagnosticados de microsporidiosis por *Ec* han sido mundialmente documentados sobre todo en animales y personas inmunosuprimidas, en pacientes con cáncer o con trasplante de órganos y en individuos que recibieron tratamiento anticancerígeno inmunosupresor.¹⁹ A partir de entonces, la encephalitozoonosis ha despertado un verdadero interés en la patología humana y veterinaria, principalmente sobre el papel que los animales tienen en la transmisión de este padecimiento.

Hasta el momento, tres genotipos de *Ec* han sido documentadas mediante biología molecular: el Tipo I presente en perros, el Tipo II en roedores y el tipo III en conejos²⁰. En áreas donde la cohabitación con perros es común, los dueños son más susceptibles a ser infectados con el Tipo I, y lo mismo ocurre con los dueños y productores de conejos, con el Tipo III.²¹

2.2. Estructura de la espora de *Encephalitozoon cuniculi*

Los microsporidios han desarrollado un mecanismo de infección único que se caracteriza no sólo por una gran reducción en sus niveles morfológicos y ultraestructurales (Figura 1), sino también en su genética. Esto se debe a que no pueden crecer, ni dividirse, fuera de una célula huésped y además, requieren de los recursos energéticos que obtienen a partir de éstas.²²

Las esporas Ec están rodeadas por una capa exterior que se divide en dos partes: la exoespora, la cual está compuesta de glicoproteína, y la endoespora, la cual es una capa interior constituida de quitina, las cuales le proporcionan protección contra el medio exterior. Estas capas difieren de la membrana plasmática en que contiene al citoplasma y el resto de los orgánulos de la espora. El Ec consta de un núcleo diplocarion, los cuales son estructuralmente idénticos y se dividen de forma sincrónica; un polaroplasto laminar membranoso que ocupa la tercera parte apical de la espora y puede incluir un aparato de Golgi atípico. También cuenta con vesículas polares, las cuales se han hipotetizado que son vestigios de mitocondrias o mitosomas, los cuales se encuentran muy reducidos y dispersos por el citoplasma. Algunos elementos membranosos pertenecen al retículo endoplásmico rugoso, en una disposición como cisternas paralelas cubiertos por los ribosomas, los cuales son un componente predominante del citoplasma microsporidiano y una vacuola posterior que se aprecia como un espacio vacío al observarlo en microscopía de luz.²³

La espora contiene un aparato de infección sofisticado, compuesto de tres partes: 1) un largo filamento polar filiforme (también conocido como "tubo polar", "tubo de invasión" o "tubo de inyección"), del cual emana desde el disco de anclaje en la parte anterior y la porción más delgada de la espora, 2) el polaroplasto, el cual es un sistema de compartimentos membranosos, que se puede observar como una serie de laminillas, sacos o túbulos en la mitad anterior de la espora, y 3) la vacuola posterior, que se localiza cerca del polo posterior de la espora, y está compuesta de un contenido esponjoso o acuoso.²² Bajo condiciones apropiadas dentro del microambiente del huésped, el tubo polar se descarga a través del extremo delgado anterior de la espora como resultado de un cambio en la presión osmótica, lo que provoca la entrada súbita de agua e hinchazón de la vacuola posterior, con el arreglo subsecuente de las láminas del polaroplasto y finalmente la eyección del tubo polar.²³ Por este medio el esporoplasma se inyecta desde la espora de una célula huésped iniciando la transmisión de la infección.¹

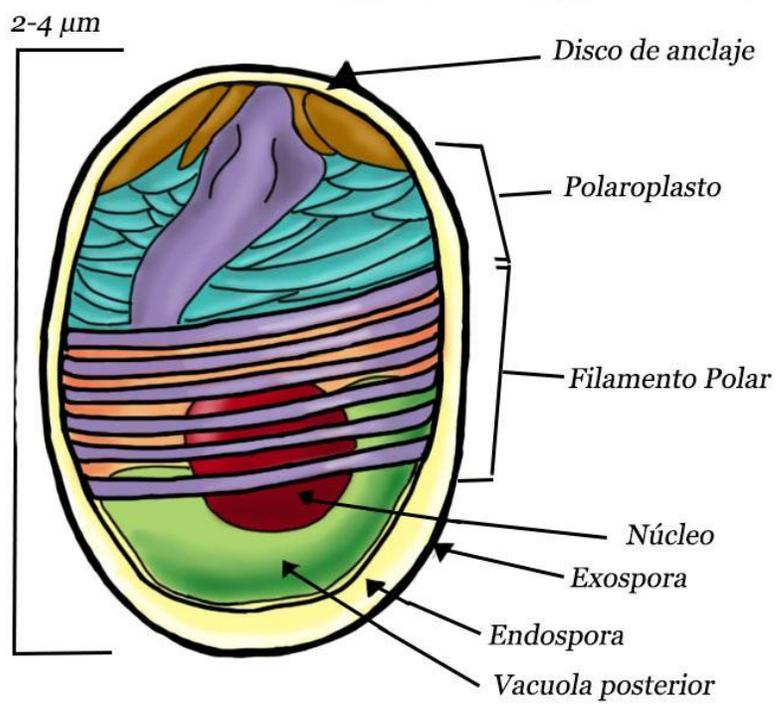


Figura 1. Estructuras principales de la espora de *Encephalitozoon cuniculi*.

2.3. Desarrollo y ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi* en el conejo

El ciclo de vida general para los microsporidios se puede dividir en tres fases: 1) la fase infecciosa o ambiental; 2) la fase proliferativa, identificado por algunos autores como merogonia; y 3) la fase de esporogonia o formadora de esporas.

Es la fase infecciosa es la única etapa del ciclo de vida en donde la espora es capaz de sobrevivir fuera de la célula huésped (Figura 2). Durante la germinación de la espora, el esporoplasma se inyecta en una célula huésped a través del tubo polar, iniciando de esta manera un ciclo de reproducción que termina con la producción de las esporas.²⁴ La experimentación con varios factores físicos y químicos del entorno de las esporas en el epitelio digestivo ha llevado a algunas hipótesis para explicar los mecanismos implicados en la extrusión de filamentos polares. En estos estudios, las esporas respondieron a uno o más estímulos tales como pH, concentración de iones, osmolaridad, enzimas digestivas, potencial redox y productos digestivos llegándose a la conclusión de que los iones de sodio y potasio (dentro de un rango de pH limitado) actuaron como factor de germinación primaria.²⁴ Otros informes sugieren que el proceso de invasión de Ec también puede implicar una estrecha asociación entre los glicosaminoglicanos (GAGs) tanto de las esporas y los de la superficie de la célula huésped, que pudiera ser un mecanismo que ayude a la estabilidad de la espora en las proximidades de la membrana celular.²⁶

Dentro de la célula huésped, el esporoplasma del *Ec* crece en una vacuola parasitófora en el citoplasma de esta, una vez que éste fue inyectado por el filamento polar (Figura 2) conforme la vacuola crece, la célula infectada pierde progresivamente masa citoplasmática.¹ En el citoplasma del huésped, el esporoplasma madura en meronte, estructura que contiene esporas inmaduras, el cual se multiplica por división binaria y crea una infección primaria en el tejido o puede ser transportado a otros sitios para su desarrollo. No obstante, aún no se conocen bien estos mecanismos de transporte durante las etapas tempranas de desarrollo parasitario, aunque se ha sugerido que la linfa, sangre o leucocitos pudieran intervenir en su desarrollo.²⁷ La esporogonia es la culminación del desarrollo del parásito e involucra el desarrollo transicional de esporontes a esporoblastos y finalmente en esporas. Una espora se considera madura una vez que todas sus estructuras internas, incluyendo el aparato de extrusión, están completas.¹

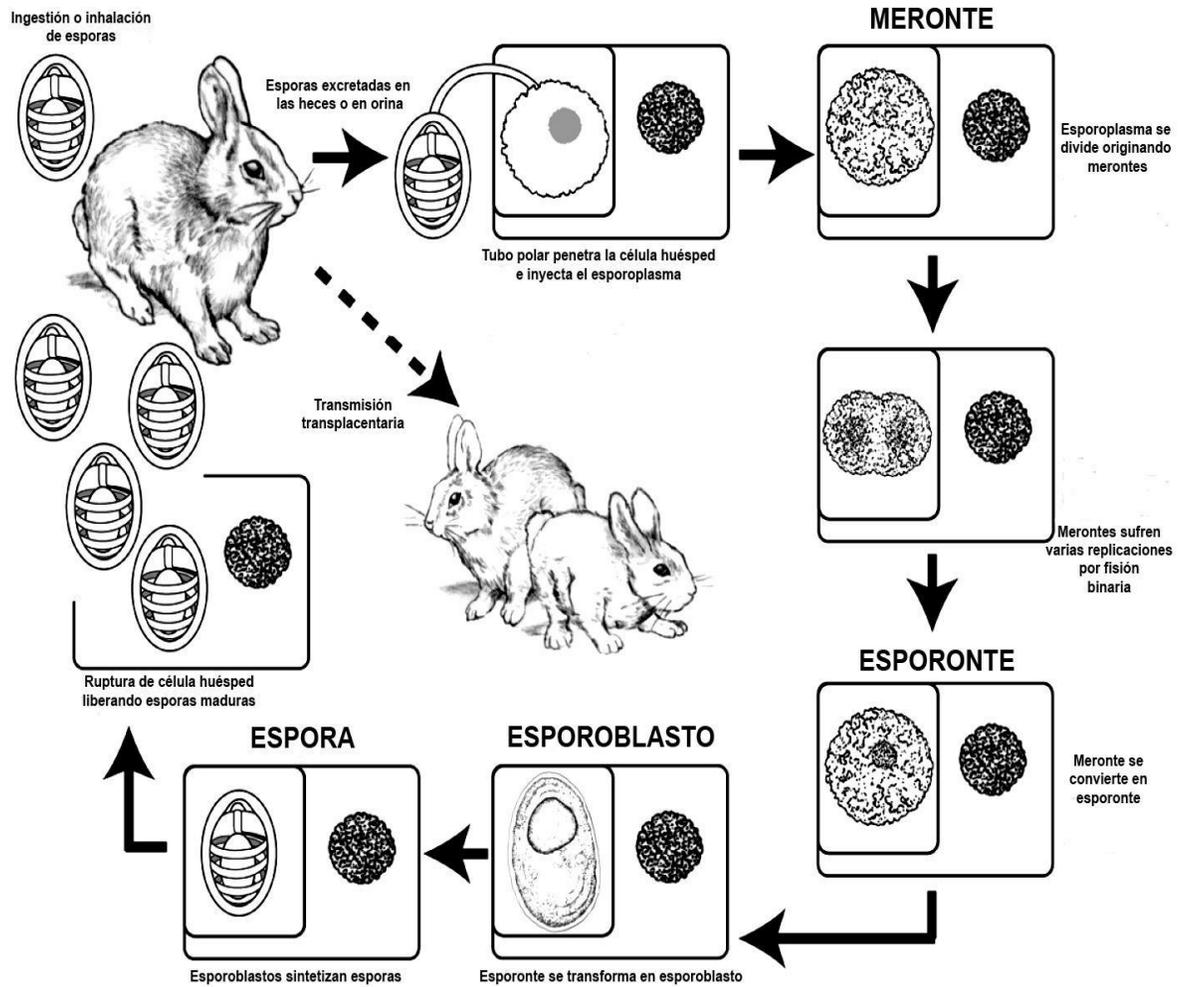


Figura 2. Ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi*. (Modificado de: Franzen, C. How do microsporia invade cells? Folia Parasicológica; 2005. 52: p. 36-40).

La infección por microsporidia en la célula huésped culmina con la degeneración de la misma, así como necrosis del tejido infectado debido a una severa respuesta inflamatoria, quizá provocado por la quitina de las esporas liberadas. Sin embargo, antes de que esto ocurra, es común observar en la mayoría de las microsporidiosis una hipertrofia de la célula huésped, incluyendo al núcleo de la misma.¹ La gran proliferación de las esporas reemplaza gradualmente el contenido celular, lo que resulta en la formación de un quiste o xenoma. La célula hipertrofiada eventualmente se convierte en una simple envoltura alrededor del parásito y eventualmente muere. Asimismo, también se ha reportado una reacción entre el xenoma y las células de la periferia, principalmente fibroblastos, células epiteliales e histiocitos que, en opinión de varios autores, también forman parte del complejo del xenoma.²⁸ Tanto el xenoma como el huésped se benefician mutuamente, ya que el primero ofrece un ambiente óptimo de desarrollo parasitario, mientras que el segundo lo confina evitando su propagación.²²

La principal vía de infección es aquella que inicia con la perforación de la célula huésped por el tubo polar y de la deposición de la esporoplasma dentro de ella, aunque se ha informado y demostrado la existencia de otros medios de infección.¹ El Ec puede ser fagocitado por macrófagos (en respuesta celular o provocada por la quitina del mismo microorganismo), y una vez internalizado, escapa del fagosoma, infectando así a las células que participan en la respuesta inmune e inicia su diseminación por el resto del organismo.²²

2.4. Signos clínicos y lesiones asociadas a *Encephalitozoon cuniculi* en el conejo.

2.4.1 Cuadro clínico.

La mayoría de las infecciones pueden presentarse de manera asintomática, pero las infecciones en conejos por Ec pueden ser de dos tipos: aguda y crónica; y los signos clínicos característicos son la pérdida de peso, diarrea líquida sin presencia de sangre y de moco.²⁹

En los casos agudos (≤ 3 semanas post infección), el microorganismo se replica en los pulmones y en el hígado.⁶ Conforme la proliferación del parásito progresa, la infección continúa hacia el riñón, el sistema nervioso central (SNC), el corazón y el ojo. Algunas veces puede observarse diarrea, ataxia, opistótonos, tortícolis, convulsiones, nistagmos y en los casos más severos muerte súbita.²⁹ Otros signos asociados con la lesión nerviosa la paresis posterior que puede ser uni o bilateral y el rodamiento completo del animal.⁶

En los casos crónicos (≥ 5 semanas post infección), puede llevar tanto a la presentación de la sintomatología clínica, como a su ausencia.⁶ Los conejos que sufren de falla renal crónica generalmente también presentan letargia, pérdida de peso, anorexia, poliuria, polidipsia y en algunos casos incontinencia urinaria y escaldamiento de la piel del tren posterior. En los casos de lesión ocular, que suelen ser durante la preñez de la hembra afectando al producto no nato, se pueden observar cataratas y ceguera uni o bilateral. El corazón también pudiera estar afectado, aunque en menor grado.³¹

2.4.2. Cambios patológicos

El proceso de infección por microsporidia en la célula huésped culmina con la degeneración de la misma, lo cual generalmente forma lesiones características del tejido infectado debido a una severa respuesta inflamatoria.¹ Esto se observa en los principales órganos que coloniza este patógeno, entre ellos se encuentra el pulmón, el hígado y el riñón, avanzando al SNC, el corazón y el ojo.⁶ En el caso hígado se observan lesiones hepáticas caracterizadas por una respuesta inflamatoria discreta, con una escasa infiltración linfocítica periportal o una severa respuesta inflamatoria granulomatosa focal, o multifocal con infiltración linfocítica periportal y necrosis.⁶⁶ En el pulmón se limita a una hiperplasia y daño al epitelio alveolar incluyendo una gran producción de secreción nasal y bronco alveolar donde generalmente se encuentran presente la espora; y en el ojo, los cambios patológicos pueden ser debidos a ruptura del lente ya que la cápsula anterior del lente puede romperse espontáneamente y causar un granuloma zonal en el mismo.⁶⁷ Pero los daños más importantes son los observados a nivel de tejido renal y SNC.

2.4.2.1. Sistema Nervioso Central

Los cambios a nivel de tejido nervioso generalmente ocurren alrededor de las 3 a las 4 semanas postinfección, los cuales se caracterizan por una infiltración linfocítica perivascular, la cual puede ser desde discretos cambios de carácter no supurativo hasta una severa meningoencefalitis o meningoencefalomielitis granulomatosa focal o multifocal con astrogliosis.^{30, 32} Los granulomas están conformados de un centro necrótico, rodeado de macrófagos y/o células gigantes, linfocitos, células plasmáticas y células gliales. Las áreas más afectadas son la

corteza y la médula cerebral; aunque también han sido observadas lesiones en el tallo cerebral, en el cordón espinal y en menor grado en el cerebelo. Las leptomeninges frecuentemente resultan afectadas y ocasionalmente se puede observar radiculitis espinal focal, lo cual pudiera explicar los signos neurológicos atípicos.²⁹

2.4.2.2. Riñones

Las lesiones en el tejido renal van desde una nefritis intersticial no supurativa focal, segmental o difusa hasta una severa nefritis focal o multifocal granulomatosa. Frecuentemente se han descrito varios grados de nefritis intersticial crónica con la formación de fibrosis y la presencia de granulomas multifocales.³³ En los casos agudos es posible observar esporas maduras en el epitelio de los túbulos distales, en macrófagos, en focos inflamatorios o libres en el lumen de los túbulos colectores. Las esporas toman este sitio en particular para su multiplicación y una vez que maduran, son expulsadas fuera del organismo a través de la orina. El epitelio de los túbulos renales también puede lucir descamado y con presencia de infiltración intersticial por células mononucleares. Sin embargo, las lesiones pueden estar presentes con una mínima afectación de los glomérulos.⁸ En los casos crónicos se observa regularmente fibrosis intersticial, colapso del parénquima renal e infiltración por células mononucleares.³⁴

2.5. Diagnóstico de laboratorio de *Encephalitozoon cuniculi*

2.5.1. Diagnóstico de microsporidiosis intestinal

La gran mayoría de los métodos de diagnóstico para detectar esporas de microsporidia toman como punto de partida el examen de heces fijadas con formaldehído al 10% amortiguado. La detección microscópica de las esporas requiere una adecuada iluminación y siempre usar un aumento de 100X con aceite de inmersión. Las esporas de *Encephalitozoon* spp miden aproximadamente entre 1.0 a 1.5 μm de ancho y de 2.0 a 2.3 μm de largo.³⁵

2.5.1.1. Tinción con Azul de Tricrómo (Cromotropismo, tinción con la técnica de Weber).

Esta es la tinción más empleada y recomendada para detectar esporas de microsporidia en heces frescas o fijadas en formaldehido, especialmente en laboratorios donde las técnicas más sofisticadas tales como Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), inmunofluorescencia (IFA), no están bien establecidas.³⁶ El modo de acción de la tinción radica en la afinidad del azul de Tricrómo sobre la quitina de la pared celular de la espora (endospora). La espora se tiñe intensamente de un color rojo o rosado facilitando la descripción morfológica de las mismas. Una característica distintiva de las esporas de microsporidia es que muchas muestran un cinturón de color rojo o rosado que abarca la línea ecuatorial del parásito y que es la marca distintiva del tubo polar enrollado.³⁷

2.5.1.2. Tinción de Calcofluor White MR2 (fluorocromo).

Esta tinción es la segunda mejor opción para diagnóstico de microsporidiosis intestinal. Los agentes quimiofluorescentes o abrillantadores ópticos tienen afinidad por la quitina de endospora, al igual que el Tricrómo, con la excepción de la necesidad de observarlo bajo luz UV; por lo tanto, se requiere de un microscopio de epifluorescencia para la detección de las esporas. Con la correcta longitud de onda (390-420nm), la pared celular de microsporidia se observa de un color azul intenso a un azul pálido, lo cual facilita la detección del parásito. Se requiere de experiencia para el manejo del equipo de microscopía de luz UV, así como también para distinguir las esporas de artefactos presentados en el material fecal o de elementos fecales que pudieran absorber el agente de fluorescencia.

2.5.2. Detección de esporas de Ec en tejido con anticuerpos conjugados con fluoresceína – Inmunofluorescencia (IFA).

Los anticuerpos conjugados con un marcador fluorescente son herramientas útiles que han demostrado su eficacia al reconocer antígenos específicos de especie sobre la espora misma o el tubo polar, debido al uso de anticuerpos mononucleares marcados con fluoresceína.³⁸ En el mercado existen anticuerpos monoclonales y policlonales con una baja reacción cruzada contra *E. bienersi*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* y *E. hellem*, lo cual permite a los investigadores distinguir a esas especies cuya morfología pudiera ser similar en el microscopio de luz. Como en el caso anterior se requiere experiencia para la interpretación de las esporas así como para el manejo del microscopio de fluorescencia. Este proceso tiene fundamentos similares a IHC, donde se emplea un Ac secundario marcado o

conjugado con biotina. Su ventaja sobre la IFA se debe a que no requiere de un microscopio especial para llevar a cabo el diagnóstico, pero es una técnica que requiere un mayor entrenamiento del personal técnico.⁶⁸

2.5.3. Diagnóstico mediante pruebas de inmunoensayo

2.5.3.1. Pruebas de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Esta técnica ha sido establecida únicamente como propósito de investigación. La prueba de ELISA detecta anticuerpos de la clase IgG e IgM hacia microsporidia, especialmente contra Ec y otros miembros de la familia de los microsporidios.³⁹ Esta prueba es adecuada para estudios epidemiológicos; sin embargo, la presencia de anticuerpos no refleja el estatus de una posible infección y resulta imposible distinguir entre una infección latente y una infección inicial tras la exposición con antígenos de microsporidia.⁴⁰

2.5.3.2. Prueba de carbón inmunoensayo (CIA)

Esta prueba consiste en un ensayo serológico de aglutinación cuya función es detectar Ac contra Ec (en una combinación de agente inactivados y carbón) en muestras de suero de diferentes especies animales. Este tipo de diagnóstico es muy útil cuando se requiere detectar infecciones subclínicas en donadores de trasplante prospectivos o en individuos que pueden estar en riesgo de una reactivación de la infección debido a un problema en la respuesta inmune.⁶⁹ Pero su defecto radica en que solo demuestra que el individuo estuvo en contacto con el agente infeccioso en el pasado, no que presente la enfermedad.

