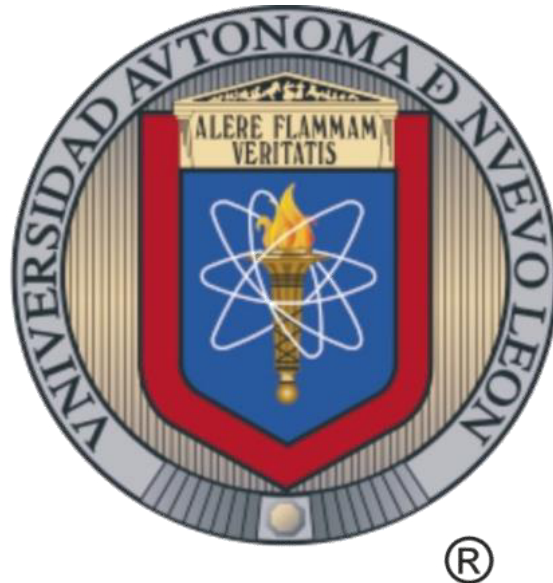


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

IDENTIFICACIÓN DE CD4, CD8 Y MHC II MEDIANTE IHC EN GRANULOMAS
DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE CON *ENCEPHALITOOZON*
CUNICULI.

PRESENTA

CÉSAR DÁVILA MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL

MAYO 2016

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



TESIS

IDENTIFICACIÓN DE CD4, CD8 Y MHC II MEDIANTE IHC EN GRANULOMAS
DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE CON *ENCEPHALITOOZON*
CUNICULI.

PRESENTA

MVZ. CÉSAR DÁVILA MARTÍNEZ

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

MAYO 2016



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



TESIS

**IDENTIFICACIÓN DE CD4, CD8 Y MHC II MEDIANTE IHC EN
GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE CON
ENCEPHALITOOZON CUNICULI.**

PRESENTA

MVZ. CÉSAR DÁVILA MARTÍNEZ

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

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MAYO 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA
IDENTIFICACIÓN DE CD4, CD8 Y MHC II MEDIANTE IHC EN
GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS NATURALMENTE CON
ENCEPHALITOOZON CUNICULI.

Aprobación de tesis por el comité particular de

MVZ. César Dávila Martínez



Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Director de Tesis



Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director



Dr. Armando Trejo Chávez
Co-Director



MSc. Alicia Magdalena Nevárez Garza
Co-Director



Dr. Juan José Zárate Ramos
Co-Director

ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

MAYO, 2016

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres Gabriel y Cirina, así como a mis hermanos Bruno y Alan, no solo por lo que este logro representa para mí, sino porque todo el esfuerzo y sacrificio requerido para su realización pasó inadvertido sabiendo que siempre estuve arropado por su amor.

“Creo en mí mismo y en mis habilidades”

Gabriel Dávila Cuellar

AGRADECIMIENTO

A todas las personas que a lo largo de estos dos años de esfuerzo me han apoyado, tanto en el ámbito académico y profesional como en el personal.

Quiero agradecer rotundamente a quienes estuvieron como mis profesores en el transcurso de este posgrado, por enfatizarme lo capaz que puedo llegar a ser y reconocer mis logros por más mínimos que hayan sido.

Personal técnico y administrativo de facultades e instituciones en donde se me permitió trabajar para lograr este proyecto: Dr. Roberto Montes de Oca, Dr. Adrián Rosas, Dr. Carlos Medina, MC Carlos Hernández, Dr. Mario Guzmán, Dr. Juan Zarate, MVZ Jaime Garza, a Iván y al MVZ Luis.

Al Dr. Emilio Olivares, por sus constantes asesorías y a mi tutor el Dr. Jorge Kawas.

Gracias a mis asesores, Dr. Luis Edgar, Dra. Alicia, Dr. Uziel, Dr. Trejo y al Dr. Adolfo, por permitirme el trabajar con ustedes.

Les agradezco también a mis compañeros del posgrado y amigos con los que compartí muchos momentos (estrés sobre todo).

Gracias Pao y Heidi, por sacarme de tantos apuros y enseñarme la importancia de analizar las cosas.

A la familia Espinosa González, por adoptarme y procurarme, además de mantener tranquila a mi mamá.

A las hermanas que este posgrado me brindó: Steph e Ivone.

Muchas gracias Adriana, por hacer de mi mundo un lugar más bello.

ABREVIATURAS

ABC	Complejo avidina-biotina
Ac	Anticuerpo
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
CAM	Macrófagos activados mediante la vía clásica
CD	Célula dendrítica
CD4+	Linfocito T cooperador (Célula T CD4+)
CD8+	Linfocito T citotóxico (Célula T CD8+)
CPA	Célula presentadora de antígeno
CTC	Linfocitos T citotóxicos
DAB	Diaminobencidina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fc	Fracción cristalizable
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HE	Hematoxilina y eosina
IFA	Inmunofluorescencia
IFN- γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulinas G
IL-1	Interleucina 1
iNOS	Óxido nítrico sintasa
MCP-1/CCL2	Proteína 1 quimioatrayente de monocitos

MET	Microscopía electrónica de transmisión
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo 1
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MIP-1 α	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa
NO	Óxido nítrico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RbCD4	Marcador CD4 de conejo
SSF	Solución salina fisiológica
SSU-rRNA	Gen del RNA de la subunidad menor
TA	Temperatura ambiente
TB	Tuberculosis
TCR	Receptor de célula T
TLR-2	Receptores parecidos a Toll-2
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRS	Solución recuperadora de antígeno
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia humana