2.5.4. Otras pruebas diagnosticas

En la actualidad, los estudios moleculares han logrado establecer mediante secuenciación de DNA el código genético en unos cuantos microsporidios, incluyendo *Ec*.⁷⁰ Existen reportes de detección de *Ec* mediante técnicas de PCR en biopsias intestinales o de muestras frescas tomadas inmediatamente después de la necropsia,^{30, 72} sin embargo, aún no se disponen de productos comerciales para ser una técnica practica para el diagnóstico.

La identificación de *Ec* en tejidos mediante MET es hasta la fecha la mejor técnica para identificar las esporas de *Ec*; sin embargo, esta técnica no está disponible en todos los laboratorios.⁷⁰ La morfología de los microsporidios es única y patognomónica para el phylum y la identificación de *Ec* y sus propiedades taxonómicas mediante MET han sido realizadas mayormente mediante sus características ultraestructurales. Una limitante de utilizar MET es que tiene una baja sensibilidad, ya que solo puede usarse una pequeña cantidad de la muestra, lo que significa un considerable margen de error en el muestreo.⁷¹

2.6. Respuesta inmune

Poco se sabe sobre la respuesta inmune contra *Ec* en conejos. Esto se debe a que la infección permanece latente cuando la proliferación parasitaria es controlada y mantenida por el sistema inmune del huésped. A esto se debe a su dificultad para ser detectada y estudiada.⁷³ La mayoría de los individuos inmunocompetentes que llegan a infectarse con microsporidia desarrollan eventualmente una infección crónica y persistente con mínimos signos clínicos. Esta condición podría describirse como un balance huésped/parásito de la cual el huésped en muchos casos sobrevive, pero la infección parasitaria persiste; sin embargo, en conejos inmunosuprimidos la enfermedad resulta fatal.¹²

La respuesta celular parece ser efectiva en controlar la infección contra este parásito y en la sobrevivencia del huésped. Existen varios argumentos que pueden soportar a esta rama de la respuesta inmune como la responsable de controlar, contener y eliminar al microsporidio: 1) *Ec* es un parásito intracelular; 2) la respuesta inmune humoral, aunque presente, parece no ser efectiva en proteger a los conejos; 3) las células que se observan alrededor de los quistes parasitarios son principalmente células mononucleares; 4) *Ec* ocasiona la formación de granulomas y, 5) la mayoría de los padecimientos causados por los microsporidios son de carácter crónico.⁷⁴

En el caso de microsporidiosis, las células que juegan un papel crucial y son responsables de la comunicación directa entre la inmunidad innata y adquirida, son los macrófagos. En el caso de conejos infectados con *Ec* y con múltiples

órganos afectados, los macrófagos infectados con esporas son evidentes en las áreas granulomatosas.⁷

2.6.1. Granuloma

Se define como una colección focal y compacta de células inflamatorias en las que predominan las células mononucleares. Los granulomas generalmente se forman como resultado de la persistencia de un producto no degradable o como el resultado de respuestas de hipersensibilidad de tipo granulomatosa. Normalmente, los granulomas son el resultado de mecanismos de protección y se forma cuando los procesos inflamatorios agudos no pueden destruir los agentes patógenos invasores.^{41, 42}

El granuloma es un sitio activo donde participan numerosas enzimas, citocinas, factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), la fibronectina y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). También en el microambiente del granuloma existe una estrecha relación entre los linfocitos Th CD4⁺ y los macrófagos activados (M1) que muestran un aumento en la expresión MHC de clase II. Esto es debido a que las células Th CD4⁺ reconocen péptidos de proteínas presentadas por las células presentadoras de antígeno que llevan moléculas MHC de clase II.⁴¹

El complejo proceso de la formación de un granuloma inicia con un macrófago que reconoce y fagocita al agente infeccioso, y continua con una respuesta proinflamatoria, principalmente con la interleucina – 1 (IL-1), que actúa de manera autocrina y paracrina, y posteriormente es seguida por una cascada de factores quimiotácticos y de citocinas [Interferón- γ (IFN- γ), IL-1 y el TNF- α], que promueven la formación del granuloma. La estimulación de macrófagos con IFN- γ induce una reacción antimicrobiana directa y mecanismos antitumorales, así como la regulación de las vías de procesamiento y presentación de antígenos; incluida la detección de agentes infecciosos, la fagocitosis, la secreción, el estallido respiratorio, y la producción de óxido nítrico. El IFN- γ induce la atracción de leucocitos y dirige el crecimiento, la maduración y diferenciación de muchos tipos de células, además de mejorar la actividad de las células NK y la regulación de las funciones celulares B, tales como la inmunoglobulina (Ig). Estimula la adhesión de los granulocitos a células endoteliales a través de la inducción de la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), una actividad compartida con IL-1 y el TNF- α .⁴⁵ Por último, aumenta la expresión de moléculas MHC de clase II en los macrófagos en lo que activa el proceso de destrucción del agente infeccioso. Los receptores para IgG de los macrófagos activados potencializan su capacidad fagocítica. Resultando finalmente en la formación de un granuloma.⁴¹

Las células Th CD4⁺ son necesarias para el desarrollo de granulomas, la maduración de los macrófagos y de otras células inmunes que producen varias citocinas en diferentes cantidades y tipos, y son éstas las que determinan la clasificación inmunológica siendo éstos: de carácter pro-inflamatorio y

antiinflamatorio. Las células de tipo Th1 producen interleucina-2 (IL-2), IFN- γ , y TNF- α ante la estimulación con un antígeno y la participación de interleucina - 12 (IL-12) por parte de las células dendríticas, las células NK y los macrófagos. Las células Th1 son las responsables en la formación de granulomas de tipo Th1. Este tipo de respuesta es típico de la reacción de hipersensibilidad tipo IV o de tipo retardado. Mientras que las células de tipo Th2 producen IL-4, IL-5, IL- 6, IL-9, IL-10, e IL-13, bajo el estímulo de IL-1 por parte de células dendríticas 2 y células cebadas. Las citocinas producidas por las células de tipo Th2, las cuales son importantes para el desarrollo de las células B, y los eosinófilos, que también conforman los granulomas de tipo Th2.⁴¹⁻⁴³

El granuloma de tipo Th1 es el de mayor interés para este estudio ya que se ha reconocido esta formación de células inflamatorias intracelulares como en el caso de los microsporidios, pero en la literatura actualmente no hay nada escrito al respecto. El granuloma más estudiado en la actualidad es el causado por *Mycobacterium tuberculosis*, que está caracterizado por la presencia de necrosis caseosa central, conocido como tubérculo. Típicamente, hay una zona central amorfa granular de detritus celulares y necrosis caseificante con pérdida celular, además de la presencia de los típicos bacilos ácido-alcohol resistentes. Esta zona está rodeada por células fagocíticas de tipo epitelioides, linfocitos, histiocitos, fibroblastos, y células gigantes de Langhans. Estas características histológicas del granuloma son suficientes para permitir un diagnóstico razonablemente preciso de la tuberculosis.^{41, 42}

El granuloma de tipo Th2, tiene características morfológicas únicas. Un ejemplo de este tipo de granuloma sería el lepromatoides provocado por *Mycobacterium leprae*, donde la respuesta inmune exhibe un perfil de citocinas de tipo Th2 con una respuesta inmune y un desarrollo celular escaso, con la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. No obstante, un cambio en la respuesta inmune del huésped (de células Th2 a Th1) puede dar lugar a variaciones en el espectro del granuloma, lo que generaría una infección lepro-tuberculoide, donde las lesiones presentan características mediadas por células y expresan un perfil de citocinas similar al tipo Th1. No hay duda de que las células Th CD4⁺ juegan un papel crucial y decisivo en la respuesta inmune adaptativa en la lepra. Células Th CD4⁺ y CD8⁺ restringidas por MHC, así como las células T restringidas por CD1, y las células T γ , δ serían los principales implicados.⁴³

2.6.2. Citocinas

Las citocinas son proteínas pequeñas que transmiten información de una célula blanca a otra célula blanca⁴⁴ y poseen funciones de crecimiento, diferenciación, regulación y activación de la respuesta inmune. Son particularmente eficaces en generar una respuesta inmune potente y proporcionar señales que contribuyen a la iniciación y la orientación de la naturaleza de la respuesta inmune adaptativa.⁴⁵

Las citocinas derivan principalmente de las células dendríticas (DCs), las células fagocíticas, las células mononucleares y otras células presentadoras de antígenos (APCs).⁴⁵ Todas las citocinas se unen a receptores específicos expresados en la

superficie de la célula blanco, desencadenando así cascadas de señalización intracelulares complejas, que en última instancia controlan la expresión génica requerida para la respuesta celular (Figura 3).⁴⁴

Algunas citocinas promueven la inflamación por lo cual se denominan citocinas proinflamatorias, mientras que otras suprimen la actividad de las citocinas proinflamatorias, por lo cual se les denominan citocinas antiinflamatorias. El concepto de citocinas pro y antiinflamatorias se basa en los genes que se codifican para la síntesis de pequeñas moléculas mediadoras durante la inflamación. En conjunto, es una cascada de productos génicos que por lo general no se producen en individuos sanos. Productos inflamatorios tales como endotoxinas, las citocinas IL-1, TNF y en algunos casos IFN- γ ; son particularmente eficaces en la estimulación de la expresión de estos genes.^{75, 76}

Las citocinas antiinflamatorias bloquean este proceso o al menos suprimen la intensidad de la cascada. Por ejemplo, interleucinas como la IL-4, la IL-10 e la IL-13 (potentes activadores de los linfocitos B) y factor de crecimiento transformante (TGF) β , suprimen la producción de IL-1, TNF, quimioquinas, tales como IL-8, moléculas de adhesión y vasculares.^{75, 76}

Por lo tanto, se considera que un "equilibrio" entre los efectos de pro-inflamatorios y anti-inflamatorios de las citocinas determina el resultado de la enfermedad, ya

sea en el corto o largo plazo. De hecho, algunos estudios sugieren que la susceptibilidad a la enfermedad está determinada genéticamente por el equilibrio o la expresión de cualquiera de las citocinas pro-inflamatoria o antiinflamatorias. Por lo tanto, en función del proceso biológico, cualquier citocina puede funcionar diferencialmente.⁷⁵

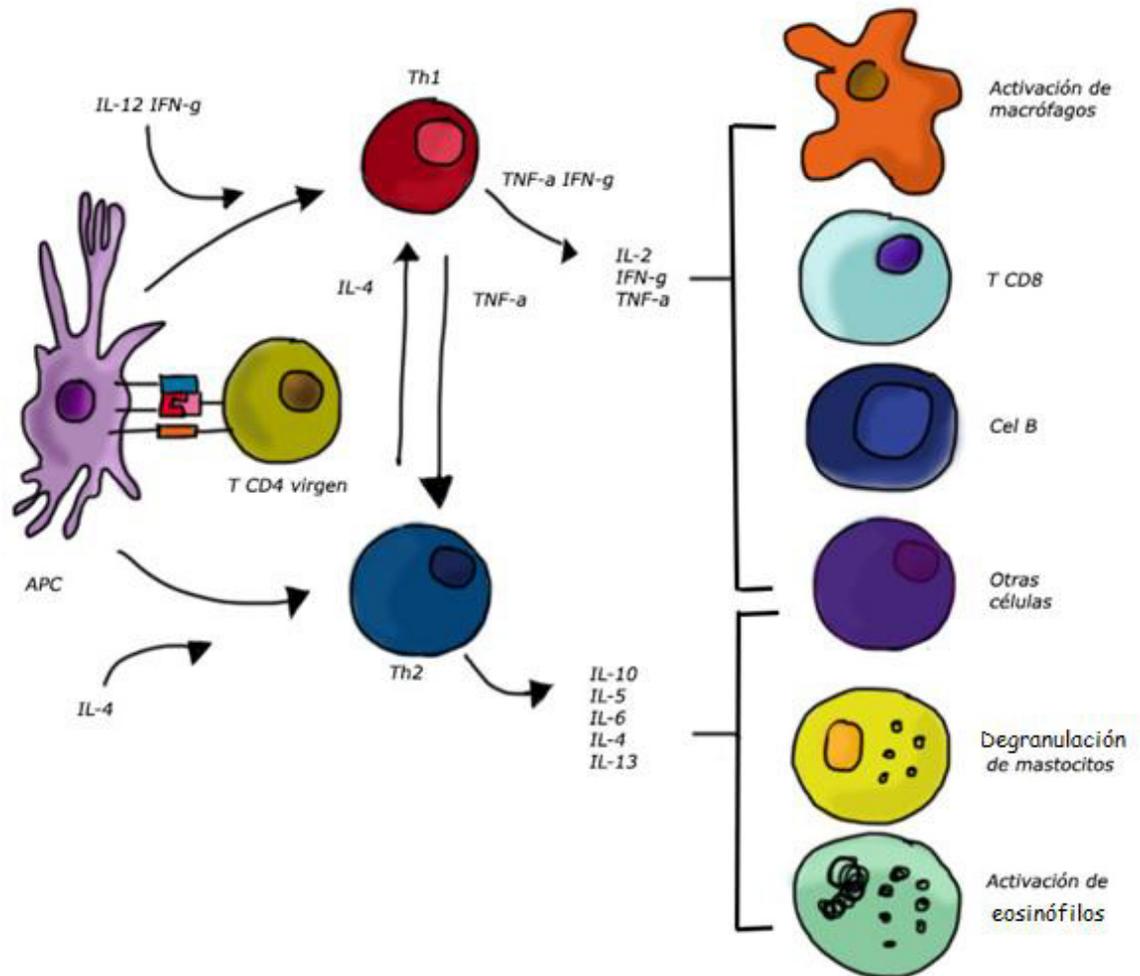


Figura 3. Cascada de la respuesta inmune pro-inflamatoria e antiinflamatoria mediante citocinas.

2.6.2.1. TNF- α

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) es un miembro de una familia creciente de citocinas conocidas como la superfamilia de TNF, que comprende al menos 20 péptidos. La actividad biológica de TNF- α fue descrita a mediados de 1970 con la identificación de un producto derivado de macrófagos que causó necrosis hemorrágica de ciertos tumores sólidos, por lo cual se caracterizó como un factor que produce necrosis tumoral *in vivo*, y mostró actividad antitumoral mediante la inducción de apoptosis de las células.⁴⁶

Esta citocina es producida por numerosos tipos de células inflamatorias, tales como células B y células T, basófilos, eosinófilos, células dendríticas, células NK, neutrófilos y mastocitos. Sin embargo, también es producida por astrocitos, fibroblastos, células gliales, queratinocitos, neuronas, osteoblastos, células epiteliales, fibras del músculo liso, y células de la espermatogénesis, y muchos tipos de células tumorales. Sin embargo, los monocitos y los macrófagos son la fuente primaria para la síntesis de TNF- α , al menos durante la respuesta inflamatoria.⁴⁶

En los macrófagos, la expresión del gen del TNF- α es inducida por los estímulos físicos que incluyen virus, bacterias y productos de origen parasitario, células tumorales, complemento, citocinas (IL-1b IL-2, IFN- γ , GM-CSF, MCSF y TNF- α), isquemia, trauma e irradiación.⁴⁶

Se ha reconocido que el TNF- α cumple ciertas funciones: 1) modula el crecimiento, la diferenciación y el metabolismo en una gran variedad y tipos de células; 2) puede producir caquexia mediante la estimulación de la lipólisis y la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa en los adipocitos y mediante la estimulación de la lipogénesis hepática; 3) puede iniciar la apoptosis en las células malignas o transformadas, células infectadas por virus, linfocitos T, y las células epiteliales; y 4) puede producir la inflamación.^{47, 48}

Al igual que IL-1, TNF- α es un potente activador de la respuesta inflamatoria y es un regulador clave de la inmunidad innata.⁴⁶ El TNF- α interactúa con las células endoteliales para inducir la ICAM 1, molécula vascular de adhesión celular (VCAM) -1 y E-selectina, lo que permite la salida de los granulocitos en loci inflamatorio. También es un potente activador de los neutrófilos, la mediación de la adhesión, la quimiotaxis, la degranulación, y el estallido respiratorio.⁴⁵

Aunque generalmente se asume que la función primaria de TNF- α es beneficiosa en la activación de la respuesta inmune innata, la producción inadecuada de TNF- α conduce a una respuesta inflamatoria amplificada, destrucción del tejido y lesión de los órganos. Dado el papel primordial que el TNF- α juega tanto en la respuesta fisiológica normal a la inflamación y la inmunidad adquirida e innata, así como las consecuencias patológicas asociados con su síntesis inadecuada y liberación, no

es de extrañar que la expresión y la actividad de TNF- α estén estrictamente regulados en muchos niveles diferentes.⁴⁶

2.6.2.2. IL-4

La interleucina -4 (IL-4) es posiblemente una de las citocinas mejor estudiada y más influyentes del sistema inmunológico. Fue descrito originalmente en 1982 como un factor estimulante de células B, la cual estaba presente en los sobrenadantes de una línea celular T tumorales estimuladas con éster de forbol, por Maureen Howard y Bill Paul en el Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas (NIAID).^{49, 50} Tiempo después, Mossman y Coffman publicaron que existe un patrón de expresión recíproca de IL-4 e IFN- γ en células Th1 y Th2, respectivamente.⁵⁰

La IL-4 es una citocina que funciona como un potente regulador de la inmunidad secretada principalmente por los mastocitos, células Th2, los eosinófilos y los basófilos.⁴⁹ Además de linfocitos Th2, la IL-4 se deriva a partir de células NK. En eosinófilos y basófilos, IL-4 existe como un péptido preformado, asociados a gránulos que pueden ser rápidamente liberados en las respuestas inflamatorias alérgicas.⁴⁵

Esta citocina juega un papel importante en la supervivencia de los leucocitos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, como la inmunidad mediada por

células Th2, la reparación de tejidos y la homeostasis a través de la activación de macrófagos.⁴⁹ La IL-4 puede inducir cambios fenotípicos que resultan en activación de macrófagos (M2), caracterizados por regulación al alza de MHC clase II y el receptor de manosa, así como una variedad de otros marcadores,⁵¹⁻⁵² también estimula la proteína B7 (CD80 / CD86), CD40, induce el interruptor de isotipo de la IgM de superficie, y el receptor de IgE de baja afinidad (CD23), la expresión de células B, mejorando así la capacidad presentadora de antígeno. Asimismo de estos efectos sobre las células B, la IL-4 tiene influencias importantes en los linfocitos T, contribuye a la diferenciación de los linfocitos Th0 vírgenes hacia un fenotipo Th2; también es importante en el mantenimiento de las respuestas inmunes alérgicas mediante la prevención de la apoptosis de linfocitos Th2.⁴⁵

En cuanto a los efectos de la IL-4 en órganos de importancia para este estudio, cabe mencionar que en hallazgos realizados por Ganardi *et al.* 2015 sobre las citocinas inflamatorias tales como IL-1 β y TNF- α en el cerebro, ejercen un efecto negativo en el comportamiento cognitivo, caracterizado, como la depresión y el estrés; además demostraron un papel fundamental y beneficioso de la IL-4 en células T, la cognición y la homeostasis cerebral en ratones; el cual se debió a que actúa como un agente anti-inflamatorio al administrarse conjuntamente o poco después de un estímulo inflamatorio, y genera una regulación negativa de la producción de citocinas inflamatorias tales como TNF- α .

3. Material y Métodos

3.1. Animales para el estudio

Se utilizaron 40 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de ambos sexos, de las razas California y Nueva Zelanda con una edad promedio de 3 meses y con un peso aproximado de 1 kg. Los animales fueron alojados en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS-UANL), cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio. Los conejos recibieron agua purificada y alimento comercial *ad libitum* y con un fotoperíodo de 12 hr de luz/oscuridad. Previo al inicio del experimento, los animales se mantuvieron por un periodo de cuatro días para su aclimatamiento.

3.2. Diseño del experimento

Para los animales positivos se formaron dos grupos: el grupo A o infección natural y el grupo B infección natural/inmunosuprimido. Para conformarlos se utilizó un criterio de selección, en donde se seleccionaron aquellos animales que presentaran signos clínicos compatibles con *Ec* tales como: diarrea, ataxia, opistótonos, tortícolis, convulsiones, nistagmos, letargia, pérdida de peso, anorexia, poliuria, polidipsia, incontinencia urinaria y escaldamiento de la piel en el tren posterior. Estos animales se obtuvieron de granjas cunícolas y de negocios a nivel local (diferentes municipios de Nuevo León). Los animales negativos se conformaron en dos grupos: el grupo C o inmunosuprimido y el grupo D o testigo,

estos animales se obtuvieron del Centro de Especies Menores, Ixtacuixtla, Tlaxcala, México (19°21'14.1"N 98°23'00.1"W).

Los tratamientos utilizados en los diferentes grupos (Cuadro 1) fueron los siguientes: los animales del grupo A no recibieron ningún tratamiento. A los animales pertenecientes a los grupos B y C se les administró Dexametasona 6.5 mg/kg (Bursol, Laboratorios Brovel, México)⁵² por vía IM para provocar un estado de inmunosupresión. Mientras que los animales del grupo D se les administró solución salina fisiológica (0.9 ml/por animal) por vía IM. Esto se realizó después del aclimatamiento de los animales, y mediante 3 administraciones del tratamiento con Dexametasona en lapsos de 7 días cada uno. Al finalizar los tratamientos, se realizó la extracción de sangre y la obtención del suero y posteriormente se llevó a cabo la eutanasia de los animales (Figura 4).

GRUPO	n	TRATAMIENTO POR ANIMAL
A- Infección natural	10	Sin tratamiento
B- Infección natural/inmunosuprimido	10	6.5 mg/kg Dexametasona/IM
C- Inmunosuprimido	10	6.5 mg/kg Dexametasona/IM
D- Testigo	10	0.9 ml SSF/IM/animal

Cuadro 1. Distribución de los grupos de animales de acuerdo al tratamiento y a la infección.



Figura 4. Línea de tiempo del tratamiento con Dexametasona.

3.2.1. Anestesia y Eutanasia de los Animales

Los conejos se anestesiaron mediante la administración de 0.4mg/kg de clorhidrato de Zolazepam (Zoletil 100 Virbac®, México) aplicándose por vía IM en el miembro posterior izquierdo.⁵³ Una vez anestesiados, la eutanasia se realizó mediante la inhalación de éter etílico (Eter, Jalmek Científica, México). Procediéndose a realizar la necropsia (Manual de técnicas de necropsia en animales domésticos⁷⁸).

3.3. Colección, Preservación y Procesamiento de las Muestras

3.3.1. Extracción de sangre y obtención del suero

Este procedimiento se realizó una vez que los conejos ya estaban anestesiados. De cada conejo se colectaron 3 ml de sangre, esto se llevó a cabo colocando al conejo en decúbito dorsal y realizando una punción intracardíaca siguiendo como referencia la línea media torácica ventral e inmediatamente por debajo del esternón. La extracción sanguínea se realizó por duplicado, con jeringas plásticas estériles de 3 ml y depositando la sangre en tubos al vacío con y sin coagulante. La sangre con anticoagulante se colectó en tubos de ensaye con EDTA (3 ml, 13 x 75 mm, BD Vacutainer® con EDTA K₂, México) y posteriormente se analizó mediante biometría hemática y conteo leucocitario en un analizador automático (Hemograms analyzer BC Vet Kontrolab 2014-2015®, Italia), en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

La sangre sin anticoagulante se colectó en tubos de ensaye (6 ml, 13 x 100 mm. BD Vacutainer®, México) y se almacenó 12 h a 4 °C, una vez que se formó el coágulo en los tubos sin coagulante; posteriormente, el suero se separó mediante centrifugación (Zentrifugen Universal 320R Hettich, Estados Unidos) a 5000 rpm/15 min/4 °C. El suero obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso posterior.

3.3.2. Muestras fecales

Las muestras fecales se tomaron durante la necropsia, directamente del intestino grueso y del ciego, abriendo longitudinalmente el tracto digestivo con unas tijeras. Las muestras fecales se colocaron en botes de plástico y se fijaron inmediatamente en frascos con formaldehído al 10 % con PBS (Phosphate Buffer Saline Tablets, Sigma-Aldrich®, México) a un pH de 7.4 (Apéndice B. 3), las muestras permanecieron en un frasco hasta su uso.

3.3.3. Muestras de Orina

La colección de orina también se realizó durante la necropsia, mediante cistocentesis, con jeringas plásticas estériles desechables de 5 ml (DL, México D.F.). Se colectó la totalidad de la orina presente en la vejiga. Las muestras de orina se almacenaron en frascos de 60 ml (38 x 65 mm) de polipropileno estériles y se congelaron a -20 °C hasta su uso. De cada conejo se extrajeron en promedio 5 ml de orina.

Durante la necropsia se realizó la inspección general del cadáver y posteriormente se obtuvieron las muestras de los órganos como: cerebro, riñón, pulmón, hígado, tracto digestivo, bazo y ganglios linfáticos; se fijaron durante 48 h en formaldehído amortiguado al 4 % con PBS a un pH de 7.4 (Apéndice B.2). En los tejidos se realizó la técnica histológica de rutina, se embebieron en parafina (Surgipath Paraplast, Leica®, México) se seccionaron a 4 μm en el micrótopo para teñirlos con Hematoxilina y Eosina (HE) y revisar las lesiones en los órganos y por último se procedió a la realización de la IHC.

3.4. Detección de Esporas en Muestras

3.4.1. CIA

La metodología que se empleó para la detección de IgG contra Ec fue la aglutinación de esporas utilizando una prueba diagnóstica para Ec CIA-Medicago® (Medicago AB, Suecia), la cual consta de esporas completas de Ec muertas por calor y suspendidas en carbón coloidal (Apéndice A. 3). Se realizó una mezcla de suero/antígeno/carbón que se le colocó un cubreobjetos para evitar su deshidratación y facilitar la observación de la aglutinación directa en un microscopio (Primo Star. Zeiss) a un aumento de 40 X o 100 X. La positividad se demostró mediante la presencia de esporas de Ec aglutinadas y rodeadas de partículas de carbón, lo cual se interpretó como la presencia de IgG en el suero de los conejos reconociendo antígenos en la superficie de las esporas. Estas muestras fueron comparadas con los controles positivos y negativos de la misma prueba.

3.4.2. IFA

Para la detección de las esporas mediante IFA, se realizaron secciones de tejido renal 4 μm . Se utilizaron anticuerpos primarios para la detección de esporas de microsporidio (Monoclonal antibodies, Bordier Affinity Products, Suiza) a una proporción 1:100 y como anticuerpo secundario se utilizó un Ac conjugado con FITC (Anti-Mouse IgG-FITC antibody produced in goat, Sigma-Aldrich®, México) a una proporción 1:50. Se contrastó con azul de Evans (Sigma-Aldrich®, México) siguiendo las especificaciones del fabricante (Apéndice A.1). La mitad del proceso se realizó evitando cualquier exposición a la luz (a partir de la incubación con el anticuerpo secundario). Finalmente, las muestras montadas, fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Epifluorescence, Zeiss) a 10X, 40X y 100X para poder determinar la presencia de las esporas en los tejidos.

3.4.3. IHC

Se realizó en un principio un proceso similar a la IFA para detectar las esporas, con el corte de las secciones del tejido cerebral a 4 μm , hasta el proceso de recuperación o desenmascaramiento del antígeno (Apéndice A.2). Para la detección de las esporas, las secciones tisulares se incubaron con anticuerpos monoclonales contra microsporidios (Monoclonal antibodies, Bordier affinity products, Suiza) a una proporción 1:100, y posteriormente, se continuó con las especificaciones del fabricante (previamente estandarizadas para este proceso) para la incubación del anticuerpo secundario (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Estados Unidos) a una proporción 1:100 y revelado con DAB

(ImmPACT™ DAB Substrate, Vector Laboratories, Estados Unidos). Las muestras una vez montadas fueron observados en un microscopio (Primo Star. Zeiss) a 10X, 40X y 100x para determinar la presencia de las esporas en los tejidos.

3.4.4. Tinción de muestras fecales y orina

3.4.4.1. Tinción azul de Tricrómo (técnica de Weber) y observación microscópica

Previo a la tinción, los botes plásticos conteniendo las muestras de heces fijadas y las de orina fueron agitados para asegurar la homogeneidad de las mismas. Posteriormente, con un asa bacteriológica se tomó una pequeña alícuota de cada muestra y se realizó un frotis de 4 cm² en un portaobjetos. Posteriormente se siguió el protocolo establecido (Apéndice A.4) con azul de Tricrómo (Trichome Blue Stain, Para-Pak® Stool System), los frotis teñidos fueron secados al aire, se les aplicó resina Entellan (Merck Millipore, Alemania) y un cubreobjetos para su observación al microscopio (Primo Star. Zeiss) a 10X, 40X y 100X.

3.4.4.2. Tinción con Calcofluor White M2R y observación microscópica

Se realizó un frotis a las muestras de heces y de orina según el protocolo de tinción con Calcoflúor White M2R (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich®, México). (Apéndice A.5). Una vez que los frotis fueron teñidos y secados, se le aplicó resina y se les colocó el cubreobjetos para ser observados en el microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Epifluorescence, Zeiss) a 10X, 40X y 100X. Los controles positivos se utilizaron para confirmar que las estructuras encontradas

corresponden a las esporas en los animales infectados y descartar cualquier artefacto.

Las laminillas control (Scientific Device Laboratory, USA) contenían frotis teñidos con azul de Tricrómo y con Calcoflúor White MR2 de las microsporidias más comúnmente reportadas en animales domésticos y humanos: *Encephalitozoon hellem*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Nosema corneum* y *Septata (Enterocytozoon) intestinalis*.

3.4.5. Tinción histopatológica con Hematoxilina y Eosina

Las secciones fijadas con formaldehído al 4 %, se seccionaron a 4 µm de espesor siguiendo el protocolo de tinción para HE, (Apéndice A.6). Finalmente, los especímenes fueron observados al microscopio (Primo Star. Zeiss) a 10X, 40X y 100X para la detección y discriminación de esporas y/o granulomas así como las posibles lesiones asociadas a la presencia del parásito. Los resultados fueron registrados por medio de fotografías digitales.

3.5. Detección de TNF-α e IL-4 mediante IHC

3.5.1. Pares de anticuerpos anti-citocinas

Las características de los anticuerpos monoclonales anti-citocinas que se utilizaron para este estudio se muestran en el cuadro 2.

3.5.2. IHC para detección de citocinas

Después de la identificación de los granulomas en las secciones teñidas con HE, se seleccionaron aquellas con mayor cantidad de granulomas o con respuesta inflamatoria no supurativa. De los bloques de parafina de estos tejidos, se realizaron cortes histológicos de un grosor de 3-4 μm , y se colocaron en laminillas recubiertas con Poli-L-lisina (Sigma-Aldrich®, México), posteriormente se dejaron secar toda la noche. Subsecuentemente se realizó el proceso de inmunotinción con el sistema Envision™ (Agilent Technologies Dako, Dinamarca), (Apéndice A.7), utilizando anticuerpos para la detección de las citocinas TNF- α e IL-4. Este método se estandarizó y realizó en el Laboratorio de Técnicas Histológicas del Depto de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL. Una vez procesadas todas las muestras, fueron observadas al microscopio de luz Nikon Eclipse 50i y un sistema de análisis de imagen con el software NIS-Elements Advanced Research Digital Sight DDS-2Mu, a un aumento de 4X, 10X y 40X y se registraron los resultados con fotografías digitales para la evaluación morfológica posterior del marcaje de las citocinas.

PRODUCTO	DESCRIPCIÓN	COMERCIALIZADORA	NUMERO COMERCIAL
Anti-TNF α antibody	Mouse monoclonal [P/T2] para TNF α	Abcam, Inc. ©	ab194403
Rabbit IL-4 Antibody	Monoclonal Mouse IgG _{2B} Clone # 855824	R&D Systems, Inc. ©	855824

Cuadro 2. Anticuerpos anti TNF- α y anti IL-4 para determinar su presencia en el granuloma microsporidiano.

3.6. Análisis sanguíneo

Las muestras de sangre obtenidas por punción intracardíaca antes de realizar la necropsia y conservadas con anticoagulante se procesaron en el analizador automático de sangre, pre-programado con los valores para muestras sanguíneas para conejo. Los resultados se presentaron como: Porcentaje del Hematocrito (% HCT), Porcentaje de los Granulocitos (% GRANS) y Porcentaje de los Linfocitos/Monocitos (%L/M) para su conteo. Posteriormente, a estos datos se les realizó su análisis estadístico.

3.7. Análisis Estadístico y Morfología

Los resultados obtenidos de la biometría hemática y diferencial leucocitaria fueron evaluados mediante un análisis factorial 2x2 bajo un diseño completamente al azar, ANOVA y DMS para el análisis de medias. Se consideró que los resultados menores a $p < 0.05$ eran significativos. Para este propósito se utilizó el programa estadístico SPSS (IBM SPSS Statistics 22.0). Para el conteo de las células positivas a TNF- α e IL-4, las foto-capturas fueron analizadas mediante el programa de procesamiento de imágenes ImagenJ (ImagenJ IE 6.0, Microsoft Java 1.1.4), utilizando controles positivos y negativos a TNF- α e IL-4 para obtener los umbrales de medición y posteriormente, los resultados obtenidos se analizaron mediante la suma de rangos de Wilcoxon, utilizando el programa de diseños experimentales (FA-UANL, 2014).

4. Resultados

4.1. Detección de Esporas

4.1.1. CIA

Todos los animales muestreados del grupo A (conejos infectados) y B (conejos infectados con aplicación de Dexametasona) mostraron seropositividad a Ec mediante la prueba CIA con el objetivo de 40X se observaron numerosas esporas de Ec rodeadas de partículas de carbón en un fondo café o sepia (Figura 5), lo cual indicó la presencia de anticuerpos (IgG) contra antígenos de la superficie de las esporas en los conejos muestreados. Esto fue indicativo de que estos animales había estado en contacto previo con este agente infeccioso, pero por sí sola esta prueba no indica la presencia del Ec en estos conejos, por lo cual se requirió utilizar otros exámenes para confirmar su diagnóstico. Mientras que todos los animales que conformaban el grupo C (conejos sanos con Dexametasona) y grupo D (conejos controles negativos) resultaron seronegativos a Ec (Figura 6).

4.1.2. Tinción con Azul de Tricrómo

Los animales pertenecientes a los grupos no infectados (C y D) resultaron negativos a la presencia de las esporas de Ec en todas las muestras, tanto de heces como de orina, lo que permitió confirmar el diagnóstico negativo a Ec en estos conejos. A diferencia de los conejos pertenecientes a los grupos A y B (animales infectados) donde se observaron de heces, esporas de forma oval de aproximadamente 2-4 μm de longitud compatibles con Ec en la mayoría de las muestras. Las esporas se tiñeron de color rojo como marca la literatura y las

indicaciones de la técnica de tinción, lo cual permitió identificarlas como microsporidios. Las esporas presentaban la típica línea horizontal del cinturón ecuatorial o en diagonal (Figura 7). En cuanto a las muestras de orina, las esporas fueron escasas, observándose como máximo 2 por campo y no estaban presentes en todas las muestras, esto pudo deberse al tiempo de infección en se encontraban cada uno de los animales muestreados durante el momento de la eutanasia. En aquellas muestras donde sí se observaron las esporas, se tiñeron de un color rosa pálido y mostraban un incipiente tubo polar central.

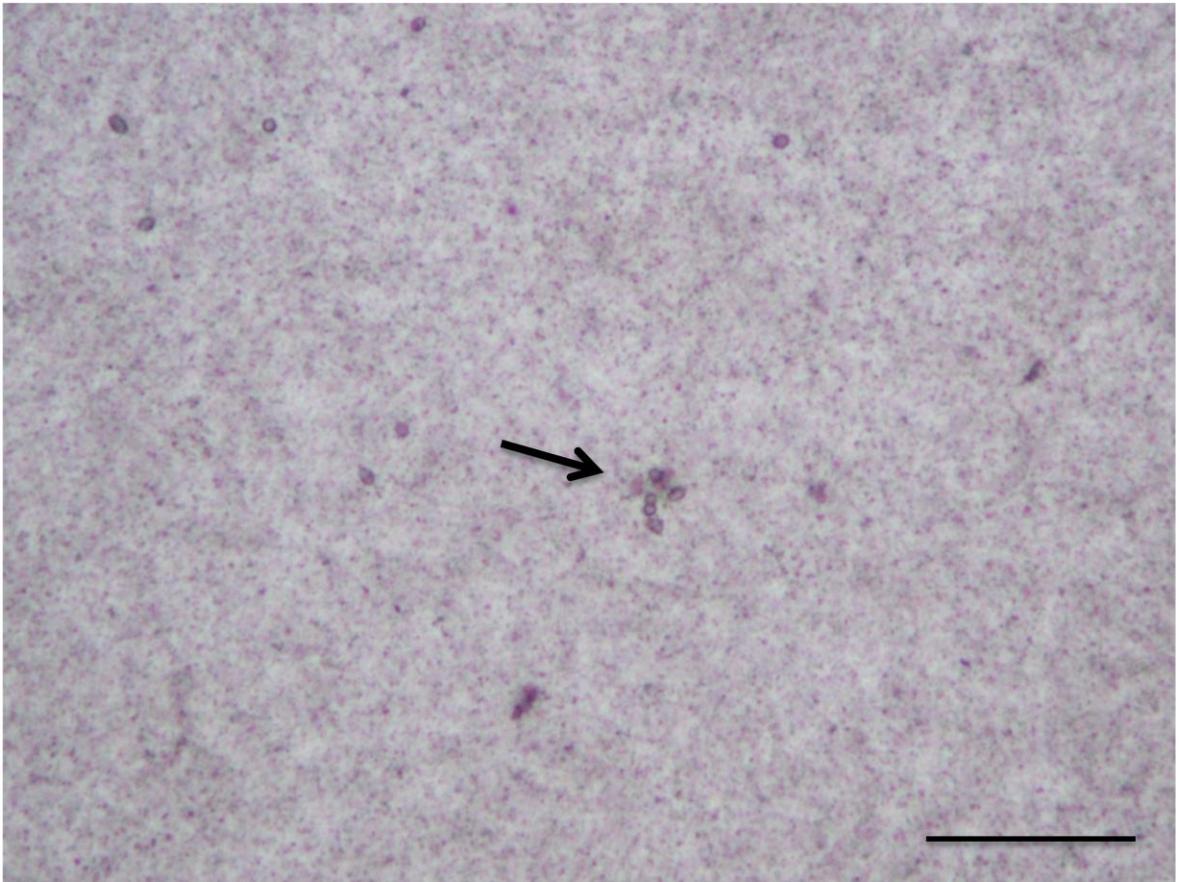


Figura 5. Resultado positivo a la presencia de IgG contra Ec mediante CIA en suero de conejo infectado. La presencia de los anticuerpos en el suero provoca la aglutinación de las esporas (flecha). El carbón permite observar con claridad la circunferencia de las esporas de Ec (Barra = 50 μm)

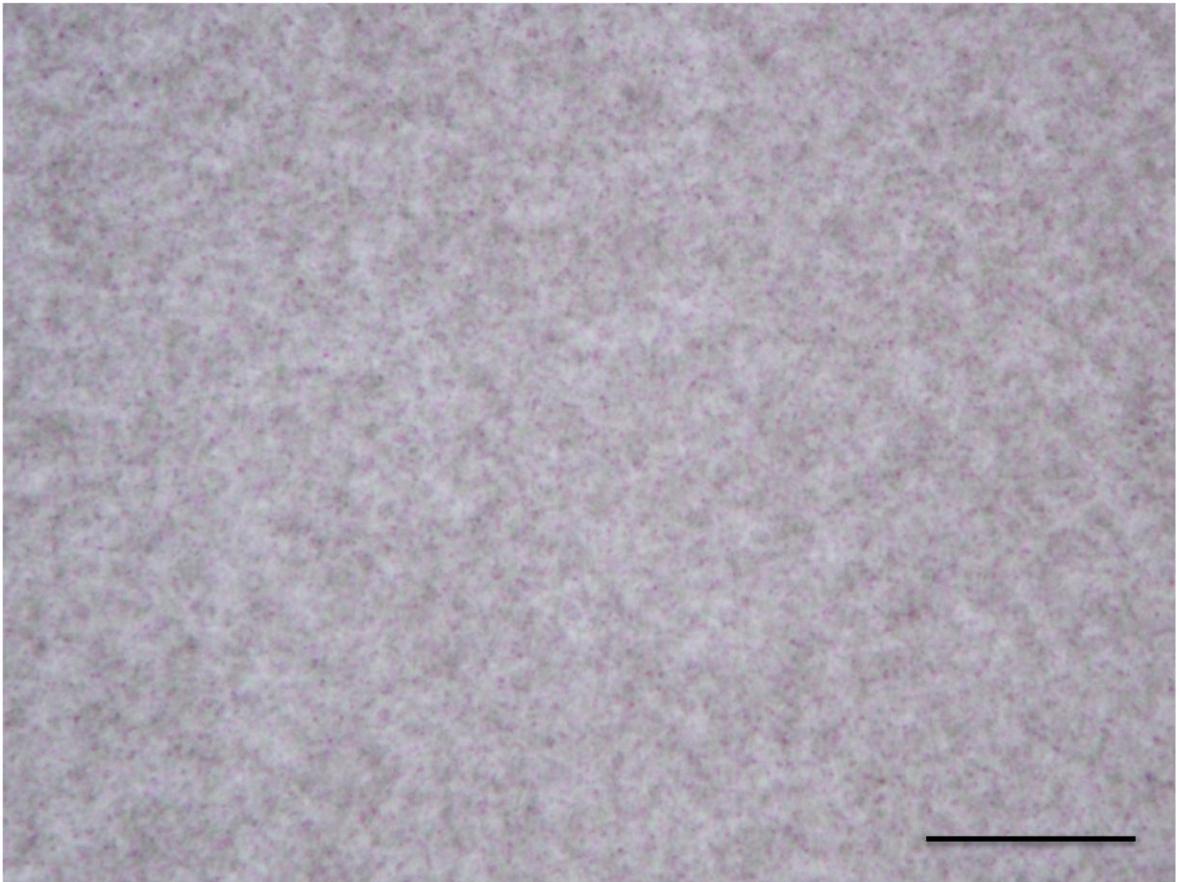


Figura 6. Resultado negativo a la presencia de IgG contra Ec mediante CIA en suero de conejo clínicamente sano. No se observa aglutinación. (Barra = 50 μm).