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE CONTENIDO	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XV
1. INTRODUCCIÓN	18
1.1. OBJETIVOS	20
1.2. HIPÓTESIS	20
1.3. JUSTIFICACIÓN	21
2. REVISIÓN DE LITERATURA	22
2.1. HISTORIA DE <i>ENCEPHALITOOZON CUNICULI</i>	22
2.2. MORFOLOGÍA DE LA ESPORA DE <i>ENCEPHALITOOZON CUNICULI</i>	24
2.3. DESARROLLO Y CICLO DE VIDA DE <i>ENCEPHALITOOZON CUNICULI</i> EN EL CONEJO.....	28
2.4. SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES ASOCIADAS A <i>ENCEPHALITOOZON CUNICULI</i> EN EL CONEJO	31
2.4.1. <i>Signos clínicos</i>	31
2.4.2. <i>Lesiones</i>	33
2.5. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE <i>ENCEPHALITOOZON CUNICULI</i>	34
2.5.1. <i>Microscopía electrónica de transmisión</i>	34
2.5.2. <i>Estudios inmunológicos</i>	35
2.5.3. <i>Histología</i>	36
2.5.4. <i>Citología</i>	37
2.5.5. <i>Coproparasitoscópico y urodiagnóstico</i>	38

2.5.6. Métodos moleculares	38
2.5.7. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia	40
2.5.8. Histoquímica	41
2.6. GRANULOMA	41
2.6.1 Tipos de granuloma	43
2.6.1.1. Nodular o tuberculoide (Granulomas tipo T_H1)	44
2.6.1.2. Granuloma difuso o lepromatoide (Granuloma tipo T_H2)	45
2.6.1.3. Granuloma Microsporidiano	46
2.7. MARCADORES DE SUPERFICIE	48
2.7.1. Marcador de superficie CD4	49
2.7.2. Marcador de superficie celular CD8	50
2.7.3. Marcador de superficie celular MHC II	51
3. MATERIALES Y MÉTODOS	53
3.1. ANIMALES PARA EL ESTUDIO	53
3.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO	54
3.2.1 Anestesia y eutanasia de los animales	56
3.3. COLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	58
3.3.1 Orina y heces	58
3.3.2 Muestras sanguíneas	58
3.3.3 Obtención y preservación de muestras tisulares	59
3.4 DETECCIÓN DE ESPORAS EN MUESTRAS	61
3.4.1 Detección de esporas en tejido mediante tinción con anticuerpos conjugados	61
3.4.1.1 Inmunofluorescencia indirecta	61

3.4.1.2 Inmunohistoquímica (IHC)	62
3.4.2 Estudios coprológico y urológico	63
3.4.2.1 Tinción de tricromo modificada (técnica de Weber) para heces y orina	64
3.4.2.2 Calcoflúor White para heces y orina	65
3.4.3 Tinción histopatológica	67
3.4.3.1 Hematoxilina y Eosina (HE).....	67
3.4.3.2 Azul de tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido	67
3.5.1 Anticuerpos anti-marcadores de superficie	68
3.5.2 Inmunohistoquímica para la detección de marcadores de superficie ...	68
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
4. RESULTADOS	70
4.1 MUESTRAS SANGUÍNEAS	70
4.1.1 Prueba de Carbón Inmunoensayo (CIA)	70
4.1.2 Parámetros sanguíneos	72
4.1.2.1 Porcentaje de hematocrito	72
4.1.2.2 Porcentaje de linfocitos/monocitos.....	74
4.1.2.3 Porcentaje de granulocitos	76
4.2 DETECCIÓN DE ESPORAS EN MUESTRAS	78
4.2.1 Detección de esporas en tejido mediante tinción con anticuerpos conjugados.....	78
4.2.1.1 Inmunofluorescencia indirecta	78
4.2.1.2 Inmunohistoquímica indirecta	80
4.2.2 Estudio coprológico y de orina	83

4.2.2.1 Tinción de Tricromo modificada (técnica de Weber) para heces y orina	83
4.2.2.2 Calcoflúor White para heces y orina	85
4.2.3 Tinción histopatológica	87
4.2.3.1 Hematoxilina y Eosina (HE)	87
4.3.3.2 Azul de tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido	91
4.3 DETECCIÓN DE MARCADORES DE SUPERFICIE LEUCOCITARIA CD4, CD8 Y MHC II	93
4.3.1 Marcador de superficie leucocitaria CD4	93
4.3.1.1 Cerebro	93
4.3.1.2 Riñón	95
4.3.2 Marcador de superficie leucocitaria CD8	97
4.3.2.1 Cerebro	97
4.3.2.2 Riñón	99
4.3.3.1 Cerebro	101
4.3.3.2 Riñón	103
4.3.3.3 Secciones control negativas	105
4.4 CONTEO CELULAR	107
4. DISCUSIÓN	117
5. CONCLUSIONES	126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
APÉNDICE	148
A.- TÉCNICAS Y MÉTODOS	148
A-1 Inclusión en parafina	148