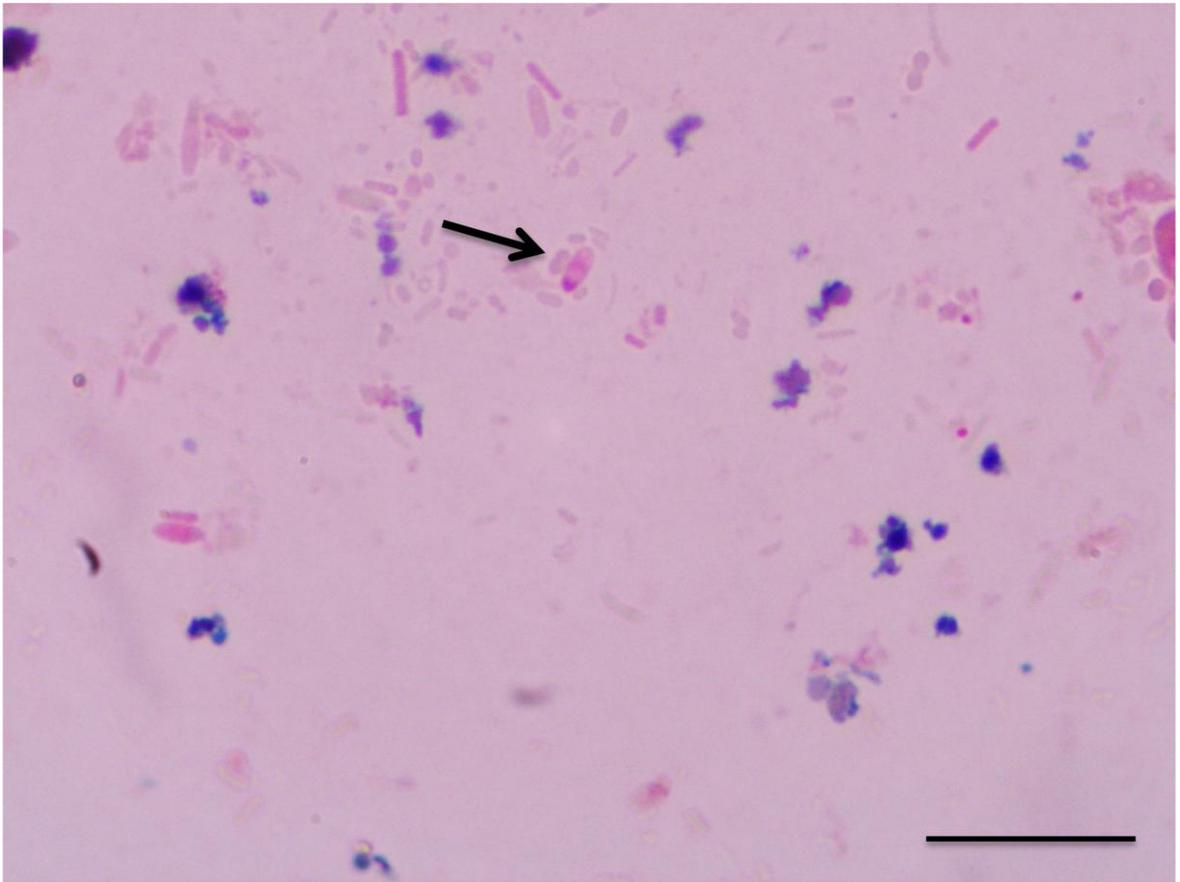


Figura 7. Tinción con Azul de Tricrómo de las heces de conejo perteneciente a un conejo infectado. En la imagen se observan la espora de Ec (flecha) de color rosado pálido y con el característico cinturón ecuatorial que la identifica como un microsporidio (Barra = 20 μm).

4.1.3. Tinción con Calcofluor White

Todos los conejos que formaban los grupos controles negativos (C y D) cuyas muestras fueron teñidas con Calcofluor white, tanto las heces como la orina, resultaron negativos a la presencia de las esporas de *Ec*, estableciendo a estos animales como negativos a la presencia del microsporidio. Por su parte, los conejos de los grupos A y B (animales infectados) mostraron una mayor presencia de esporas redondas y ovals en las muestras fecales que en las de orina, y en mayor proporción en comparación con los resultados de la tinción con azul de Tricrómo. Las esporas maduras y completas mostraron una fluorescencia de color azul brillante, mientras que las esporas incompletas o germinadas presentaban un brillo tenue y una apariencia transparente y con forma de anillo (Figura 8) debido a la concentración de quitina en éstas. Estos resultados ayudaron a confirmar el diagnóstico positivo de la presencia del microsporidio en los conejos pertenecientes a los grupos A y B.

4.1.4. IFA

La técnica de IFA en tejido, principalmente riñón permitió una rápida detección de las esporas de *Ec* en las muestras de los animales seropositivos (Grupos A y B, conejos infectados con *Ec*). Se pudo observar la presencia de las esporas de aproximadamente 2-4 μm de tamaño cada una dentro del glomérulo, en la cápsula de Bowman, así como a nivel intraepitelial e intraluminal en túbulos renales (Figura 9). Estas esporas fueron fácilmente distinguibles debido a su color verde en contraste al fondo rojizo del tejido. Dichos resultados confirmaron la presencia de

Ec en el tejido renal de los animales tanto del grupo A (infectados) como el grupo B (infectado con Dexametasona), a pesar de la diferencia del tratamiento. Mientras que en lo animales del grupo C (con aplicación de Dexametasona) y los del grupo D (grupo control), como se habían confirmado, resultaron negativos a la presencia de la espora en el tejido renal.

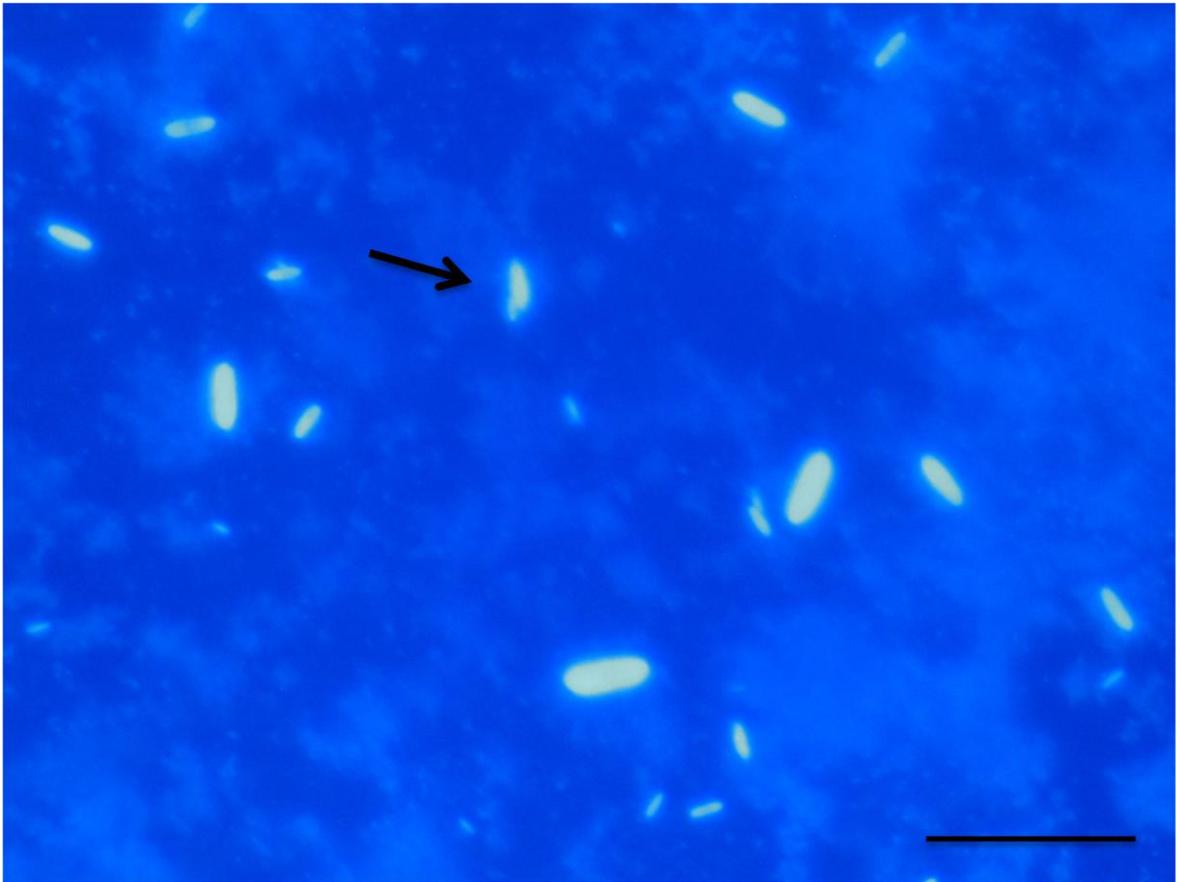


Figura 8. Tinción con Calcofluor White en heces de conejo infectado. Se observan claramente las esporas de Ec teñidas de color azul brillante (flecha). El tamaño y forma característica de estos microsporidios permite su identificación (Barra = 50 μ m)

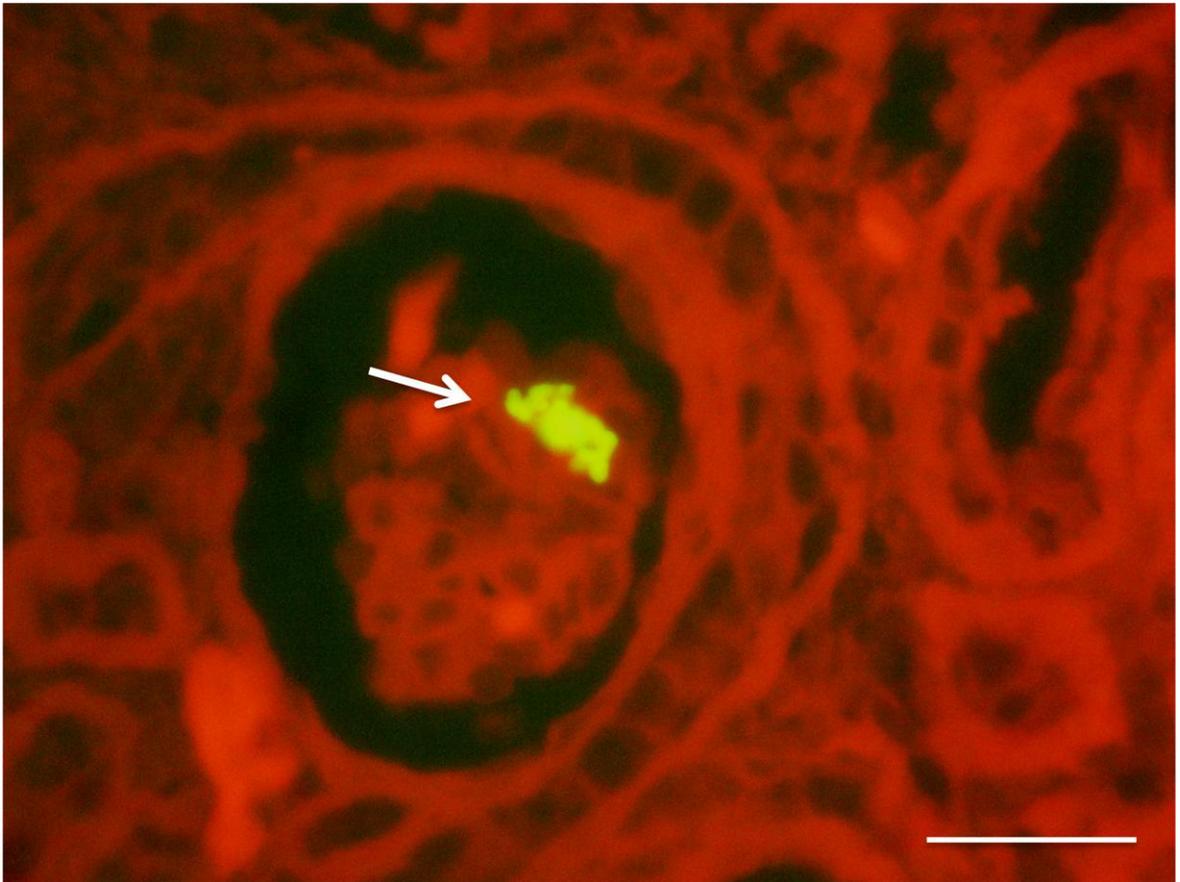


Figura 9. Inmunofluorescencia de riñón de un conejo perteneciente a un conejo infectado. Se observan esporas de Ec (flecha) agrupadas en racimo dentro del glomérulo. (Barra = 50 μ m)

4.1.5. IHC

Mediante IHC se detectaron esporas de Ec en el tejido cerebral de los animales seropositivos a pesar de la diferencia de tratamiento entre ellos: Grupo A o infectado y grupo B infectado con Dexametasona. Se observaron esporas de Ec dentro y adyacentes a las estructuras quísticas. Estos quistes se encontraban con mayor frecuencia en la sustancia blanca del encéfalo en ambos grupos. Se pudieron observar esporas maduras y ovaladas de 2 - 4 μm de longitud, teñidas de color café o marrón (Figura 10). Comparando estos resultados obtenidos a partir de los animales pertenecientes a los grupos C, con Dexametasona y grupo D o control, se pudo confirmar todo lo ya observado en las pruebas diagnósticas anteriores y establecer el diagnóstico positivo en los grupos A y B y en los grupos C y D, éste fue negativo.

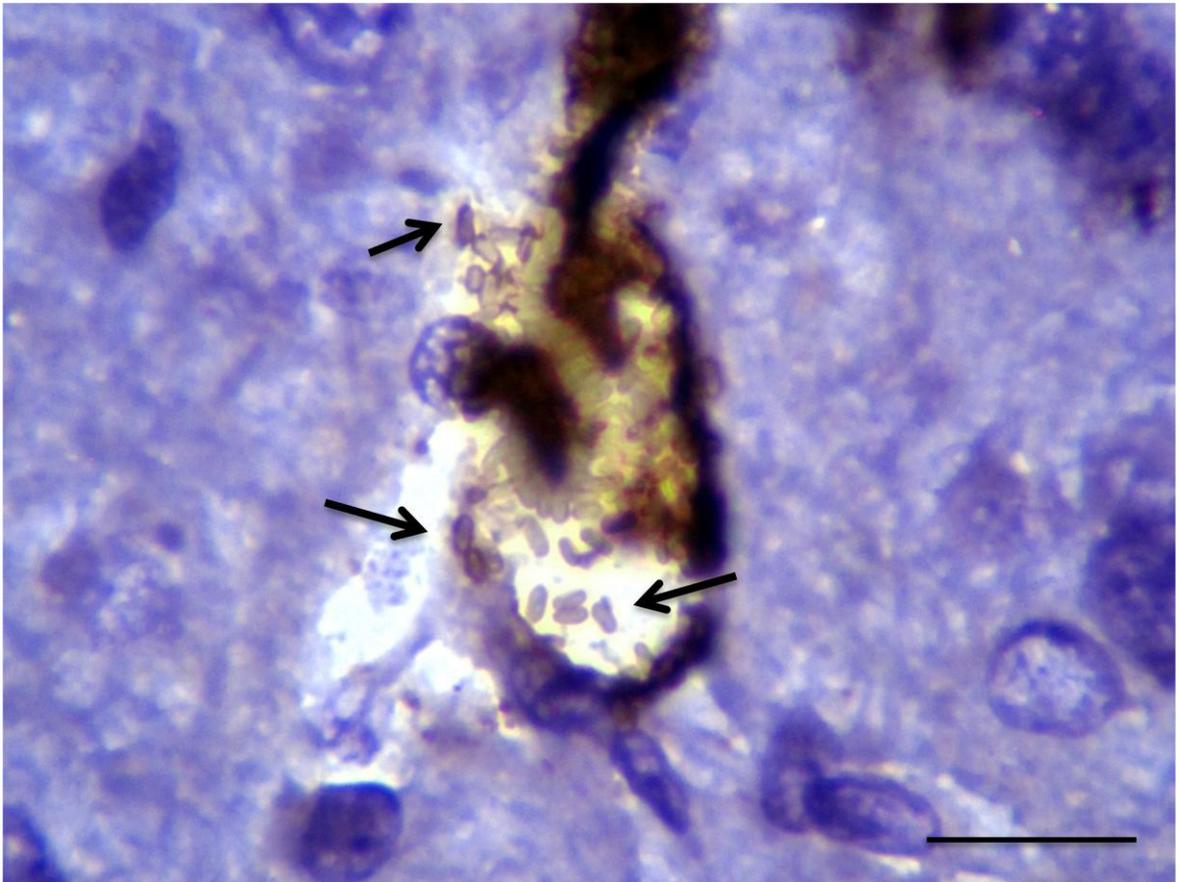


Figura 10. Inmunohistoquímica de encéfalo perteneciente a un conejo infectado con Ec. Se observa una gran acumulación de esporas maduras de Ec dentro y fuera de un quiste o xenoma (flechas). (Barra = 50 μ m)

4.2. Detección de granulomas por histopatología con Hematoxilina y Eosina

4.2.1. SNC

En todos los animales pertenecientes a los grupos A y B, infectados con Ec (A y B) se observaron lesiones microscópicas de tipo granulomatoso, a diferencia de los animales de los grupos C y D, controles; donde no se pudo observar ninguna lesión sugerente de encefalitozoonosis. En los grupos primeramente mencionados, los sitios en donde se pudo apreciar la formación de los granulomas microsporidianos fueron: la sustancia gris, sustancia blanca, bulbo raquídeo, tallo cerebral, las meninges y en el espacio extravascular (Figura 11). En cuanto al cerebelo, se observaron pocos quistes parasitarios o xenomas y casi ninguna lesión macroscópica y/o microscópica aparente. Al comparar los resultados de ambos grupos (A y B) entre sí, se pudo observar una mayor cantidad de granulomas en los conejos pertenecientes al grupo B a diferencia del grupo A, lo que puede indicar que el tratamiento con Dexametasona tuvo un efecto negativo sobre el sistema inmune para contener la infección, ya que el grupo C (sano con Dexametasona) no se observó ningún daño patológico en el SNC.

4.2.2. Riñón

Todos los conejos pertenecientes a los grupos infectados A y B mostraron evidencia macroscópica de lesiones crónicas renales, las cuales se observaron mayormente en la corteza y en la médula. Estas lesiones consistieron en múltiples áreas focales, irregulares y deprimidas de color grisáceo, rojo o púrpura oscuro. Asimismo, se observaron áreas radiales de color blanco-grisáceo que se

extendían hasta la médula. A nivel microscópico, las lesiones iban de una discreta a una severa infiltración linfocitaria intersticial crónica, acompañadas de una reacción granulomatosa, así como discretos cambios degenerativos en epitelios de los túbulos renales en corteza y médula a la cápsula de Bowman, adherencia de glomérulos y así como la presencia ocasional de quistes parasitarios o xenomas en epitelio tubular (Figura 12). Asimismo se observó en algunos cortes histológicos hemorragia intratubular, degeneración y descamación de epitelio tubular y severa fibrosis intersticial. Pero al hacer una comparación en cuanto al daño patológico entre los grupos A y B, fue el grupo B donde el daño era mucho más severo e invasivo en el tejido renal. Esto sin duda, fue debido al tratamiento entre ellos, que afectó la capacidad del sistema inmune en combatir al microsporido, ya que el grupo C (sano con Dexametasona), grupo en el que se compartía tratamiento, no presentaba lesiones patológicas. Por último, en el grupo D, no se observaron lesiones patológicas aparentes.

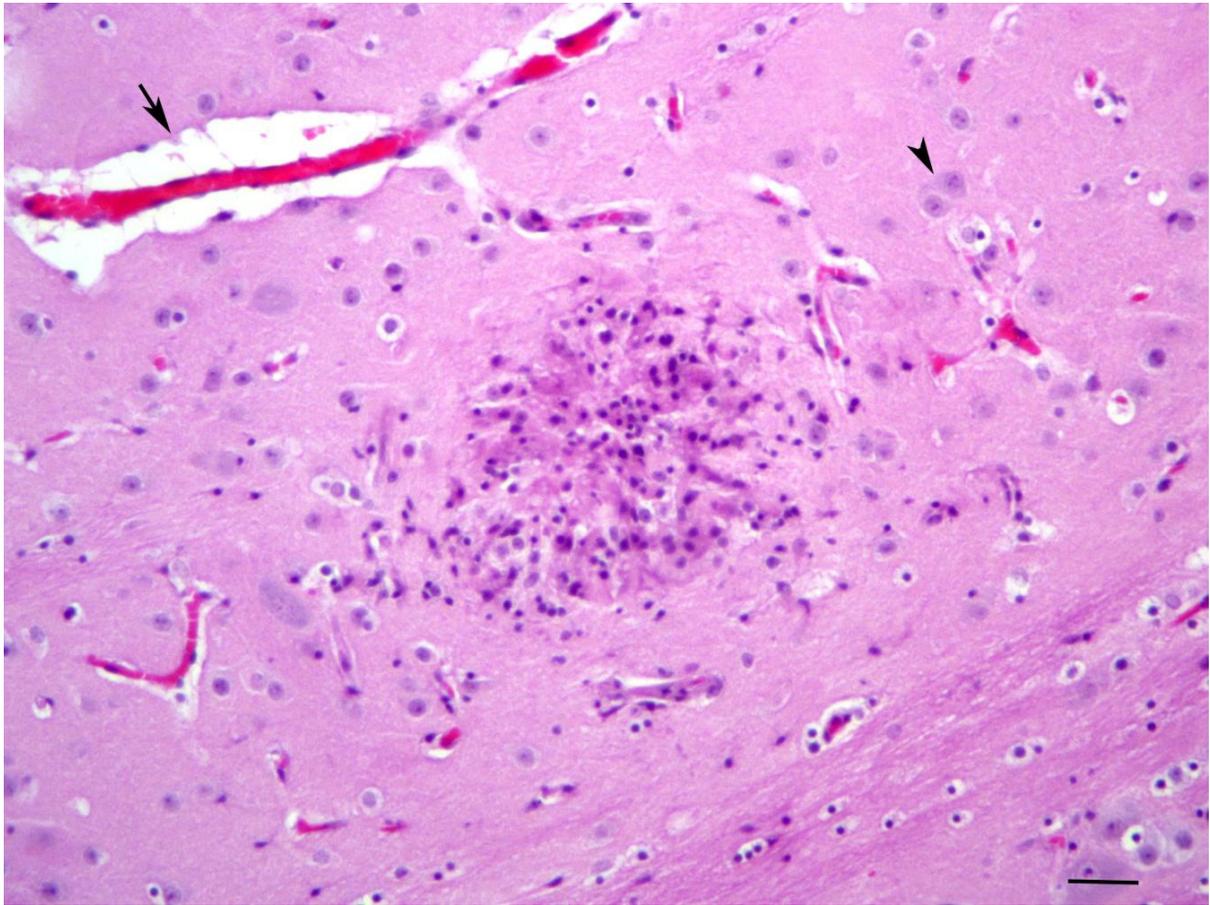


Figura 11. Tinción con Hematoxilina y Eosina de encéfalo de un conejo infectado. Se observan en el centro de la imagen la forma característica de un granuloma. Vaso sanguíneo (flecha), astrocito (cabeza de flecha). (Barra = 10 μ m)