A-2 IFA de esporas en tejido	148
A-3 IHC de esporas en tejido	150
A-4 Tinción de Tricromo modificada o técnica de Weber (heces y orina)	152
A-5 Tinción con calcoflúor White (heces y orina)	153
A-6 Tinción de hematoxilina y eosina	155
A-7 Azul de Tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido	156
A-8 IHC de marcadores de superficie	157
B. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS	159
B.1 Azul de Tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido, heces y orina	159
B.2 IHC e IFA	159

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Diferenciación de las especies del género <i>Encephalitozoon</i> spp. a partir de la esporas.	27
Cuadro 2.-Diseño del experimento. Grupos utilizados y las características de cada uno.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Esquema de una espora madura de <i>E. cuniculi</i>	26
Figura 2.- Ciclo de vida de <i>E. cuniculi</i>	29
Figura 3.- Cronología del experimento y las actividades realizadas en este	57
Figura 4.- Base para posicionamiento de laminillas.....	66
Figura 5.- Prueba de carbón Inmuno Ensayo.	71
Figura 6.- Hematocrito de los grupos A, B, C y D.	73
Figura 7.- Valores de Linfocitos/Monocitos de los grupos A, B, C y D.....	75
Figura 8.- Valores de los granulocitos de los grupos A, B, C y D.....	77
Figura 9.- Riñón de conejo infectado. Epifluorescencia. Tejido renal.	79
Figura 10.- Encéfalo de conejo infectado naturalmente.....	81
Figura 11.- Riñón de conejo infectado naturalmente..	82
Figura 12.- Esporas de <i>E. cuniculi</i> en muestra teñida con azul de tricromo.	84
Figura 13.- Esporas de <i>E. cuniculi</i> en muestras teñida con calcoflúor White.....	86
Figura 14.- Granuloma en encéfalo	88
Figura 15.- Quistes intracelulares de <i>E. cuniculi</i> en epitelio renal.....	90
Figura 16.- Riñón. Esporas de <i>E. cuniculi</i> teñidas con azul de Tricromo.....	92
Figura 17.- Linfocitos T CD4 ⁺ en l un granuloma de encéfalo.....	94
Figura 18.- Linfocitos T CD4 ⁺ en un granuloma renal.....	96
Figura 19.- Linfocitos T CD8 ⁺ en un granuloma de encéfalo	98
Figura 20.- Linfocitos T CD8 ⁺ en un granuloma renal.....	100
Figura 21.- Células expresando MHC II en granuloma de ancéfalo.....	102
Figura 22.-Células expresando MHC II en un granuloma renal	104
Figura 23.- Conejo clínicamente sano. Encéfalo.....	106

Figura 24.- Conejo clínicamente sano. Riñón.	106
Figura 25.- Comparación entre grupos A y B en marcaje positivo para las moléculas de superficie en encéfalo.	108
Figura 26.- Comparación entre los grupos A y B a razón del número de células con marcaje positivo a las moléculas de superficie en los granulomas ubicados en riñón.	110
Figura 27.- Comparación entre los órganos de cada grupo, midiendo el número de células con marcaje positivo a las molécula CD4, en los granulomas ubicados en cada tejido.	112
Figura 28.- Comparación entre los órganos de cada grupo, midiendo el número de células con marcaje positivo a CD8 localizadas en los granulomas ubicados en cada tejido.	114
Figura 29.- Comparación entre los órganos de cada grupo, midiendo el número de células con marcaje positivo a MHC II localizadas en los granulomas ubicados en cada tejido.	116

RESUMEN

Encephalitozoon cuniculi es un microorganismo intracelular obligado, zoonótico, generador de esporas y cuyo huésped definitivo es el conejo. Este microsporidio genera una inflamación granulomatosa de tipo T_H1, que se ubica principalmente en encéfalo, riñón e hígado. Un granuloma es un acopio de macrófagos y otras células del sistema inmune cuyo objetivo es el de aislar a la espora infectante y eliminarla. Sin embargo, bajo condiciones de estrés o mediante la inmunosupresión con fármacos, se puede desencadenar un cambio en el tipo de señalización celular que en éstas células se produce, creando un sesgo hacia una inflamación granulomatosa tipo T_H2. Lo anterior pudiera dar lugar a la diseminación de esporas, la aparición de signos clínicos y la extensión de las lesiones en el animal. Estos cambios se producen mediante vías de señalización celular llevadas a cabo por la interacción de citocinas y moléculas de superficie leucocitaria, las cuales influyen en ciertas poblaciones celulares y en el tipo de activación y/o reacción que estas pudiesen tener. En el presente estudio se utilizaron cuatro grupos de conejos, dos de ellos con encefalitozoonosis (A y B) y dos sanos (C y D), de los cuales los grupos B y C, recibieron un tratamiento inmunosupresor con dexametasona. El grupo infectado A representó a animales cursando por la condición crónica (infección asintomática), mientras que el grupo B representó una infección microsporidiana oportunista en individuos bajo condiciones de estrés.

Mediante la técnica inmunohistoquímica de los granulomas formados en encéfalo y riñón (*in situ*), se logró la identificación y comparación de la

presencia de tres marcadores de superficie leucocitario: CD4, presente principalmente en linfocitos T CD4⁺, CD8, presente principalmente en linfocitos T CD8⁺ y MHC II, presente principalmente en células presentadoras de antígeno (Monocitos, macrófagos y células dendríticas). Lo cual permitió evidenciar la presencia de dichas poblaciones celulares concurrentes en el microambiente del granuloma formado en condiciones de estrés y aquel producido de manera crónica en animales asintomáticos y sin signología aparente.