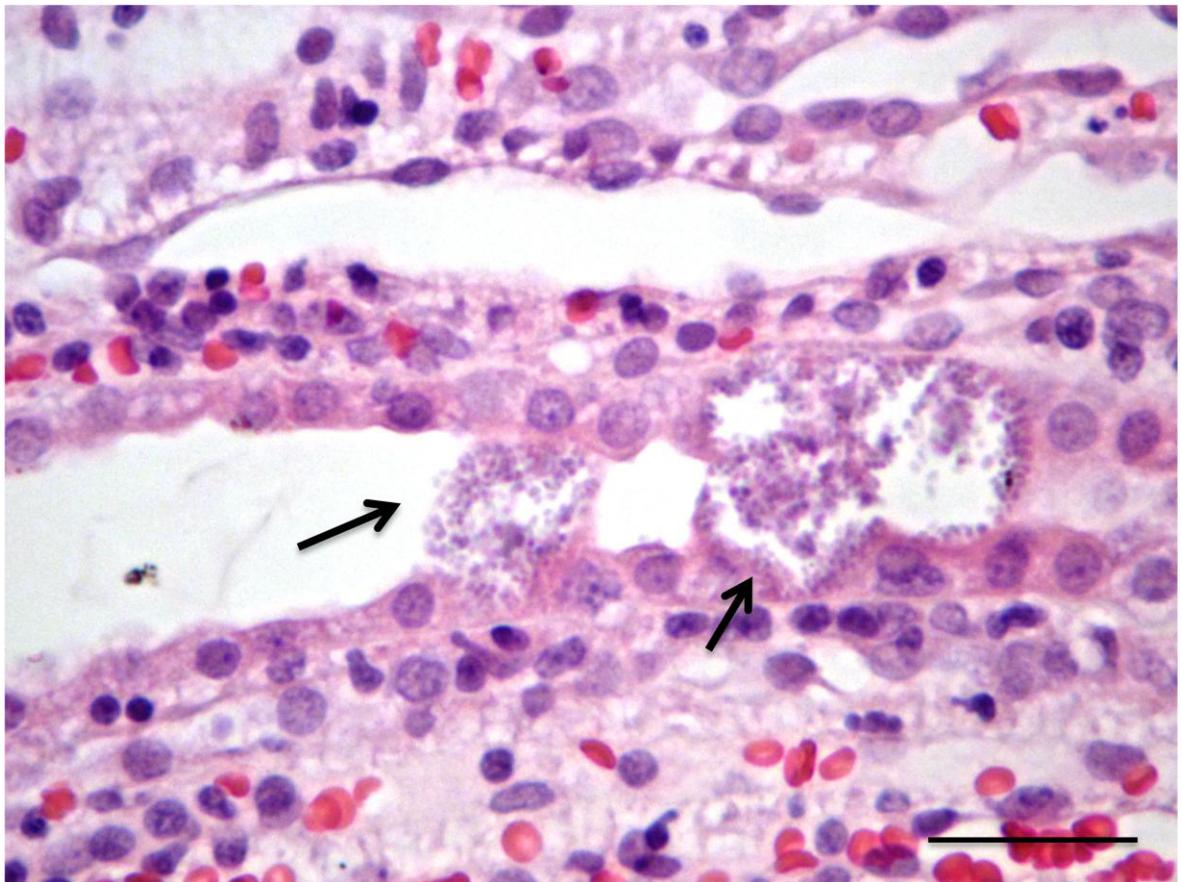


Figura 12. Tinción con Hematoxilina y Eosina de riñón de un conejo infectado. En esta imagen se observan la presencia de xenomas tanto en el lumen como en el epitelio de un túbulo renal (flechas). (Barra = 50 μ m)

4.3. Detección de TNF- α por IHC

Todos los animales del grupo A (infectado) resultaron positivos a la presencia de TNF- α en los granulomas mediante IHC. En el tejido renal se pudo observar una población de células positivas distribuidas de manera dispersa tanto en el granuloma como en el tejido adyacente (Figura 13). Mientras que en el tejido nervioso, la distribución fue mucho más uniforme y más marcada en todo el granuloma (Figura 14). Esto podría ser por la diferencia en el tipo de células que conforman el tejido renal (células endoteliales cuya función es la filtración) en comparación del SNC (neuronas que se ocupan de transmitir y recibir señales), pero cabe mencionar que esto también se observó en el grupo B (infectado con Dexametasona) por lo cual la expresión de la citocina podría ser importante en esta forma de distribución.

En cuanto, a los conejos del grupo B (infectado con Dexametasona), también todos resultaron positivos a TNF- α por IHC, aunque se observó una distribución similar al grupo A en ambos tejidos, esta era mucho más diseminada y las células tuvieron una señal positiva más intensa tanto en los granulomas de encéfalo (Figura 16) y el riñón (Figura 15) al compararlos con el grupo A. La diferencia entre ambos grupos era el tratamiento con Dexametasona.

En contraste, en las muestras de encéfalo y riñón de los animales pertenecientes a los grupos C, aunque tenían una producción mínima de la citocina, no presentaba lesiones granulomatosas en ambos tejidos para comparar las

distribuciones de la marca positiva. Por último, en el grupo D, no se observó ninguna lesión positividad para TNF-a.

En el conteo de células positivas (principalmente macrófagos) que se realizó de los granulomas en el encéfalo y el riñón, no se observó diferencia significativa entre los conejos de los grupos A y B, a pesar que al comparar la media del grupo B (tanto encéfalo como riñón) resultó más elevada en comparación con el grupo A (Figura 17), probablemente ante la diferencia de tratamiento. Pero al evaluar el encéfalo del grupo A con riñón del mismo grupo, se pudo observar un valor mucho más elevado en encéfalo que en riñón; lo cual no sucedió en el caso de grupo B. Por último, no hubo diferencia significativa al evaluar entre sí los grupos C (sano con Dexametasona) y D (control), pero comparar C con A o B, y D con A o B, se pudo observar una diferencia significativa.

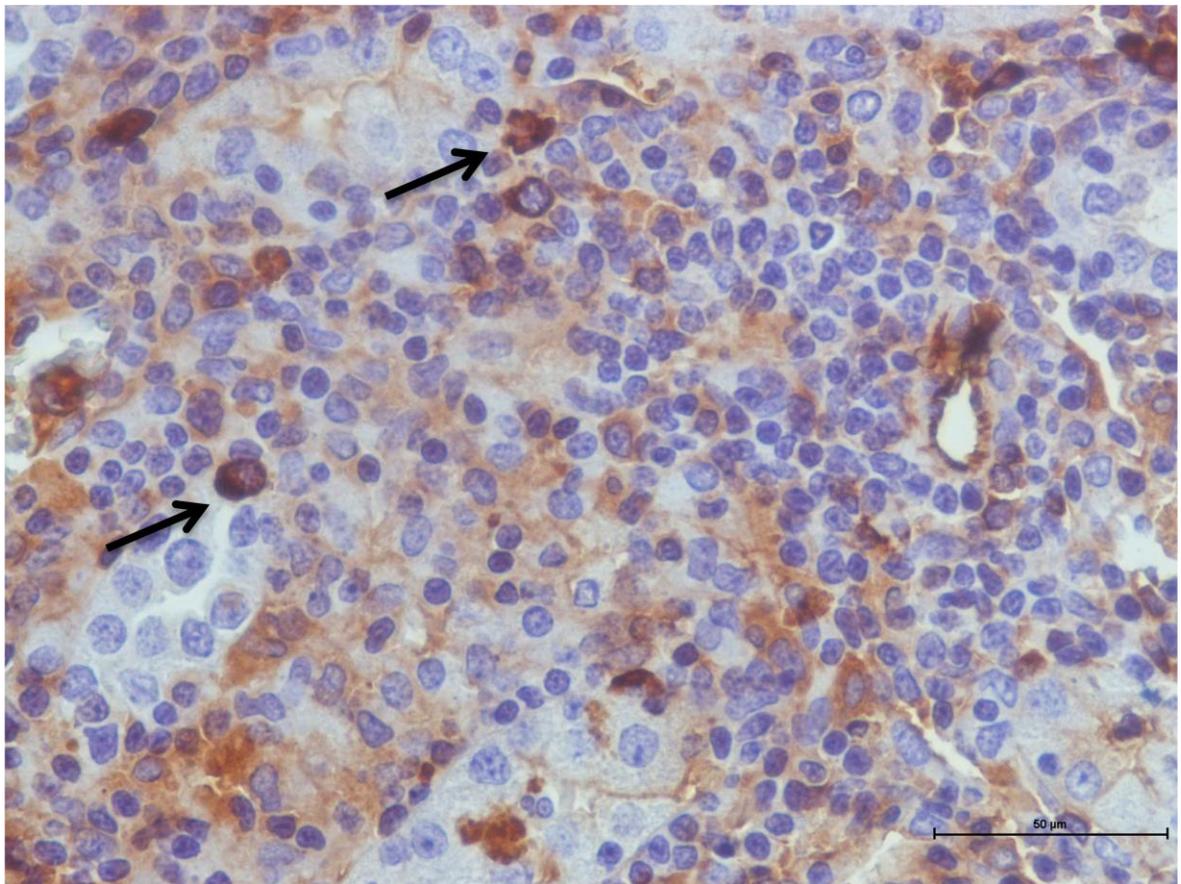


Figura 13. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en riñón de un conejo perteneciente al grupo A. La marca positiva de la célula (flechas) se observan de manera intensa, en todos los niveles del granuloma.

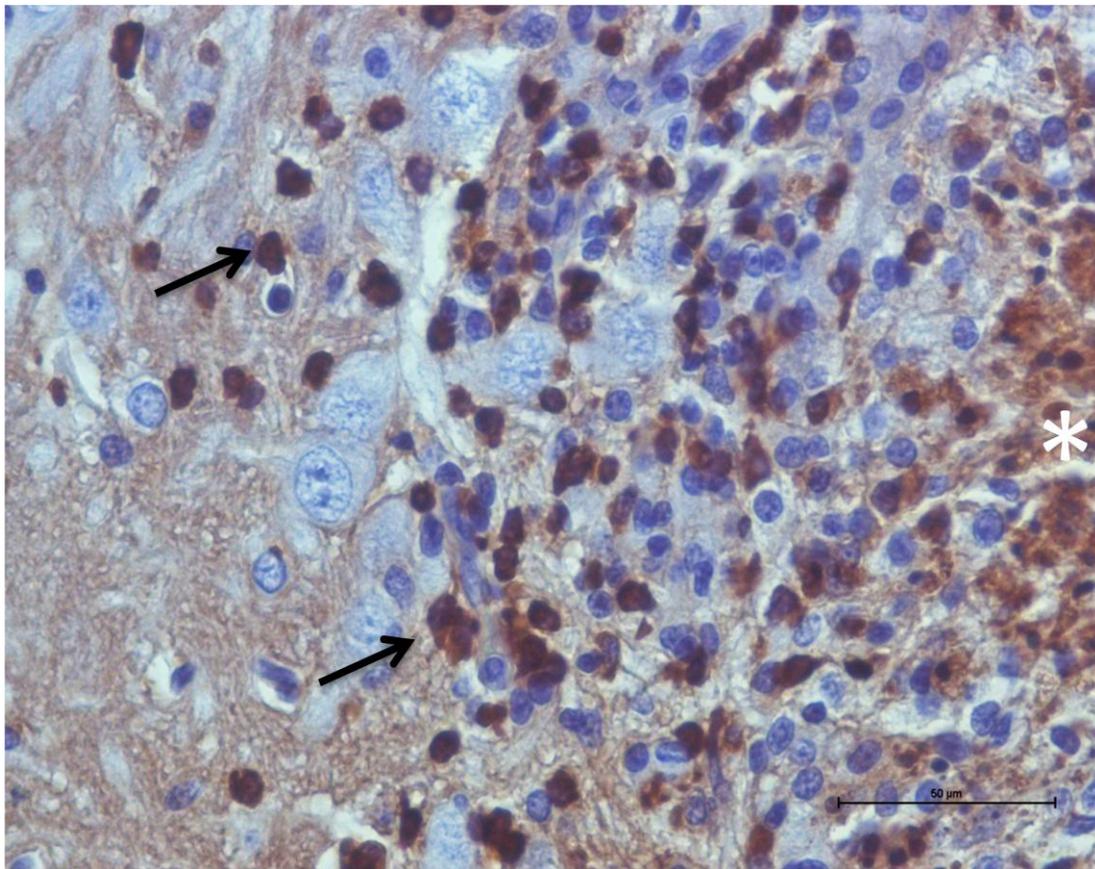


Figura 14. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo A. La marca positiva de las células (flechas) se observan de manera uniforme e intensa en todos los niveles del granuloma.

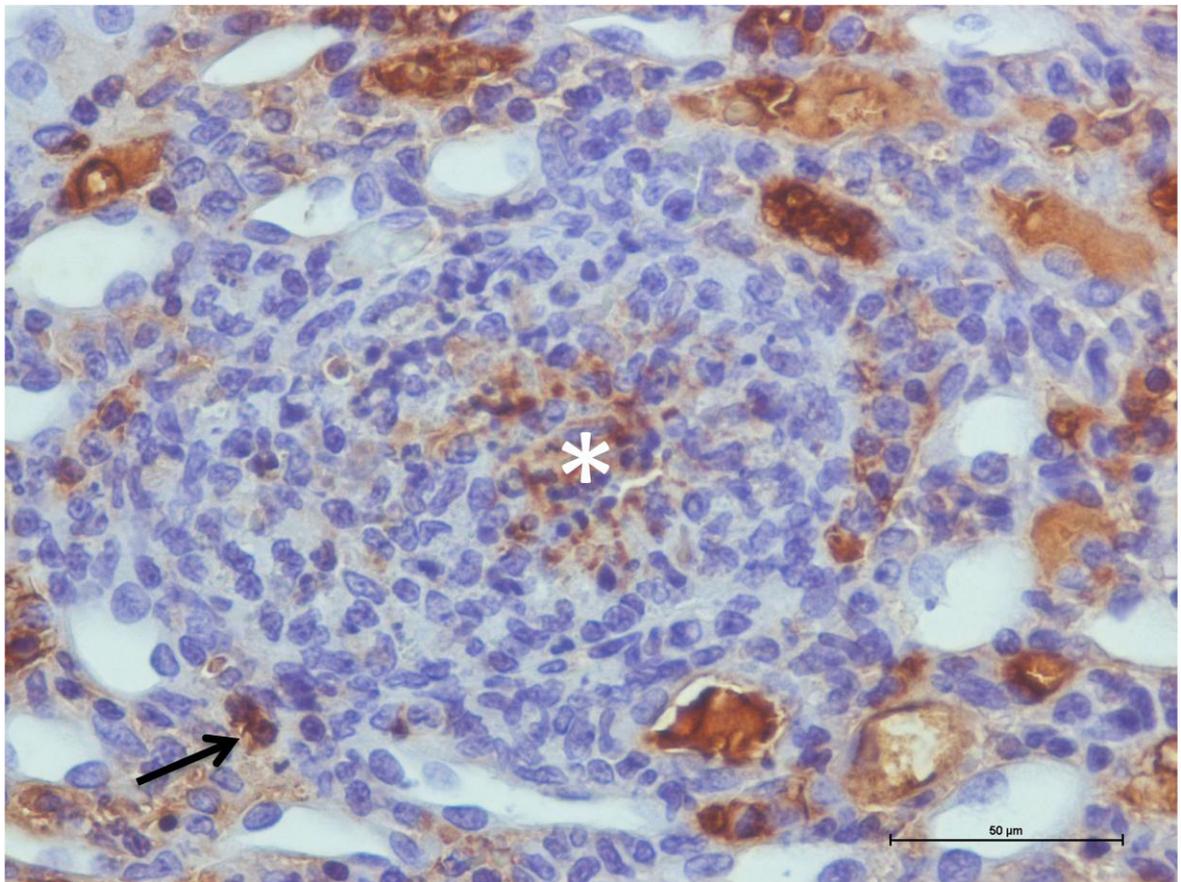


Figura 15. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en riñón de un conejo perteneciente al grupo B. Las células positivas (flechas) se observan en el centro (asterisco) y la periferia del granuloma.

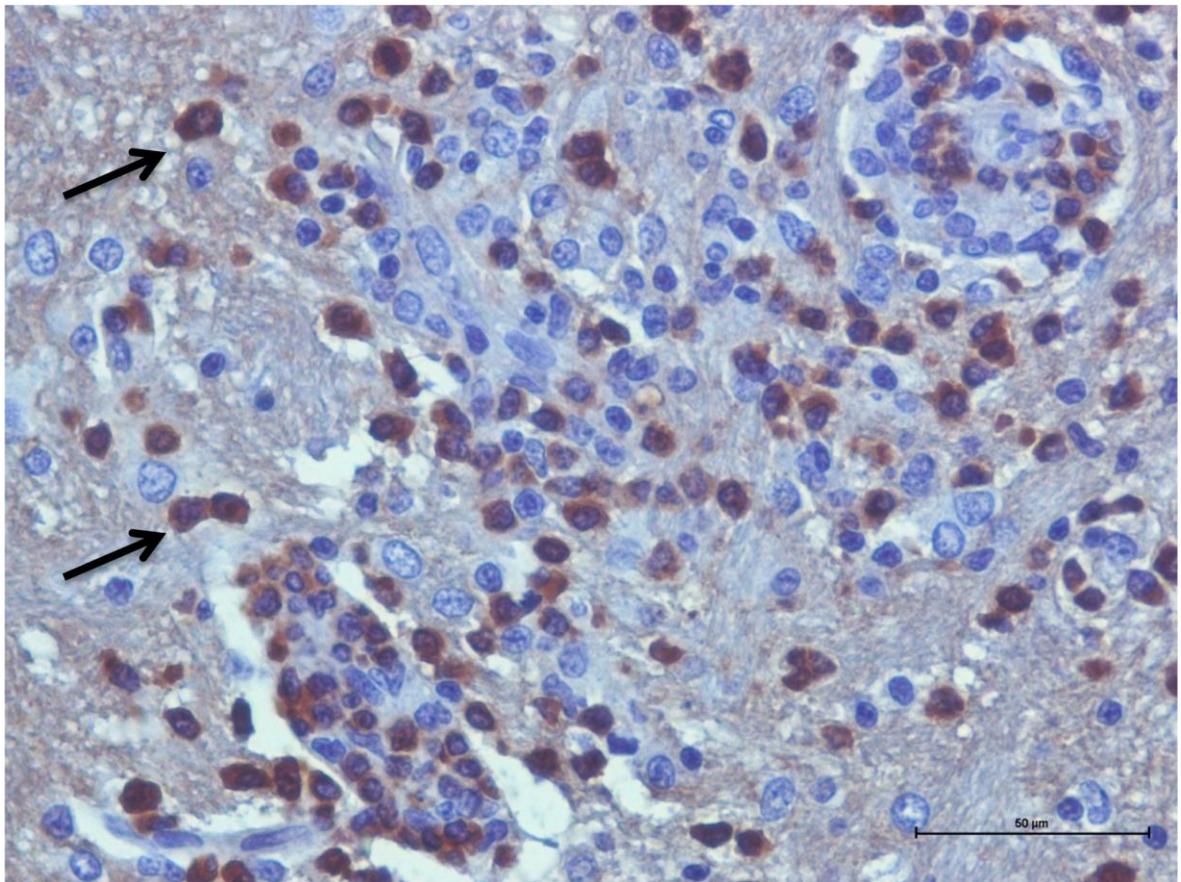


Figura 16. Inmunohistoquímica para la detección de TNF- α en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo B. Las células positivas (flechas) se observa de manera abundante por todo el granuloma, el tejido adyacente y parénquima cerebral.

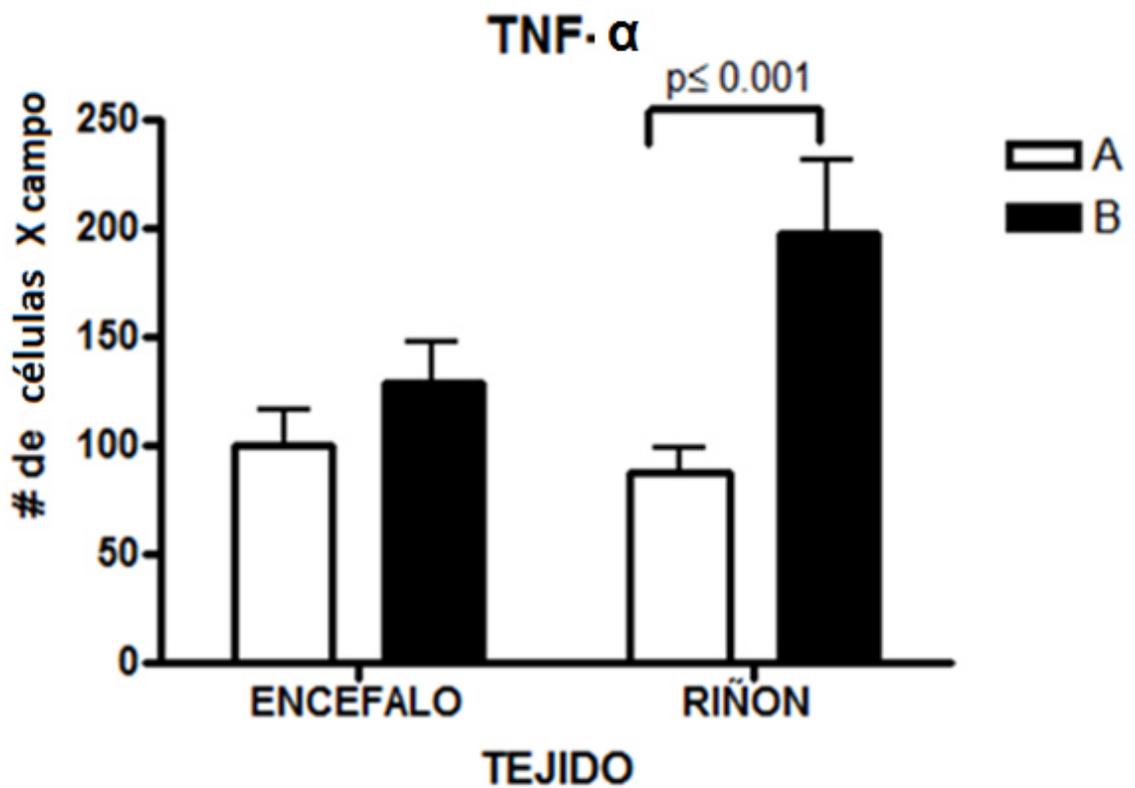


Figura 17. Conteo celular de la marca positiva a la expresión de presencia de TNF- α en encéfalo y riñón de animales infectados con (grupo A) y sin Dexametasona (grupo B). Se puede observar que ambos órganos, las medias representativas del grupo B son más elevadas que el grupo A. También se muestra en el grupo A, un resultado mucho mayor al TNF- α en el encéfalo que el riñón.