Se encontró que el efecto de la dexametasona promueve un cambio en el fenotipo celular de T_H1 a T_H2, en el granuloma y que dicha inmunosupresión estimuló la presencia de células CD4⁺ en los animales infectados, modificando el fenotipo celular. Mientras que la presencia de la espora en el riñón permitió observar una mayor respuesta de tipo citotóxica sobre la de tipo cooperadora, aunque dicho fenotipo celular fue revertido por la inmunosupresión.

A nivel renal la inmunosupresión promovió un aumento en la presencia del MCH II en animales infectados y la redujo a nivel cerebral.

1. INTRODUCCIÓN

El filo Microspora consta de parásitos unicelulares formadores de esporas con ciclos intracelulares obligados y relacionados con los hongos (Keeling y McFadden, 1998), éstos ostentan un filamento polar único con el que logran parasitar una amplia variedad de especies. En los seres humanos se han encontrado prevalencias serológicas de hasta un 38%, (Didier et al., 1995; Didier et al., 2004). La microsporidiosis se ha clasificado como una severa enfermedad zoonótica y también emergente, ya que su incidencia ha aumentado en los últimos 10 años. Debido a esto, se ha incrementado el interés por este microorganismo buscando explicar las estrategias que éste utiliza para llevar a cabo la infección así como también entender la comunicación celular y molecular que estos microorganismos desarrollan con sus hospedadores. *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*), fue el primer microsporidio en ser identificado en los mamíferos, siendo reportado primeramente en lepóridos (Wright, 1922). La encefalitozoonosis se considera como una variable, en estudios donde los roedores o conejos son utilizados como modelo experimental (Didier et al., 2004). Las esporas de *E. cuniculi* utilizan su filamento polar para inocular el esporoplasma en las células del hospedador (Wasson y Pepper, 2000), aunque también se produce la infección mediante la fagocitosis de las esporas (Franzen et al., 2005). Las células infectantes emergen desde el interior de la célula parasitada como esporas maduras, rompiendo tanto a la vacuola parasitófora como la membrana celular (Franzen, 2005). Posteriormente se diseminan a distintas áreas del cuerpo como intestino delgado, riñones o pulmones, permitiendo la subsiguiente liberación de

esporas hacia el medio ambiente mediante las heces, fluidos urinarios y nasales respectivamente, contaminando el suelo, el agua y los alimentos. Los cuadros clínicos varían de acuerdo al estado inmunológico del hospedador así como la vía de entrada de *E. cuniculi* (Yazar et al., 2013). Las lesiones macroscópicas son inaparentes, aunque las infecciones crónicas se pueden manifestar en los riñones como áreas deprimidas, irregulares y focalizadas. Las lesiones microscópicas más representativas en conejos son la formación de estructuras granulomatosas que se establecen en el encéfalo y riñones, desarrollándose una meningoencefalitis no supurativa con astrogliosis e infiltración linfocítica perivascular, así como una nefritis linfocítica focal con cantidades variables de fibrosis (Wright, 1922; Rodriguez-Tovar et al., 2011; Al-Sadi y Al-Mahmood, 2014). Se han realizado numerosos estudios para identificar el papel de la respuesta inmune mediante sus distintas vías. Tal es el caso de la respuesta por células T CD8⁺, ya que, asumiendo el parasitismo intracelular obligado de los microsporidios, se ha sugerido que la respuesta celular puede desempeñar un papel importante en la defensa del organismo contra estos agentes infecciosos (Lawlor et al., 2010; Stark et al., 2009). En contraste, la respuesta de células T CD4⁺ tiene un papel en su mayoría regulatorio (Stark et al., 2009; Valencakova et al., 2004). Sin embargo, se desconoce el tipo de respuesta inmune (T_H1 o T_H2) y el microambiente (células y citocinas) que se desarrollan dentro de los granulomas generados por la infección de *E. cuniculi*, siendo que el conocimiento de estos elementos en el contexto de otras lesiones granulomatosas causadas por patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* o *Schistosoma mansoni* (T_H1 y T_H2 respectivamente) (James, 2000), son de suma importancia en la implementación de estrategias para el control o

tratamiento de estas enfermedades. Por lo tanto, los primeros pasos para contrarrestar la encefalitozoonosis depende de la obtención de la información referente al tipo de respuesta inmune que prevalece. Mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia (IFA) e inmunohistoquímica (IHC) se han detectado esporas en tejido o fluidos de animales infectados (Al-Mekhlafi et al., 2011); en el presente estudio, utilizando la IHC, se evidenció la presencia de los marcadores de superficie leucocitarios asociados a granulomas en respuesta a microsporidios.

1.1. Objetivos

1.1.1. Detectar conejos infectados con *E. cuniculi* mediante serología y examen coproparasitológico.

1.1.2. Identificar esporas de *E. cuniculi* en granulomas de animales infectados mediante histopatología.

1.1.3. Identificar la expresión de marcadores celulares asociados al granuloma microsporidiano.

1.2. Hipótesis

La formación de granulomas por esporas de *Encephalitozoon cuniculi* promueve la expresión de marcadores de superficie leucocitaria.