4.4. Detección de IL-4 por IHC

Los resultados obtenidos en la detección de IL-4 fueron positivos en los granulomas microsporidianos de todos los animales de los grupos A y B. En el tejido cerebral de los conejos del grupo A (infectados) se observó una señal positiva a IL-4 de manera dispersa tanto en el granuloma como en las meninges (Figura 18). En tejido renal, la señal positiva fue también dispersa en el granuloma y médula de riñón (Figura 19) y en mayor cantidad a compararlo con el encéfalo. Esto probablemente se deba a la acción de la citocina sobre las células.

En los animales del grupo B (infectado con Dexametasona) la señal para IL-4 fue muy intensa y se observó de manera uniforme en la periferia y la parte medial del granuloma en el tejido renal (Figura 20), lo que contrasta con lo observado en el grupo A; y de una manera mucho más dispersa en el tejido nervioso (Figura 21), lo cual es similar a lo visto en el grupo A. Lo cual probablemente se deba más a la presencia de la espora, que al tratamiento.

El grupo C (sano con Dexametasona) a pesar de la producción mínima de IL-4, no presentaba lesiones granulomatosas para comparar, y grupo D (control) no mostró ninguna marca positiva para la IL-4 en los órganos (riñón y encéfalo).

Al comparar el conteo de las células positivas (principalmente mastocitos) a IL-4 de los grupos infectados (A y B) con los resultados de los grupos no infectados (C y D) se observó una diferencia significativa (A con C o D y B con C o D). Sin embargo, al comparar los tratamientos (A con B y C con D) no se observó

diferencia estadística. Aunque las medias representativas del grupo B eran mucho más elevadas que el grupo A (donde había diferencia de tratamiento), y en el riñón sobre salía en ambos grupos (A y B) sobre el encéfalo (Figura 22).

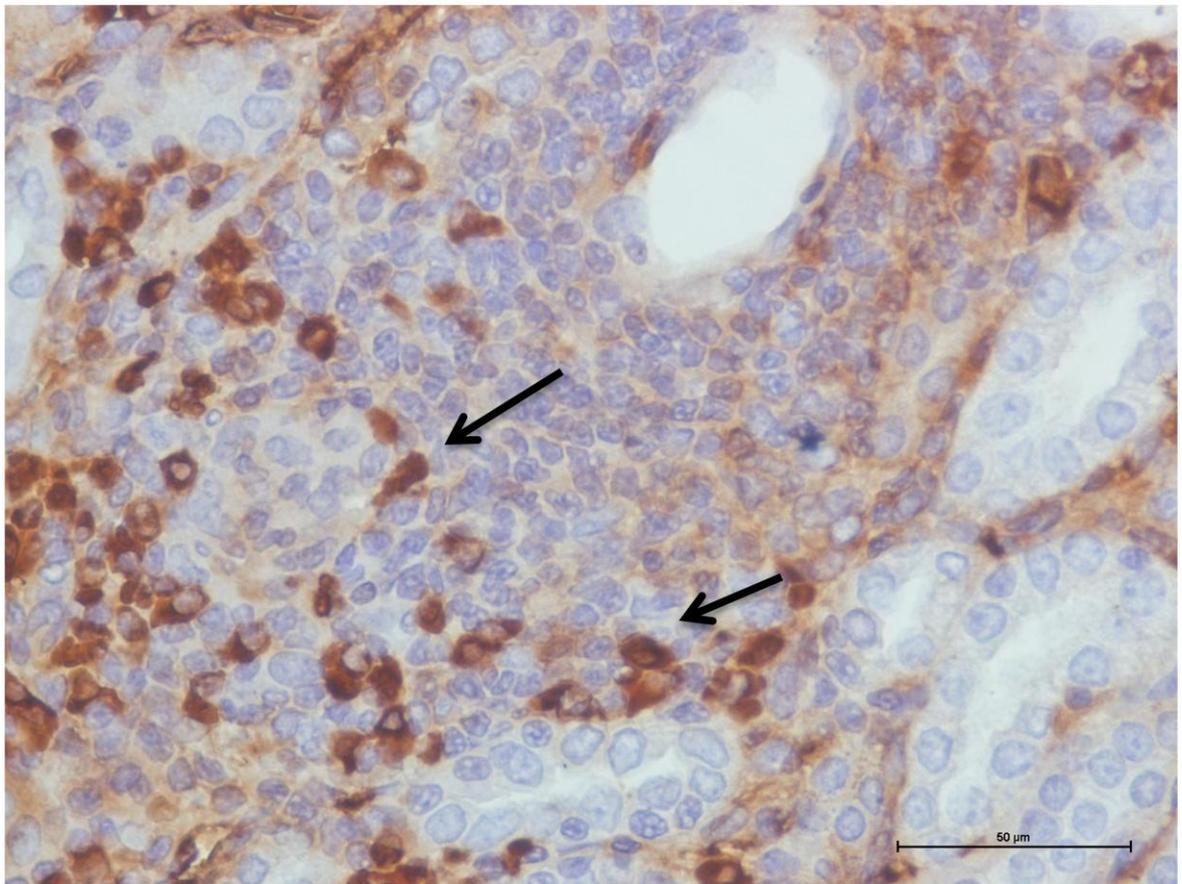


Figura 18. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en riñón de un conejo perteneciente al grupo A. Las células positivas (flechas) se encuentran dispersas en la parte medial y circunferencia del granuloma.

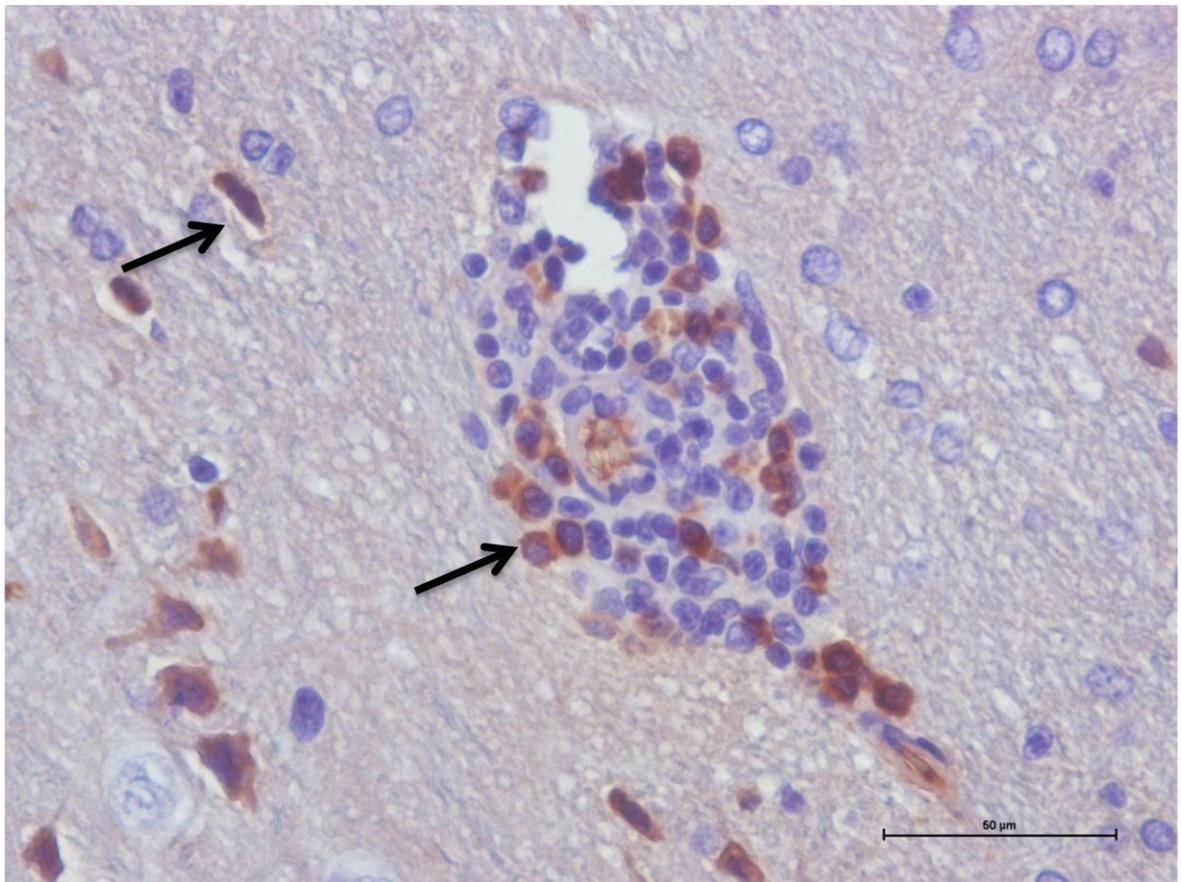


Figura 19. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo A. Las células positivas (flechas) a la citocina se observan de manera numerosa en todo el granuloma.

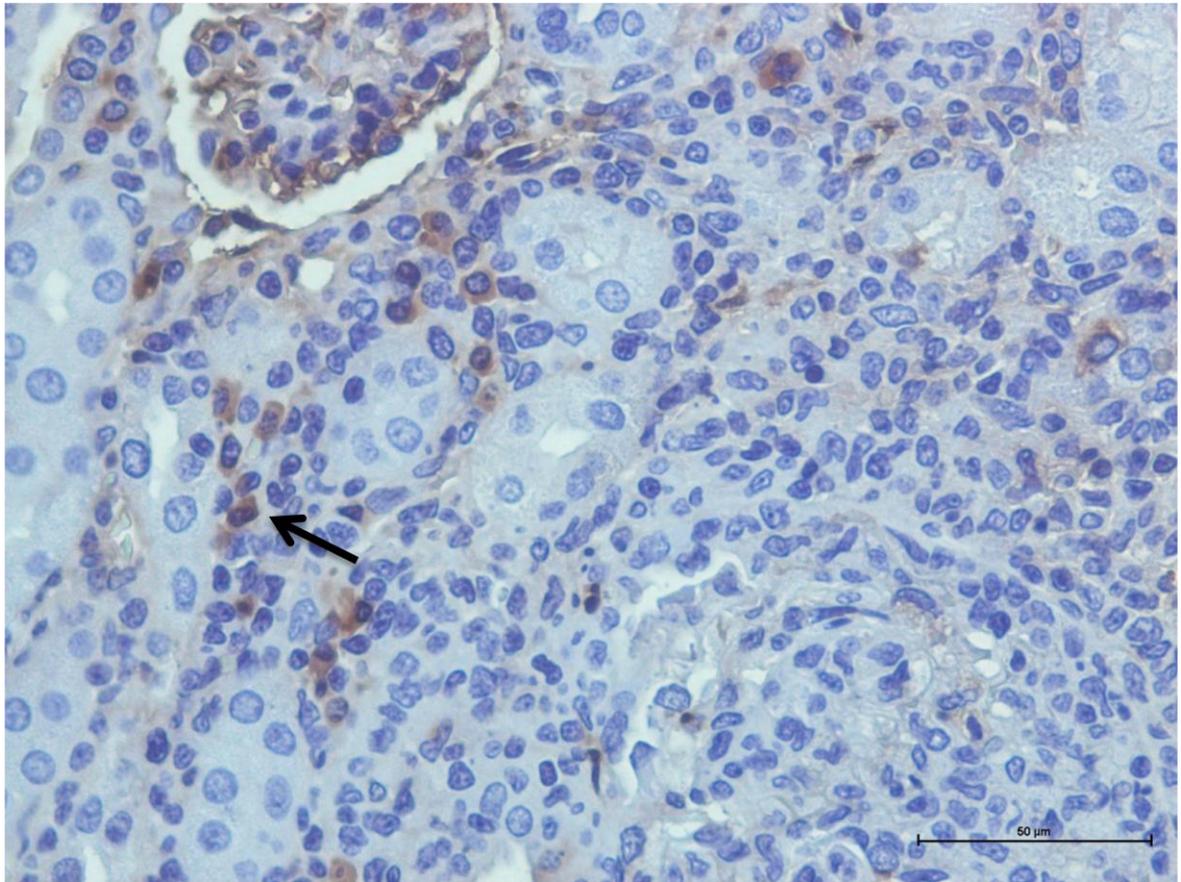


Figura 20. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en riñón de un conejo perteneciente al grupo B. Se observan en la imagen que las células positivas a IL-4 (flecha) se encuentran agrupadas en la parte media y la circunferencia del granuloma, pero nunca en el centro.

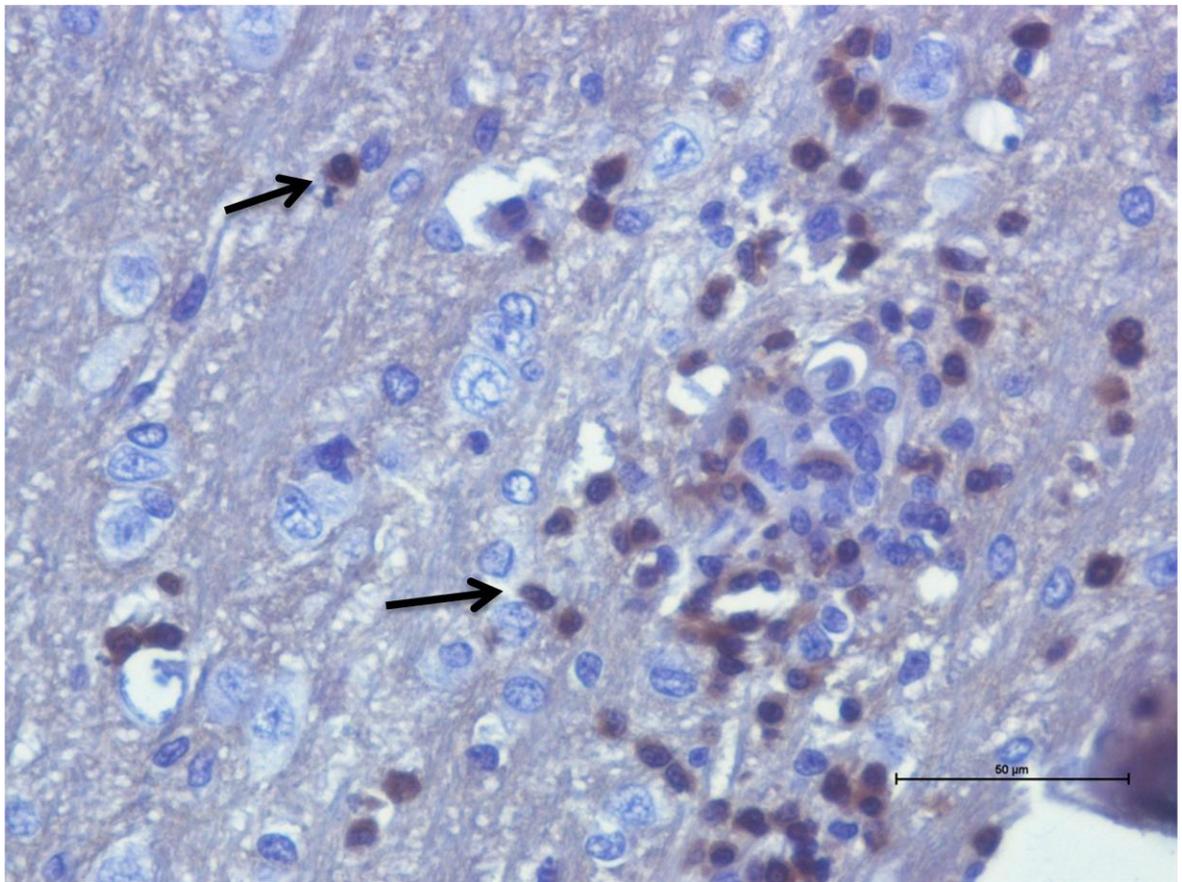


Figura 21. Inmunohistoquímica para la detección de IL-4 en encéfalo de un conejo perteneciente al grupo B. La marca positiva de las células (flechas) se observa en todo el granuloma.

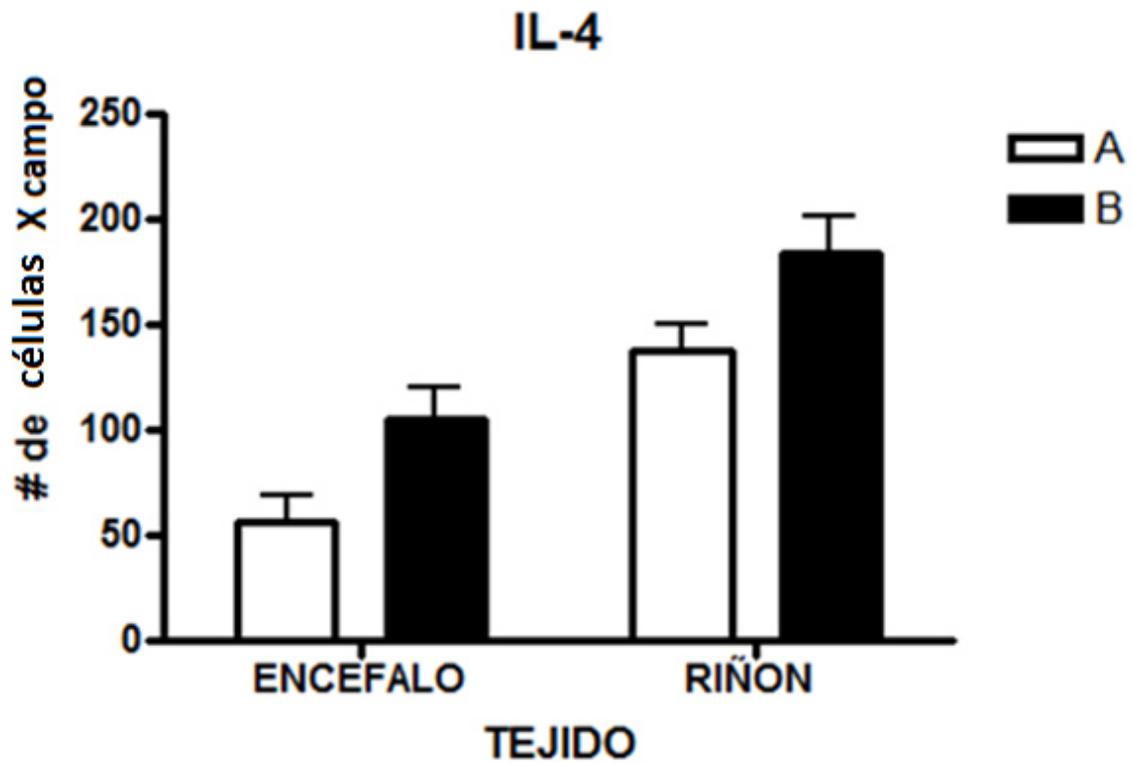


Figura 22. Conteo celular de la marca positiva a la expresión de presencia de IL-4 en encéfalo y riñón de animales infectados con (grupo B) y sin Dexametasona (grupo A). Se puede observar que ambos órganos, las medias representativas del grupo B son más elevadas que el grupo A. También se observa una tendencia mayor a la citocina en el riñón que en el encéfalo, en ambos grupos de animales.

4.5. Biometría Hemática.

Los resultados obtenidos en los análisis de la biometría hemática y diferencial linfocitario (Tabla 3) mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en cuanto a la comparación de medias del conteo de linfocitos y monocitos al comparar todos grupos de diferentes tratamientos con el grupo control D, cuyo valor era mucho mayor con respecto a los demás. Pero sin embargo no se observó diferencia significativa al evaluar estos grupos (A, B, y C) entre sí.

En los resultados del conteo de granulocitos (Tabla 4) se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) al comparar entre sí los grupos experimentales A, C y D, siendo el grupo A con el valor más elevado y D a la baja. Pero lo más relevante se observó al comparar los resultados pertenecientes al B con los grupos C y A, donde no hubo diferencia significativa.

Por último, en lo que refiere a los resultados de hematocrito (Tabla 5) se pudo observar una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) al comparar el grupo A con los grupos experimentales B, C y D. Al evaluar los grupos B, C y D entre sí no se pudo apreciar una diferencia significativa, siendo B el principal valor más elevado.

Tabla 1. Comparaciones de medias de A dentro de B para el conteo de L/M.

AB	Media	0.05	AB	Media	0.05
1.1.	28.260	a	2.2.	41.010	a
2.1.	26.500	a	1.2.	27.530	b
8.927					

*En donde la columna AB, 1.1 representa el grupo experimental B, 2.1 representa el grupo experimental A, 2.2 representa el grupo experimental D y 1.2 representa el grupo experimental C.

Tabla 2. Comparaciones de medias de B dentro de A para el conteo de L/M.