1.3. Justificación

El estudio de los marcadores de superficie leucocitarios, nos permitirá entender el papel de las células participantes en la respuesta inmune durante la fase inicial de la infección, desarrollo y eliminación de las esporas de *E. cuniculi* en conejos infectados naturalmente, para establecer a futuro estrategias que nos permitan controlar y prevenir esta zoonosis.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Historia de *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi se mantiene como el microsporidio clásico en mamíferos (Wasson y Peper., 2000), el cual originalmente fue descubierto en 1922 al ser identificado en conejos (Wright, 1922). Este microorganismo infeccioso e intracelular ha sido reportado en diversas especies mamíferas alrededor del mundo, como ratas, ratones, caballos, zorros, gatos, perros, ratas almizcleras, leopardos, babuinos y humanos (Didier et al., 2000). Sin embargo, no fue sino hasta la década de los ochenta cuando se recobró el interés sobre la microsporidiosis humana, al identificarse *Enterocytozoon bieneusi* como el causante de diarrea, emaciación y desgaste en un paciente humano inmunosuprimido, positivo al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Desportes et al., 1985). Los casos reportados de infecciones por *E. cuniculi*, comúnmente se relacionaban con personas inmunodeficientes (VIH, tratamientos inmunosupresores, linfocitopenia T CD4⁺ idiopática, etc.) (Mathis et al., 2005). De este microsporidio se han diferenciado cuatro genotipos, que son I, II, III y IV y los cuales han sido encontrados y aislados originalmente de conejo, ratón, perro y humano, respectivamente (Pelin et al., 2016). En el ser humano, existen catorce microsporidios que lo llegan a infectar, siendo *E. cuniculi* (Genotipos I, III y IV), uno de los más virulentos (Flynn et al., 2007). La encefalitozoonosis en el humano provoca severas lesiones entéricas, renales y respiratorias, debido a su diseminación sistémica (Hocevar et al., 2014), llegando a infectar prácticamente todos los órganos de un paciente (Didier y Weiss, 2011). Se han realizado pruebas

serológicas de aglutinación y de ELISA en seres humanos, dando resultados positivos en poblaciones tanto inmuno-competentes como inmuno-suprimidas. Se ha observado que las personas que se ubican con un alto rango de seropositividad son aquellas relacionadas con la exposición ocupacional con animales. Una situación importante que muchos de estos individuos son inmuno-competentes y no presentan signología clínica aparente (asintomáticas) (Mathis et al., 2005). Estudios posteriores relacionaron la presencia de *E. cuniculi* en personas seropositivas-asintomáticas (Sak et al., 2011), con aquella presente en animales de laboratorio, sugiriendo una transmisión zoonótica (Didier et al., 2000). Desde los años setenta, la encefalitozoonosis en conejos de laboratorio ha sido un problema muy frecuente, afectando la salud de los animales e interfiriendo con los resultados de los experimentos (Petri, 1969; Shadduck y Pakes, 1971). Por lo tanto, en Europa y EUA se exige el monitoreo regular en los conejos utilizados en la investigación, llevado a cabo mediante pruebas serológicas, como ELISA y aglutinación de esporas, para tener la seguridad de no tener alguna concomitancia de encefalitozoonosis y el experimento científico. Se han reportado casos de encefalitozoonosis en seres humanos en donde existió un contacto previo con animales infectados (conejos o perros), haciendo la zoonosis más evidente (Mathis et al., 2005). En base a lo anterior, se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a conocer los diversos factores relacionados con la interacción *E. cuniculi*-hospedador, tales como las características morfológicas y bioquímicas de la espora, su capacidad infectocontagiosa, su patogenia, así como los factores inmunológicos que predisponen la encefalitozoonosis y su posterior diseminación en el huésped susceptible (Mathis, 2000; Khan et al., 2001). Hasta

ahora, la lista de especies portadoras o seropositivas a *E. cuniculi* continua incrementándose con el paso del tiempo y alrededor del mundo (Bártová et al., 2015; Pan et al., 2015,). Mientras tanto, en humanos, los factores predisponentes respecto a la condición de los pacientes (edad, estado inmunológico, infección asintomática) o las vías (zoonosis, agua contaminada, trasplante de órganos infectados) por las que estos pueden llegar a infectarse se ha mantenido en aumento continuamente (Hocevar et al., 2014; Kim et al., 2015).

2.2. Morfología de la espora de *Encephalitozoon cuniculi*

Los microsporidios son agentes patógenos ubicuos, y aunque son considerados como células eucarióticas, no poseen mitocondrias ni aparato de Golgi completo. Se han adaptado evolutivamente a la vida parasitaria intracelular y, por lo tanto, dependen totalmente del metabolismo energético de la célula huésped (Ghosh *et al.*, 2012). Además, basados en las características bioquímicas y en los análisis moleculares, a los microsporidios se les considera actualmente como hongos, siendo anteriormente considerados como protozoos (Valencakova *et al.*, 2011). Estos microorganismos forman esporas infectantes cuando se encuentran en el medio ambiente. En el caso de *E. cuniculi* las esporas miden aproximadamente 2-4 μm de largo y las estructuras que la conforman se pueden dividir en 2 partes:

1) La cápsula: la cual está formada de una capa externa proteica electrodensa (exoespora) y la otra interna compuesta de quitina (endoespora).

2) El aparato de extrusión, infección o reproducción: el cual está formado por el tubo polar, la vacuola posterior y el agente infeccioso o esporoplasma, el cual es considerado el núcleo verdadero del parásito (Figura 1).