AB	Media	0.05	AB	Media	0.05
1.1.	28.260	a	2.2.	41.010	a
1.2.	27.530	a	2.1.	26.500	b
8.927					

*En donde la columna AB, 1.1 representa el grupo experimental B, 2.1 representa el grupo experimental A, 2.2 representa el grupo experimental D y 1.2 representa el grupo experimental C.

Tabla 3. Comparaciones de medias de A dentro de B para el conteo de granulocitos.

AB	Media	0.05	AB	Media	0.05
2.1.	73.510	a	1.2.	57.890	a
1.1.	69.460	a	2.2.	44.130	b
		11.991			

*En donde la columna AB, 1.1 representa el grupo experimental B, 2.1 representa el grupo experimental A, 2.2 representa el grupo experimental D y 1.2 representa el grupo experimental C.

Tabla 4. Comparaciones de medias de B dentro de A para el conteo de granulocitos.

AB	Media	0.05	AB	Media	0.05
1.1.	69.460	a	2.2.	44.140	a
1.2.	57.890	a	2.1.	73.510	b
		11.991			

*En donde la columna AB, 1.1 representa el grupo experimental B, 2.1 representa el grupo experimental A, 2.2 representa el grupo experimental D y 1.2 representa el grupo experimental C.

Tabla 5. Comparaciones de medias de A dentro de B para el conteo de hematocrito.

AB	Media	0.05	AB	Media	0.05
1.1.	39.590	a	2.2.	39.390	a
2.1.	32.720	b	1.2.	35.540	a
4.558					

*En donde la columna AB, 1.1 representa el grupo experimental B, 2.1 representa el grupo experimental A, 2.2 representa el grupo experimental D y 1.2 representa el grupo experimental C.

Tabla 6. Comparaciones de medias de B dentro de A para el conteo de hematocrito.

AB	Media	0.05	AB	Media	0.05
1.1.	39.590	a	2.2.	39.390	a
1.2.	35.540	a	2.1.	32.720	b
4.558					

*En donde la columna AB, 1.1 representa el grupo experimental B, 2.1 representa el grupo experimental A, 2.2 representa el grupo experimental D y 1.2 representa el grupo experimental C.

5. Discusión

El Ec es un parásito intracelular zoonótico y oportunista que se ha encontrado en una gran variedad de mamíferos tanto domésticos como salvajes, aunque su ciclo biológico, así como la respuesta inmune que genera ha sido estudiado principalmente en modelos murinos.^{55, 56} Sin embargo, el ratón no es el hospedero definitivo de este microorganismo, y la información obtenida sobre la acción de los diferentes factores de la respuesta inmune pueden estar limitada y deben tomarse con ciertas reservas.⁵

Esta enfermedad provoca principalmente una meningoencefalitis y nefritis intersticial (aunado a otros daños patológicos) debido a la respuesta inmune exagerada en los tejidos infectados, en este caso en el SNC y el riñón, lo que conlleva a la formación de un granuloma. Para entender los factores inmunológicos que pueden intervenir o afectar la formación de los granulomas (las citocinas TNF- α e IL-4), en este trabajo fue necesaria la comparación de la respuesta inmune en animales inmunocompetes con inmunosuprimidos.

La utilización de los conejos inmunosuprimidos (grupos B y C) ayudaron a una mejor comprensión de los mecanismos de la respuesta inmune que soportan a la formación del granuloma al ser comparado con animales aparentemente sanos (grupo D) o aquellos cuyo sistema inmune actúa naturalmente contra el parásito (grupo A). Esta inmunosupresión sería un equivalente al estrés por la cual podría

sufrir el animal debido a diferentes factores, tales como el manejo o la administración de medicamentos.

En este estudio, la administración de la Dexametasona permitió comprometer el sistema inmune de los conejos y poder realizar la comparación entre el efecto que tenía este glucocorticoide y la presencia de la espora de *Ec*, evaluándolo principalmente por medio de los conteos de hematocrito, granulocitos, linfocitos y monocitos de los diferente grupos experimentales.

Se ha señalado que la administración de Dexametasona tiene utilidad en el tratamiento contra enfermedades de las articulaciones, estados alérgicos y otras enfermedades;⁶³ pero es reconocido que este tratamiento suele ser peligroso al administrarse en conejos infectados con *Ec*.⁵² Se sabe que en seres humanos y otros hospedadores intermediarios los daños provocados por este microorganismo pueden ser graves, especialmente a individuos inmunosuprimidos;⁷ en el presente estudio se pudo observar que a pesar del efecto notorio sobre el sistema inmune que tenía la Dexametasona en los animales a los cuales se administró este glucocorticoide (grupo B y C), también se observó que el microsporidio tenía efectos inmuno-moduladores ante resultados altos en el conteo de granulocitos de los grupo A y B, siendo el grupo A el más elevado de todos los grupos.

Los conejos al coexistir con este patógeno pudieron haber desarrollado una especie de resistencia o un equilibrio, donde la infección se mantenía controlada tanto por la modulación del sistema inmune por parte de la espora, como por el

mismo organismo del animal al producir los mecanismos de defensas para retenerla, por ejemplo el granuloma.

En base a los resultados obtenidos en los análisis para la detección de las esporas (tinciones en heces y orina, IFA, IHC, HE en tejido y CIA) que se realizaron con el propósito de identificar a los animales positivos, éstos se clasificaron en los diferentes grupos necesarios para el modelo experimental.

Entre las observaciones que se podría mencionar de estos resultados, fue la dificultad de detectar la espora en muestras de orina en las dos tinciones realizada (Calcofluor White y Tricrómo) en ambos grupos de conejos infectados (A y B). Esto podría deberse a la diferencias en los tiempos en que se infectó con la espora cada uno de los conejos. Dependiendo del tipo de infección (aguda o crónica), el tiempo en que la espora de *Ec* coloniza el SNC, hígado, riñones, etc. hasta a la formación del daño patológico, que este puede ser muy amplio (entre 3 a 5 semanas) como lo menciona Harcourt-Brown (2004).⁶

La tinción de HE, además de permitir el diagnóstico positivo de la presencia de la espora de *Ec* en el tejido renal y el SNC, también contribuyó a la observación de los daños patológicos y la elección mejores campos en los mejores corte histológicos con la mayor cantidad y calidad de granulomas. En cuanto a lo que se observó el daño al tejido, los animales pertenecientes a los grupos infectados (grupo A y B) mostraron la patología característica para en el SNC y tejido renal: una meningoencefalitis granulomatosa focal y multifocal en el encéfalo; y severa

respuesta inflamatoria granulomatosa focal y multifocal con infiltración linfocítica y necrosis en el riñón, respectivamente, como lo menciona Kunzel *et al.* (2010) y Csokai *et al.* (2008).^{31, 32} Mientras que los conejos de los grupos C y D, no mostraban ninguna de estas lesiones. Pero cabe mencionar, que las lesiones observadas en los animales del grupo B (infectado con Dexametasona) eran mucho más agresivas que lo observado en el grupo A (infección natural). También fueron estos animales del grupo B, aquellos con los valores más altos en hematocrito y con un conteo de granulocitos muy similar al grupo A y C. Lo que podría sugerir que la respuesta inmune exagerada del grupo B (reclutación de células y la formación de granulomas) se deba a los efectos que tienen tanto la Dexametasona como la espora *Ec* sobre el control de la modulación del sistema inmune.

Estos resultados no solo sugieren que la espora de *Ec* en sí tiene un efecto modulador del sistema inmune del hospedador, sino que también la Dexametasona pueda tener un efecto estimulador del sistema inmune en el conejo. Cabe mencionar que en el trabajo Jeklova (2008) se manifestaron efectos secundarios en los conejos ante la administración de la Dexametasona, tales como úlceras y hemorragias, desbalance hormonal y aumento en el riesgo de infecciones parasitarias;⁵³ además la terapia con esteroides está contraindicada debido a sus efectos inmunosupresores importantes y su eficacia limitada para mejorar el resultado supervivencia de los conejos o en la reducción de los signos clínicos neurológicos como lo menciona Latney *et al.* (2014).⁷⁷

Por lo cual es importante señalar, que a pesar de las lesiones que se observaron tanto en encéfalo como en riñones, macroscópicamente al observarlos a la necropsia o microscópicamente con tinción de HE; la mayoría de los conejos de los grupos infectados e inmunosuprimidos (A y B) mostraron poca signología característica ante una infección por Ec, a pesar del diagnóstico positivo de la presencia de la espora con tinciones en heces y orina, como por serología, IFA e IHC de tejidos, estos animales mostraron un comportamiento normal o similar a los conejos del grupos C y D, que no presentaron lesiones patológicas atribuibles a Ec. El utilizar un plazo de 21-24 días probablemente no es el suficiente tiempo para que se lleve a cabo un denotado daño sistémico ocasionado por la presencia del parásito. Pero como se ha mencionado anteriormente, se ha documentado que los conejos poseen un delicado equilibrio al coexistir con esta espora,⁶² siendo la seguramente la principal razón de lo observado en este trabajo.

Una vez diseñado la formación de los grupos experimentales, los posteriores exámenes para el diagnóstico positivo o negativo, según el caso en los grupos de animales y la selección los mejores campos en los cortes histológicos de riñón y encéfalo donde se observaron claramente los granulomas, se llevó a cabo la IHC para la detección de las citocinas (TNF- α e IL-4), siendo el objetivo principal para este estudio.

El TNF- α es una citocina que cumple diferentes funciones fundamentales para el organismo. Es una de las principales citocinas que forma parte normal del microambiente de un granuloma de tipo Th1.⁴² Este tipo de granuloma se ha

identificado como una reacción de la respuesta de tipo Th1 contra la presencia del Ec en el hospedador.⁵⁸

Mediante la técnica de IHC se pudo observar la presencia TNF- α en todos los granulomas perteneciente a los conejos del grupo A (infectados naturalmente), granulomas del grupo B (infectados con Dexametasona), e igualmente se revisó en el tejido de los animales de los grupos C y D a pesar de no presentar las lesiones características generadas por el Ec. Estos resultados soportan lo estipulado por Zumla *et al.* (1996) en su clasificación y etología de granulomas infecciosos, sobre lo esencial que es la presencia TNF- α en la formación, el desarrollo y mantenimiento del granuloma, y en los trabajos de Saunders *et al.* (2007) sobre la inmuno-patología de la tuberculosis granulomatosa, donde también se ha confirmado la presencia de esta citocina en estos tipos de granulomas.^{41, 42}

Lo que se conoce principalmente de la acción del TNF- α dentro del granuloma como respuesta a un agente infeccioso ha sido mejor documentado en infecciones por *M. tuberculosis*, donde esta citocina es un importante señalizador para macrófagos.⁶⁰ El granuloma tuberculoso está compuesto de macrófagos, células gigantes multinucleadas células CD4⁺, CD8⁺, células B, neutrófilos y fibroblastos. Con frecuencia los granulomas tuberculosos, tienen un centro necrótico y caseoso.⁵⁹

Algunas de estas características fueron observables en varios de los granulomas en el encéfalo de los animales infectados con Ec (grupo A), donde la tinción positiva fue más diseminada e intensa, y abarcaba hasta el parénquima cerebral. Cabe mencionar que estos animales fueron aquellos que pasaron por la infección natural sin administrarles la Dexametasona y cuyo conteo de granulocitos fue el más alto. En los granulomas de encéfalo de este grupo de animales había una mayor cantidad de células positivas a TNF- α en comparación del riñón y fueron los únicos que llegaron a mostrar (no en todos los casos) un centro necrótico en el granuloma.

Esto puede indicar que la acción que posee el TNF- α en la formación, reclutamiento de células, mantenimiento del granuloma pro-inflamatorio en el encéfalo por la presencia de Ec (en infección natural), puede ser similar a lo visto en infecciones por *M. tuberculosis* en el pulmón.

Otro detalle que se observó tanto en encéfalo de los animales de los grupos A y B, era la presencia del TNF- α en células del tejido adyacente a granulomas muy cercanos a vasos sanguíneos. Esto podría deberse a la interacción que se ha documentado entre esta citocina y la molécula de adhesión ICAM-1, la cual es principalmente regulada por la TNF- α .⁶¹ La expresión de moléculas de adhesión, puede ser la señal primaria para la activación y la extravasación de las células inmunes en un sitio granulomatoso. Curiosamente, ICAM-1 puede ser reguladas en varios tipos de células del estroma, tales como el endotelio y el epitelio,⁶¹ lo

cual explicaría los resultados observado en el tejido adyacente a los granulomas de los animales infectados Ec (grupos A y B).

En cuanto a los animales del grupo B, no se observó la misma organización de las células a comparación del grupo A, el daño del tejido era mucho más extensivo y en el conteo de las células los valores obtenidos en riñón y encéfalo del grupo B con ambas citocinas, era superiores a lo obtenido del grupo A. Cabe mencionar que eran estos conejos aquellos que se les administró la Dexametasona y también tenían la presencia de la espora. Estos resultados demuestran de nuevo los efectos tanto del glucocorticoide y del Ec para modular el sistema inmune, algo que también se observó en el conteo de granulocitos (similar al grupo A y C) y hematocrito (parecido al grupo C). Solo el conteo de linfocitos, el grupo control D era aquel con el valor superior, pero nuevamente A, B y C mostraban similitudes en sus valores. Esto da a suponer que la Dexametasona es la responsables del efecto exagerado en la acción de los granulocitos, los valores mayores de las citocinas (TNF- α e IL-4) en ambos órganos a comparación del grupos A y el daño extenso en el tejido a causa de los granulomas en el intento del organismo de contener al Ec.

Los riñones y encéfalo de los conejos de los grupos C (no infectados con Dexametasona) y D (control) no presentaban granulomas o daño patológico relacionado con Ec, por lo cual no había expresión de TNF- α en granulomas para comparar con los demás grupos.

En este estudio, también se pudo comprobar la presencia de la IL-4 en los granulomas de animales positivos a la infección con Ec, tanto en el grupo A como B, y su presencia en el tejido de los grupos C y D. La IL-4 es una citocina que funciona como un potente regulador de la inmunidad y es secretada principalmente por los mastocitos, células de la respuesta Th2, eosinófilos, linfocitos T y basófilos. La IL-4, es la citocina dominante y responsable del fenotipo Th2 de los granulomas.⁶⁵

Mediante la IHC se observó en los granulomas de los animales positivos a Ec (tanto animales del grupo A y B), donde la tinción positiva de IL-4 era mucho más intensa y agrupada generalmente en la periferia y porción media de la congregación de células a diferencia de los observado en los resultados obtenidos con TNF- α , que se encontraba a todos los niveles del granuloma. Esto podría ser al proceso de formación del granuloma, donde la TNF- α es una de las citocinas crítica en la activación y en la agrupación de células, para que después su expresión sea controlada por citocinas antiinflamatorias como la IL-4,⁶⁴ y por ello que se observa más en la periferia o la parte media y rara vez en el centro del granuloma, donde el caso del encéfalo del grupo A (la infección natural) se observó con más frecuencia el centro necrótico y una mayor cantidad de TNF- α .

La citocina IL-4 mostró valores muchos mayores en el conteo de células en el riñón en comparación a lo visto con TNF- α en el grupo A (conejos infectado naturalmente). Cabe mencionar que estructuralmente y visualmente, los granulomas del riñón poseían características o similitudes a granulomas Th2;

como ya se ha mencionado con anterioridad, la citocina IL-4 es responsable del fenotipo Th2 de los granulomas y probablemente a esto se deba a lo observado en HE. Fue solo en el encéfalo del grupo A donde la TNF- α superó los valores de la IL-4.

Mientras que en el grupo B (conejos infectados y con Dexametasona) se observó una mayor cantidad de esta citocina a comparación del grupo A, pero los niveles exagerados de IL-4 en el grupo B eran consistentes con la presencia de TNF- α . Esto podría deberse al efecto antiinflamatorio de la IL-4 al ser expresado poco después de un estímulo inflamatorio, y generando una regulación negativa en la producción de citocinas inflamatorias tales como TNF- α como menciona Fenhalls *et al.* (2002) en su investigación.⁶⁴ Y al haber una producción exagerada de TNF- α debido a los efectos ocasionados por la Dexametasona (tratamiento del grupo), que en el caso de este estudio en el conejo no mostró efectos supresores del sistema inmune, probablemente el organismo trata de modular o regular esta citocina con una producción similar de IL-4.

Esto se ha observado con mayor detenimiento en tratamientos contra la producción excesiva de TNF- α en el SNC en modelos murinos, donde el TNF- α tiene efectos altamente negativos el comportamiento cognitivo, caracterizado por una enfermedad, depresión y estrés; lo cual demuestra el papel fundamental y beneficioso de la IL-4 en células T, en la cognición y la homeostasis cerebral en ratones al controlar los niveles de la TNF- α .⁴⁹

En los granulomas pertenecientes a encéfalo de animales infectados (grupo A y B), se pudo observar la marca positiva a IL-4 uniforme, numerosa y en las meninges, lo que no se observó con TNF- α . Se podría mencionar que esto se debe a que células T en las meninges se activan por un mecanismo (aún desconocido) que conlleva a la producción de la IL-4, la cual sesga a los macrófagos M2 de las meninges. Además se sabe la IL-4 afecta a los astrocitos, microglia y neuronas, aunque el proceso aún no está claro, ya que se carece de datos para describir de forma concluyente esta respuesta⁴⁹ pero se conoce que esta acción soporta el control y la disminución de la respuesta pro-inflamatoria que puede tener TNF- α y otras citocinas en la formación y mantenimiento del granuloma.

Al igual que la TNF- α , los grupos C y D que no contaban con granulomas no se pudieron comparar la presencia de la IL-4 en esta lesión característica de la infección por Ec, pero si estaba presente esta citocina normalmente en el tejido.

6. Conclusión

Este estudio permitió conocer el complejo equilibrio que existe entre la respuesta inmune, la presencia de las citocinas TNF- α e IL-4 en granulomas de conejo infectados naturalmente contra Ec. Los animales pertenecientes al grupo A de la infección natural demostraron la respuesta del organismo y sistema inmune contra este agente parasitario, donde los granulomas del encéfalo mostraron características pro-inflamatorias y en el riñón, antiinflamatorias. Los conejos del grupo B (infectado con Dexametasona) manifestaron los efectos negativos que puede tener la administración de un glucocorticoide como la Dexametasona en el control del sistema inmune en estos animales; aunque inicialmente se esperaban efectos supresores, lo que se observó en los resultados fue un desequilibrio de la respuesta inmune, resultando en una producción alta de las citocinas, pero igualmente se pudo observar como el organismo contrarresta la producción desmedida de TNF- α con una producción similar de IL-4. Esto demuestra la importancia de las citocinas pro y antiinflamatorias para un control del sistema inmune y la formación de los granulomas. Los grupos C y D fueron clave para la comparación de los tratamientos, ayudando a definir cuál hallazgo tenía mayor efecto sobre la respuesta inmune, la Dexametasona o la presencia de la espora. A pesar de que se comprobó de los efectos inmuno-moduladores de la espora de Ec, la Dexametasona ocasiona un cambio crítico en el control y respuesta inmune en conejos. Por último, para comprender a mayor medida la completa producción, organización y formación de estos granulomas en conejos orquestados por estas citocinas, se requiere una evaluación más completa paso a paso del crecimiento

del granuloma en diferentes periodos de tiempo, ya que este estudio solo se enfocó en un momento específico durante la infección. Toda la información obtenida en esta investigación será parte crucial para entender el delicado equilibrio que existe entre el Ec y su hospedero definitivo y proporciona la base para estudios posteriores en la evaluación de estas citocinas pro y antiinflamatorias.

7. Referencias

1. Franzen, C. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitologica*; 2005. 52: p. 36-40.
2. Lonardi, C., Grilli G., Ferrazzi V., Dal Cin M., Rigolin D., Piccirillo A. Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in commercially reared rabbit does in Northern Italy. *Research in Veterinary*; 2012. 94: p. 295–298.
3. Keeling, P.J., McFadden, G.I. Origins of microsporidia. *Trends in Microbiology*; 1998. 6(1): p. 19-23.
4. Harcourt-Brown, F. *Encephalitozoon cuniculi* in Rabbits: The Mystery Disease. AAVAC-UEP; 2010: p. 1-9.
5. Rich, G. Clinical Update on Testing Modalities for *Encephalitozoon cuniculi* in Clinically Sick Rabbits *Topics in Medicine and Surgery*; 2010. 19: p. 226–230.
6. Harcourt-Brown, F.M. *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*; 2004. 13: p. 86-93.
7. Mathews, A., Hotard A., Hale-Donze H. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes and Infection*; 2009. 11(12): p. 905-911.
8. Rodríguez Ramírez, H.G., Rodríguez Tovar L.E., Nava Y.V., Nevárez Garza A. M., Ramírez Romero R. Using a quick dye for the diagnosis of microsporidiosis. *Vet. Méx*; 2011. 42: p. 179-185.

9. Salát, J., Braunfuchsová P., Kopecký J. Experimental infection of immunocompetent and immunodeficient mice with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitologica*; 2001. 48: p. 249-254.
10. Braunfuchsová, P., Kopecký J., Ditrich O., BKoudela B. Cytokine response to infection with the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitologica*; 1999. 46: p. 91-95.
11. Didier, E.S., Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunology*; 1995. 17(8): p. 405–412.
12. Khan, I.A., Moretto M., Weiss L. M. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection*; 2001. 3(5): p. 401-405.
13. Franzen, C., P. Hartmann, Salzberger B. Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Experimental Parasitology*; 2005. 109(1): p. 1-6.
14. Lainson, R., P. C. C. Garnham, R. Killick-Kendrick, and R. G. Bird. *Nosematosis*, a microsporidial infection of rodents and other animals, including man. *Br. Med J*; 1964. 2: p. 470–472.
15. Flatt, R. E. and S. J. Jackson. Renal *nosematosis* in young rabbits. *Pathol. Vet*; 1970. 7: p. 492–497.
16. Testoni, F. J. *Enzootic renal nosematosis* in laboratory rabbits. *Aust. Vet. J*; 1974. 50: p. 159–163.
17. Lobo M. L., Xiao L., Antunes F., Matos O. Microsporidia as emerging pathogens and the implication for public health: A 10-year study on HIV-positive and -negative patients. *Int J Parasitol*; 2012. 42: p. 197-205.