La presencia o ausencia de una vacuola parasitófora en la célula infectada y el número de vueltas del tubo polar dentro de la espora, ayudan a diferenciar las especies del genero *Encephalitozoon* (Cuadro 1).

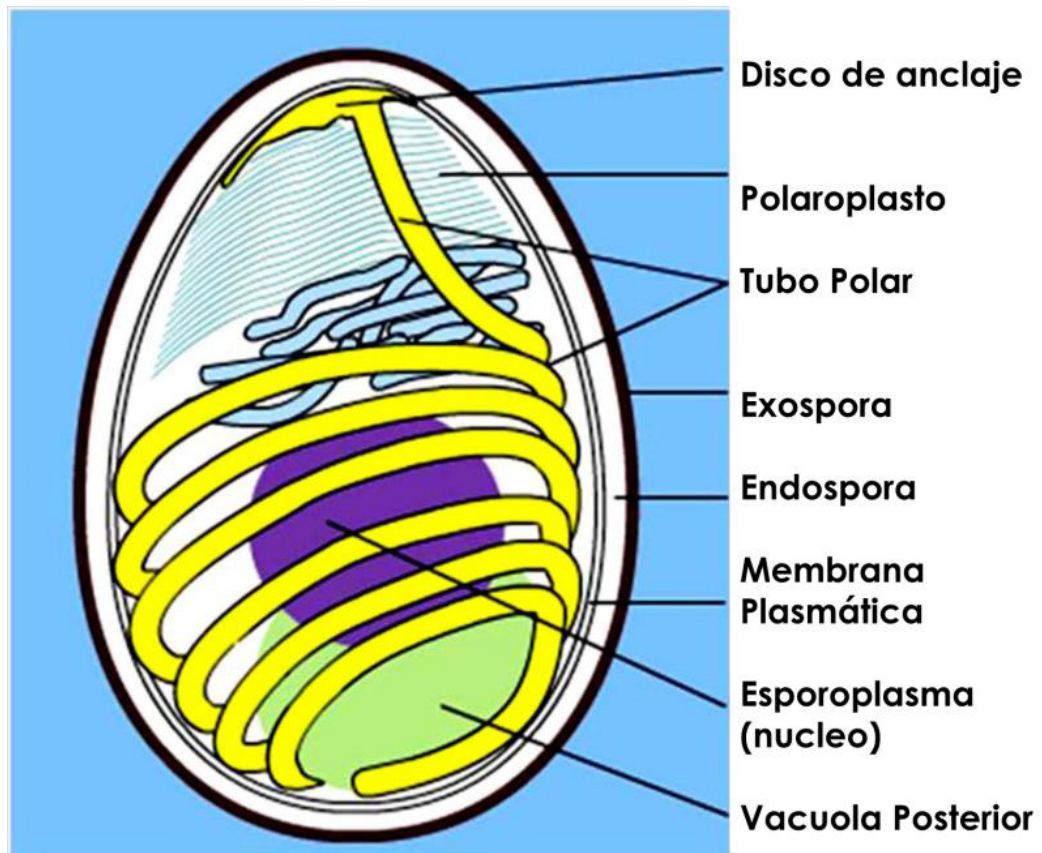


Figura 1.- Esquema de una espora madura de *E. cuniculi*. Se puede apreciar la representación de cada una de sus partes, además del nombre y la localización de estas. (Franzen et al., 2005).

Cuadro 1.- Diferenciación de las especies del género *Encephalitozoon spp.* a partir de la esporas.

CARACTERÍSTICAS	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon hellem</i>	<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>
DIMENSIÓN DE LA ESPORA (µM)	1.5 x 2.5	1.0 x 2.5	1.2 x 2.0	0.5 x 1.5
NÚMERO DE VUELTAS DE TUBO POLAR	5-7	4-9	4-7	4-5
DESARROLLO INTRACELULAR	Vacuola parasitófora	Vacuola parasitófora	Formación de un septo. Vacuola parasitófora	Contacto con citoplasma
CÉLULA HUÉSPED	Epitelio digestivo y renal, macrófagos, monocitos, linfocitos, endotelio	Células epiteliales	Enterocitos, macrófagos, monocitos, fibroblastos, endotelio	Enterocitos, epitelio biliar, epitelio pancreático, epitelio respiratorio, macrófagos

Modificado de: Anane et al., 2010.

Una característica única de *E. cuniculi* es la de poseer un genoma extremadamente pequeño, el cual abarca hasta 2.9 Mbp. Esta reducción en el tamaño de su genoma se debe al apretado empaquetamiento de la información genética dentro del cromosoma (con una ausencia virtual de intrones, un bajo número de secuencias repetitivas y muchos genes de una sola copia), y a una pérdida de la información genética relacionada con ciertas actividades metabólicas que se considerarían innecesarias para el estilo de vida de este microsporidio (Weiss, 2000).

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

El epitelio digestivo y respiratorio se consideran como los posibles sitios primarios de la infección de *E. cuniculi*. Una vez que la espora de *E. cuniculi* se localiza en estas regiones, infectan a las células huésped a través de un mecanismo único de invasión, el cual comprende la utilización de un tubo polar. Después de atravesar la membrana celular, esta estructura descarga al esporoplasma a manera similar a una jeringa, depositándolo directamente en el citoplasma de las células huésped (Figura 2).

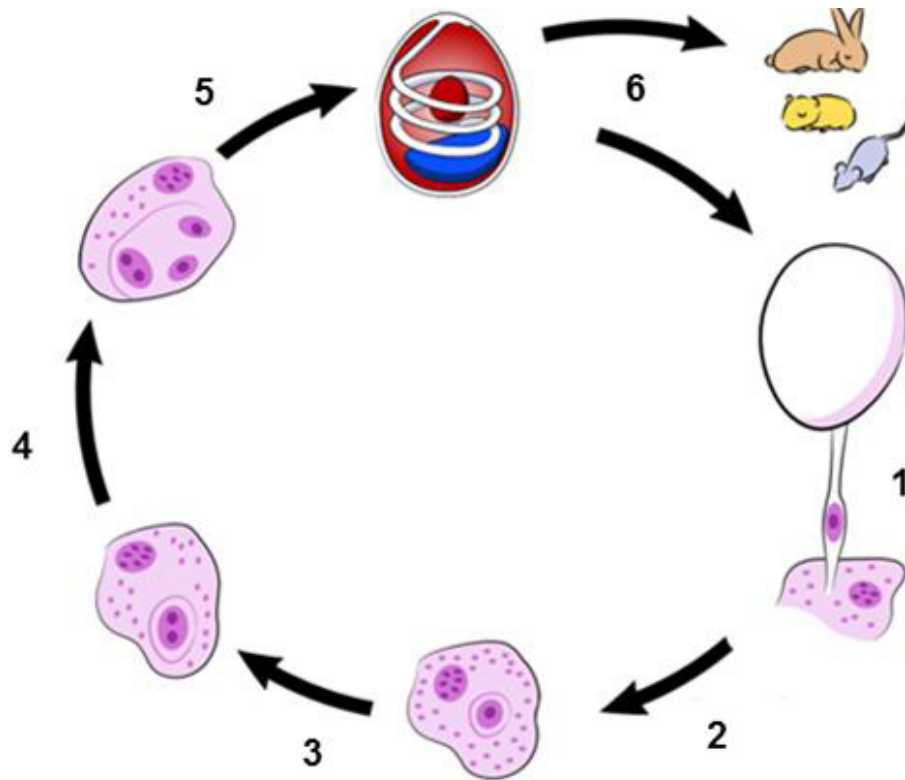


Figura 2.- Ciclo de vida de *E. cuniculi*. Se aprecian seis etapas de la infección y desarrollo de la espora: 1. Inoculación del esporoplasma a la célula hospedadora. 2. Formación de la vacuola parasitófora. 3. Esporoplasma se torna en meronte con su posterior división (merogonia). 4. Esporogonia. 5. Esporas maduras e infectivas. 6. La espora infecta una nueva célula hospedadora o es liberada al medio ambiente, en donde puede llegar a ser ingerida nuevamente. (Imagen tomada de Wright, 2014)

La estimulación de la extrusión del tubo polar posiblemente sea por una señal bioquímica en el microambiente, la cual aún no está del todo definida (Franzen et al., 2005). Se ha sugerido que un incremento en la presión osmótica interna de la espora o un cambio de pH ocasiona la salida súbita del tubo polar. De esta manera, el esporoplasma no establece contacto con el medio extracelular y no es reconocido por la respuesta inmune (Dall, 1983; Weiss, 2014). Una vez dentro del citoplasma, el esporoplasma atraviesa dos fases de desarrollo, la merogonia (fase proliferativa) y la esporogonia (fase infectiva). La merogonia comprende la proliferación y crecimiento de la fase inmadura del parásito, el cual es llamado meronte, mientras que la esporogonia es la etapa desarrollo y maduración hacia esporas infectantes (Bohne et al., 2011). Este proceso se lleva a cabo dentro de la vacuola parasitófora, la cual separa al parásito del resto de los componentes de la célula huésped y consiste principalmente de lípidos derivados de la célula. El periodo de desarrollo del ciclo es breve, siendo de entre 24 - 48 horas, aunque su duración se ha relacionado con varios factores ambientales como la temperatura, la cual afecta de manera notable el número de esporas, el tejido infectado del huésped, la respuesta inmune (fagocitosis) y enzimas digestivas (Fasshauer et al., 2005),

Después de este tiempo, la célula infectada se rompe debido a la excesiva proliferación del parásito en el interior de la misma, liberando las esporas directamente en el huésped, en las células vecinas, en el sistema vascular o a través del sistema fagocítico mononuclear (Mathis, 2000). La ruptura de la célula huésped genera una severa respuesta inflamatoria caracterizada por el desarrollo de granulomas. Si la célula huésped no se rompe, la infección puede propagarse

por extensión directa de las esporas a las células circundantes (Rodríguez-Tovar et al., 2003). Experimentalmente se ha demostrado que en conejos inmunocompetentes e infectados con *E. cuniculi* por vía oral, se presentan las etapas tempranas de la infección intestinal, sin propagación a otros órganos, y las esporas pueden encontrarse en las heces a partir de la 6ta semana después de la infección. Sin embargo, este mismo estudio menciona que al infectar animales inmunocomprometidos, el parásito puede propagarse al huésped por vía sanguínea y ocasionar lesiones en encéfalo, pulmón, hígado y riñones aproximadamente 3 semanas después de la exposición experimental con esporas de *E. cuniculi* (Jeklova et al., 2010). Es en estas condiciones donde las esporas pueden ser observadas en la orina a partir del primer mes de infección y los animales infectados pueden continuar excretando esporas del parásito a lo largo de su vida. Una vez en el medio ambiente, las esporas pueden sobrevivir por una semana a 4°C, o bien estar viables hasta 2 meses a una temperatura de 22°C (Desportes-Livage, 2000).