18. Ashton N., Wirasinha P. A. Encephalitozoonosis (Nosematosis) of the cornea. *Brit J Ophtal*; 1973. 57: p. 674.
19. Galvan A. L., Sanchez A. M., Valentin M. A., Henriques-Gil N., Izquierdo F., Fenoy S., del Aguila C. First cases of microsporidiosis in transplant recipients in Spain and review of the literature. *J Clin Microbiol*; 2011. 49: p. 1301-1306.
20. Didier E. S. Immunology of microsporidiosis. *Contrib Microbiol*; 2000. 6: p. 193-208.
21. Snowden K., Logan K., Didier E. S. Encephalitozoon cuniculi strain III is a cause of encephalitozoonosis in both humans and dogs. *J Infect Dis*; 1999. 180: p. 2086-2088.
22. Keeling, P. Five Questions about Microsporidia. *PLoS Pathogens*; 2009. 5: p. 1-3.
23. Didier E. S., Weiss L. M., Microsporidiosis: current status: *Current Opinion in Infectious Diseases*; 2006. 19: p. 485–492.
24. Brooks, W. M. Host-parasitoid-pathogen interactions. In Beckage, N., Thompson, S., and Federici, B. *Parasites and Pathogens of Insects*. New York: Academic Press; 1993. 2: p. 231–272.
25. Jaronski, S. T. Microsporidia in cell culture. *Adv. Cell Cult*; 1984. 3: p.183–229.
26. Hayman, J. R., T. R. Southern, and T. E. Nash. Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect. Immun*; 2005. 73 (2): p. 841–848.

27. Dunn, A. M., Hogg, J. C. & Hatcher, M. J. Transmission and burden and the impact of temperature on two species of vertically transmitted microsporidia. *Int J Parasitol*; 2006. 36: p. 409–14.
28. Bigliardi E., Sacchi L.. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect*; 2001. 3: p. 373-379.
29. Kunzel F., Gruber A., Tichy A., Edelhofer R., Nell B., Hassan J., Leschnik M., Thalhammer J. G., Joachim A. Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol*; 2008. 151: p. 115-124.
30. Leipig M., Matiasek K., Rinder H., Janik D., Emrich D., Baiker K., Hermanns W. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *J Vet Diagn Invest*; 2012.
31. Kunzel F., Joachim A. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res*; 2010. 106: p. 299-309.
32. Csokai J., Gruber A., Kunzel F., Tichy A., Joachim A. Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitol Res*; 2008.
33. Erwingmann A. Untersuchungen zur Klinik, Diagnose und Therapie von Infektionen mit *Encephalitozoon cuniculi* beim Heimtierkaninchen. 2012. Ref Type: Serial (Book, Monograph).
34. Habenbacher B., Klang A., Fagner K., Dinhopf N., Kunzel F., Weissenböck H. Comparative evaluation of specific methods for labeling of *Encephalitozoon cuniculi* in paraffin waxembedded tissue samples. *J Vet Diagn Invest*; 2012. 24: p. 370-375.

35. Xiao L., Cama V. A., Cabrera L., Ortega, Y., Pearson J., Gilman R. H. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *J Clin. Microbiol*; 2007. 45: p.2014-2016.
36. Botero J. H., Montoya, M. N., Vanegas A. L., Diaz, A., Martinez L., Bornay F. J., Izquierdo, F., del Aguila C., Agudelo S. P. Frequency of intestinal microsporidian infections in HIV-positive patients, as diagnosis by quick hot Gram chromotrope staining and PCR. *Biomedica*; 2004. 24: p. 375-384.
37. Siala A., Chabchoub N., Bouratbine A., Aoun K. Les microsporidioses intestinales: epidemiologie, pathogenie et diagnostic. *Revue Tunisienne d'Infectiologie*; 2007. 1: p. 20-24.
38. Franzen C. Muller A. Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. *Microbes. Infect*; 2001. 3: p. 389-400.
39. Bouladoux N., Biligui S., Desportes-Livage I. A new monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to measure in vitro multiplication of the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J Microbiol. Methods*; 2003. 53: p. 377-385.
40. Wasson K. Peper, R. L. Mammalian microsporidiosis. *Vet. Pathol*; 2000. 37: p. 113-128.
41. Zumla A., Geraint D. Granulomatous Infections: Etiology and Classification. *Clinical Infectious Diseases*; 1996. 23: p. 146-58.
42. Saunders B. M., Britton W. J. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunology and Cell Biology*; 2007. 85: p. 103–111.

43. Hagge D. A., Ray N. A., Krahenbuhl J. L., Adams L. B. An In Vitro Model for the Lepromatous Leprosy Granuloma: Fate of Mycobacterium leprae from Target Macrophages after Interaction with Normal and Activated Effector Macrophages. *J Immunol*; 2004. 172: p. 7771-7779.
44. Callard R., George J. T., Satrk J. Cytokines, Chaos, and Complexity. *Immunity*; 1999. 11: p. 507–513.
45. Commins S. P., Borish L., Steinke J. W., Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*; 2010. 125: p. s53-s72.
46. Schottelius A. J. G., Moldawer L. L., Dinarello C. A., Asadullah K., Sterry W., Biology of tumor necrosis factor- α –implications for psoriasis. *Exp Dermatol*; 2004. 13: p. 193–222.
47. Banner D. W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H. J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*; 1993. 73(3): p. 431-45.
48. Akdis M., Burgler S., R. Cramer T. Eiwegger H. Fujita, Gomez E., Klunker S., Meyer N., O'Mahony L., Palomares O., Rhyner C., Quaked N., Schaffartzik A., Van De Veen W., Zeller S., Zimmermann M., Akdis C .M., Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases *J Allergy Clin Immunol*; 2010. 127: p. 701-721.
49. Gadani S. P., Cronk J. C., Norris G. T., Kipnis J. IL-4 in the Brain: A Cytokine To Remember. *J Immunol*; 2012. 189: p. 4213-4219.

50. Brown M. A. IL-4 Production by T Cells: You Need a Little to Get a Lot. *J Immunol*; 2008. 181: p. 2941-2942.
51. Meenu R., Bix P., Bix M. Evolution of IL4 and pathogen antagonism. *Growth Factors*; 2011. 29(4): p. 153–160.
52. LaPorte S. L., Jou Z. S., Vaclavikova J., Colf L. A., Qi X., Heller N. M., Feegan A. D., Garcia C. Molecular and Structural Basis of Cytokine Receptor Pleiotropy in the Interleukin-4/13 System. *Cell*; 2008. 132: p. 259–272.
53. Jeklova E., Leva L., Jaglic Z., Faldyna M. Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model. *Vet Immunol Immunopathol*; 2008. 122 (3-4): p. 231-240.
54. Bimonte D., Rodriguez C., Vedovatti E. Anestesia general en el conejo. *Redvet*; 2007. 8: p. 1-7.
55. Didier E. S., Shadduck, J. A. IFN-gamma and LPS induce murine macrophages to kill *Encephalitozoon cuniculi* in vitro. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*; 1994. 41: p. 34S.
56. Didier, E. S., Shadduck, J. A. Modulated immune responsiveness associated with experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in BALB/c mice. *Laboratory Animal Science*; 1988. 38: p. 680–684.
57. Ishihara K., Hirano T. Molecular basis of the cell specificity of cytokine action. *Biochimica et Biophysica Acta* 1592; 2002: p. 281– 296.
58. Shadduck, J. A., Orenstein, J. M. Comparative pathology of microsporidiosis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*; 1993. 117: p. 1215–1219.

59. Wallis R. S., Ehlers S. Tumor Necrosis Factor and Granuloma Biology: Explaining the Differential Infection Risk of Etanercept and Infliximab. *Semin Arthritis Rheum*; 2005. 34(suppl 1): p. 34-38.
60. Ling Lin P., Plessner H.L., Voitenok N. N., Flynn J. L. Tumor Necrosis Factor and Tuberculosis. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 2007, 12: p. 22–25.
61. Likas N. W., Chensue S. W., Striter R. M., Warmington K. Kunkel S. L. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- α -Inducible intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Immunology*; 1994, 94: p. 5883-5889.
62. Bártová E., Marková J., Sedlak K. Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in European hares (*Lepus europaeus*). *Ann Agric Environ Med*; 2015, 13; 22(4): p. 674-6.
63. Honma A., Yamada Y., Nakamaru Y., Fukuda S., Honma K., Honma S. Glucocorticoids Reset the Nasal Circadian Clock in Mice. *Endocrinology*; 2015, 156(11): p. 4302-4311.
64. Fenhalls G., Stevens L., Bezuidenhout J., Ampehlett G. E., Duncan K., Bardin P., Lukey P. distribution of IFN- γ , IL-4 and TNF- α protein CD8 T cells producing IL-12p40 mRNA in humanlung tuberculous granulomas. *Immunology*; 2002, 105: p. 325-335.
65. Matwali A., de Andres B., Blum A., Elliott D., Li J., Qadir K., Sandor M., Weinstock. Th2-type granuloma development in acute murine schistosomiasis is only partly dependent on CD4⁺ T cells as the source of IL-4. *Eur. J. Immunol*; 2002. 32: p. 1242–1252.

66. Fuentealba I. C., Mahoney N. T., Shadduck J. A., Harvill J., Wicher V., Wicher K. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol*; 1992. 29: p. 536-540.
67. Felchle L. M., Sigler R. L. Phacoemulsification for the management of *Encephalitozoon cuniculi* induced phacoclastic uveitis in a rabbit. *Vet Ophthalmol*; 2002. 5: p. 211-215.
68. Habenbacher B., Klang A., Fragner K., Dinhopf N., Kunzel F., Weissenböck H. Comparative evaluation of specific methods for labeling of *Encephalitozoon cuniculi* in paraffin wax-embedded tissue samples. *J Vet Diagn Invest*; 2012. 24(2): p. 370-375.
69. Jordan C. N., Zajac A. M., Snowden K. S., Lindsay D. S. Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Parasitol*; 2006. 135 (3-4): p. 235-240.
70. Abu-Akkada S. S., Ashmawy K. I., Dweir A. W. First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. *Parasitol Res*; 2014.
71. Weber R., Deplazes P., Flepp M., Mathis A., Baumann R., Sauer B. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*; 1997. 336 (7): p. 474-478.
72. Jass A., Matiasek K., Henke J., Kuchenhoff H., Hartmann K., Fischer A. Analysis of cerebrospinal fluid in healthy rabbits and rabbits with clinically suspected encephalitozoonosis. *Vet Rec*; 2008. 162 (19): p. 618-622.
73. Valencakova A., Halanova M. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 2012. 35: p. 1-7.

74. Rodriguez-Tovar L. E., Markham R. J., Speare D. J., Sheppard J. Cellular immunity in salmonids infected with the microsporidial parasite *Loma salmonae* or exposed to non-viable spores. *Vet Immunol Immunopathol*; 2006. 114: p. 78-83.
75. Dinarello C. A. Proinflammatory Cytokines. *Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine*; 2000. 118 (2): p. 503-508.
76. Opal S.M., DePalo V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. *Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine*; 2000. 117 (4): p. 1162-1172.
77. Latney L. V., Bradley C. W., Wyre N. R. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*; 2014. 5: p. 169-180.
78. Aluja A. S., Constantino F. C. *Técnicas de necropsia en animales domésticos (Segunda Edición)*. *Munual Moderno*; 2002. ISBN 9789684269385.

Apéndice A

Técnicas y métodos:

A.1. Inmunofluorescencia

1. Desparafinar las secciones mediante baños de inmersión:
 - a. Xilol (5 minutos),
 - b. Alcohol 100 % (5 minutos),
 - c. Alcohol 100 % (5 minutos),
 - d. Alcohol 70 % (5 minutos),
 - e. Alcohol 30 % (5 minutos).
2. Lavar con agua destilada por 5 minutos.
3. Recuperar o desenmascarar el antígeno mediante un baño María con un buffer de citrato por 80 minutos a 80 °C (Apéndice B.4).
4. Secar a temperatura ambiente.
5. Fijar en metanol por 5 minutos y nuevamente secar a temperatura ambiente.
6. Deshidratar con acetona por 10 minutos a -20 °C.
7. Rehidratar con PBS 10X por 5 minutos (Apéndice B.2), y al terminar se retira con cuidado el excedente del buffer.
8. Incubar con el anticuerpo primario por 30 minutos en cámara húmeda, evitando que las secciones se sequen.
9. Lavar en vasos de Coplin con PBS X10, repetir tres veces y al terminar retirar el buffer.

10. Incubar con anticuerpo secundario conjugado con FITC con azul de Evans por 30 minutos en cámara húmeda (apéndice B.5). A partir de este momento evitar cualquier el contacto con luz.
11. Retirar el excedente y se realizar de nuevo tres lavados con PBS 10X.
12. Secar y montar con resina Entellan.

A.2. Inmunohistoquímica para la detección de las esporas de *Ec.*

1. Desparafinar las secciones mediante baños de inmersión:
 - a. Xilol (5 minutos),
 - b. Alcohol 100 % (5 minutos),
 - c. Alcohol 100 % (5 minutos),
 - d. Alcohol 70 % (5 minutos),
 - e. Alcohol 30 % (5 minutos).
2. Lavar con agua destilada por 5 minutos.
3. Recuperar o desenmascarar el antígeno mediante un baño María con un buffer de citrato por 80 minutos a 80 °C (Apéndice B.4).
4. Bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% por 30 minutos. Mantener húmedas las muestras en una cámara especial que conserve la humedad.
5. Rehidratar con PBS 10X por 5 minutos (Apéndice B.2), y retirar con cuidado el excedente del buffer.
6. Bloquear los sitios de unión inespecífica usando suero equino (3 gotas según las instrucciones del Vectastain® ABC Kit) por 30 minutos, procurando que no se seque el tejido.
7. Retirar el exceso del suero.
8. Incubar con el anticuerpo primario a una proporción 1:100, toda la noche a 4 °C.
9. Lavar las secciones tres veces con PBS 10X y retirar el buffer de las muestras.
10. Incubar con el anticuerpo secundario durante una hora en cámara húmeda:

a. Incubar con el anticuerpo (tres gotas, según las instrucciones del Vectastain® ABC Kit) por 30 minutos.

b. Incubar con el reagente por 30 minutos.

11. Retirar el excedente y realizar un lavado con PBS 10X.

12. Revelar las secciones con DAB (Apéndice B.8) al 5 % por 3 minutos.

13. Lavar con agua destilada por 2 minutos.

14. Contrateñir las secciones con Hematoxilina de Harris por 3 minutos,

15. Secar y montar con resina Entellan.

A.3. Prueba de carbón inmunoensayo (CIA).

1. Preparar una alícuota del suero colectado a una proporción de 1:40 con PBS 10X (Apéndice B.2).
2. De esta dilución tomar 5µl en un nuevo tubo Eppendorf y se agrega 5 µl antígeno de *Ec*.
3. Tomar 5 µl de la suspensión de suero/antígeno y mezclarla con una suspensión de carbón (5 µl) en un nuevo Eppendorf.
4. Colocar la mezcla en un portaobjetos y mezclar cuidadosamente con una micropipeta.
5. Cubrir la mezcla suero/antígeno/carbón con un cubreobjetos para evitar su deshidratación y facilitar su observación en un microscopio.

A.4. Tinción azul de Tricrómo (técnica de Weber).

1. Secar a temperatura ambiente por 10 minutos los portaobjetos con el frotis.
2. Fijar en metanol por 5 minutos.
3. Secar a temperatura ambiente.
4. Teñir por sumersión en una cubeta para tinción de vidrio (105x85x70 mm) conteniendo el azul de Tricrómo durante 90 minutos.
5. Lavar en alcohol ácido (Apéndice B.1) por 10 segundos.
6. Lavar en alcohol al 95 % por 5 minutos cada uno.
7. Deshidratar con etanol al 100 % durante 10 minutos.
8. Fijar con Xilol por 10 minutos.
9. Secar a temperatura ambiente.
10. Montar en resina para cortes histológicos para su preservación y observación.

A.5. Tinción con Calcofluor White M2R.

1. Secar a temperatura ambiente por 10 minutos los portaobjetos con los frotis.
2. Fijar en metanol por 5 minutos.
3. Secar a temperatura ambiente.
4. Agregar de tres a cuatro gotas (hasta cubrirlo totalmente) de la solución de Calcofluor White M2R con pipetas desechables e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente y proteger de la luz.
5. Lavar con cuidado en agua destilada.
6. Secar al aire, embeber en resina y cubrirlos con cubreobjetos.

A.6. Tinción de rutina de Hematoxilina y Eosina

- | | |
|---|--------------------|
| 1. Xilol | 5 minutos |
| 2. Alcohol-xilol | 2 minutos |
| 3. Alcohol 100 % | 2 minutos |
| 4. Alcohol 96 % | 2 minutos |
| 5. Agua destilada | 2 minutos |
| 6. Hematoxilina de Harris | 2 minutos |
| 7. Agua corriente | 1 minutos |
| 8. Agua destilada | 2 inmersiones |
| 9. Alcohol ácido | 1 inmersión rápida |
| 10. Agua destilada | 1 minuto |
| 11. Eosina | 30 segundos |
| 12. Alcohol 96 % | 2 inmersiones |
| 13. Alcohol 96 % | 2 inmersiones |
| 14. Alcohol 100 % | 2 inmersiones |
| 15. Alcohol-xilol | 2 minutos |
| 16. Xilol | 2 minutos |
| 17. Xilol | 2 minutos |
| 18. Montar en resina para cortes histológicos para su preservación y observación. | |

A.7. Inmunohistoquímica para detección de citocinas (Sistema Envision™ Dako)

1. Desparafinar las secciones mediante baños de inmersión:
 - a. Xilol (5 minutos),
 - b. Alcohol-xilol (5 minutos),
 - c. Alcohol 100% (3 minutos),
 - d. Alcohol 96 % (3 minutos),
 - e. Alcohol 70 % (3 minutos).
2. Lavar con agua destilada por 3 minutos.
3. Lavar con TBST (Buffer-TRIS salino con Tween 20) por 3 minutos (Apéndice B.6).
4. Recuperar o desenmascarar los antígenos mediante un baño María con una solución TRS 1X (Target retrieval solution) por 60 minutos a 90 °C (Apéndice B.7).
5. Lavar nuevamente en TBST por 5 minutos, sin permitir que se seque la muestra.
6. Bloquear la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3 % e incubar entre 10 a 20 minutos dependiendo de las dimensiones de los tejidos.
7. Lavar con TBST por 5 minutos.
8. Bloquear los sitios de unión inespecífica con suero equino (100 µl) por 30 minutos.
9. Sin realizar ningún lavado, retirar el exceso del suero.
10. Incubar el anticuerpo primario (en una dilución de 1/100 del anticuerpo en diluyente) en cámara húmeda durante toda una noche a 4 °C.

11. Limpiar el exceso de anticuerpo primario con un lavado con TBST por 5 min.
12. Incubar con el anticuerpo secundario (100µl) por 45 minutos en cámara húmeda a 37 °C.
13. Lavar con TBST por 5 minutos.
14. Revelar con una solución de DAB al 5 % en diluyente (Apéndice B.8) por 2 minutos.
15. Lavar tres veces con agua destilada por 5 minutos cada uno.
16. Contrateñir con Hematoxilina de Harris por 30 segundos.
17. Lavar con agua corriente.
18. Deshidratar en baños rápidos con:
 - a. Alcohol al 70%,
 - b. Alcohol 96%,
 - c. Alcohol 100%,
 - d. Xilol-alcohol,
 - e. Xilol.
19. Montar con resina Entellan y cubrir con un cubreobjetos para su posterior observación a microscopía de luz de campo claro.

Apéndice B

Preparación de soluciones y reactivos:

B. 1. Alcohol ácido

Cantidad:	1 L
Alcohol acético	4.5 ml
Etanol 90%	995 ml

B.2. Buffer de fosfatos salino (PBS) 10X

Cantidad:	100 ml
NaCl	8.0 gr
KCl	0.20 gr
Na ₂ HPO ₄	1.44 gr
KH ₂ PO ₄	0.24 gr

Diluir primero en 50 ml de agua destilada, posteriormente en 450 ml de agua destilada para la concentración final de 1X.

B.3. Solución de Formaldehído 4%

Cantidad: 500 ml

Formol comercial 37 % 135 ml

Agua destilada 365 ml

Para amortiguar la fórmula se utiliza PBS 10X.

Estandarizar el pH a 7.2-7.4

B.4. Buffer de Citratos

Cantidad: 1 L

Ácido cítrico 10 mM

(Citric-acid Buffer Tablets, Sigma-Aldrich®)

Tween 20 0.5 % 5 ml

Agua destilada 995 ml

B.5. FITC anticuerpo secundario 1/50

Cantidad: 50 ml

Anticuerpo secundario (FITC) 1 ml

PBS 49 ml

Azul de Evans 0.02 gr.

B.6. Solución Tri-buffer salino con Tween 20 (TBST) 1X

Cantidad: 200 ml

TBST 20X 10 ml

(Envision™ Flex Wash Buffer 20X)

Agua destilada 190 ml

B.7. Solución recuperadora de antígenos (TRS) 1X

Cantidad: 200 ml

TRS 50X 4 ml

(Dako® Target Retrieval Solution High 50X)

Agua destilada 196 ml

B.8. Solución de sustrato-cromógeno Diaminobencidina (DAB)

Cantidad: 1 ml

Solución DAB 1 ml

(Envision™ Flex Substrate Buffer)

Sustrato DAB 5 µl

(Envision™ Flex DAB+Chromogen)

Debe de utilizarse en un periodo de treinta minutos y emplear guantes al manipularla por sus componentes carcinogénicos.