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

2.4.1. Signos clínicos

Los signos clínicos de un animal infectado por *E. cuniculi* pueden variar desde una forma subclínica e inaparente hasta una muerte aguda. En general, se establecen 3 formas de la manifestación clínica, que son la nerviosa, la renal y la ocular, pudiendo presentarse de manera individual o en combinación. Los signos

neurológicos por *E. cuniculi* comprenden un mayor porcentaje de las manifestaciones clínicas relacionadas con encefalitis (Künzel et al., 2008). La enfermedad vestibular y las convulsiones son la signología más obvia asociada a encefalitozoonosis en conejos, aunque también puede presentarse rodamiento horizontal, ataxia, tortícolis y opistotonos. A pesar de tener la cabeza desplazada hacia un lado o hacia atrás, la ingesta de agua o alimento no se interrumpe en el animal. La paresia posterior y el severo desgaste muscular se han asociado con la última fase de la enfermedad antes de presentarse la muerte (Neuschl et al., 1999). Ocasionalmente, los conejos pueden presentar manifestaciones agresivas, brincos desordenados y automutilación (Künzel y Joachim, 2009). Estas manifestaciones clínicas se generan a raíz del daño directo a las células nerviosas ocasionado por la liberación de las esporas de *E. cuniculi* en el tejido cerebral (Al-Sadi y Al-Mahmood, 2014). Las manifestaciones renales varían desde escaldamiento urinario en la región perineal y parte medial de los muslos, hasta disuria, incontinencia urinaria, azotemia e incremento en los niveles de creatinina plasmática o sérica (Suter et al., 2001). Otras manifestaciones clínicas asociadas indirectamente al daño crónico renal es la pérdida de peso, polidipsia, poliuria y urolitiasis. La presentación ocular incluye la formación de cataratas, hipopión y uveítis, principalmente en conejos jóvenes. Un gran porcentaje de animales con enfermedad intraocular son diagnosticados con *E. cuniculi* mediante pruebas serológicas, histopatológicas y por PCR. Las lesiones oculares en la encefalitozoonosis se deben a la ruptura de los lentes oculares. La capsula anterior del cristalino se rompe espontáneamente y causa una reacción granulomatosa zonal y uveítis. La mayoría de las veces la lesión en el cristalino es

unilateral. Se ha sugerido que las lesiones oculares solamente ocurren intrauterinamente, cuando la cápsula de los lentes en desarrollo es muy delgada o ausente (Künzel y Joachim, 2009).

2.4.2. Lesiones

Las lesiones en el encéfalo a nivel macroscópico son inaparentes, mientras que a nivel microscópico, estas corresponden con una meningoencefalomielitis no supurativa y granulomatosa, con astrogliosis e infiltrado linfocítico perivascular. Las lesiones son más frecuentes en la corteza del encéfalo y en la médula espinal, pero pueden observarse en el tallo cerebral y cordón espinal, y menos frecuentemente en el cerebelo (Rosell, 2000). Las esporas se observan como una colección de microorganismos dentro de las células astrogliales o diseminadas dentro de focos granulomatosos (Percy y Barthold, 2009). Los granulomas contienen linfocitos, células plasmáticas, células gliales y necrosis central. El daño al tejido renal a nivel macroscópico incluye áreas de cicatrización y áreas deprimidas pálidas o rojizas en la superficie externa de corte del riñón y que pueden extenderse hasta la médula renal (Künzel et al., 2008), mientras que microscópicamente se evidencia una nefritis intersticial granulomatosa multifocal con infiltrado por células mononucleares, necrosis y descamación de células epiteliales tubulares con mínimo daño glomerular. Asimismo, esta lesión se acompaña de diversos niveles de fibrosis. Ocasionalmente, las esporas pueden observarse en el epitelio o en el lumen de los túbulos renales, en macrófagos o en la reacción inflamatoria. La lesión ocular más importante es la uveítis facoclástica, la cual se caracteriza por presencia de esporas en la lente y una severa infiltración en el

cristalino por células granulocíticas, macrófagos y células gigantes (Giordano et al., 2005). Asimismo, el iris y los procesos ciliares pueden contener un infiltrado por células plasmáticas y linfocitos. Esta severa respuesta inflamatoria puede conducir a una ruptura del lente (Richardson, 1999).

2.5. Diagnóstico de laboratorio de *Encephalitozoon cuniculi*

El diagnóstico definitivo de *E. cuniculi* in vivo es difícil, ya que los signos clínicos de un padecimiento neurológico o renal pueden confundirse con otros. Un diagnóstico presuntivo se obtiene por una combinación de exámenes clínicos, ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), inmunológicos, histológicos, citológicos, coprológicos, urológicos, moleculares, inmunohistoquímicos e histoquímicos (García, 2002).

2.5.1. Microscopía electrónica de transmisión

La identificación de *E. cuniculi* y sus propiedades taxonómicas han sido realizadas mayormente mediante el análisis de sus características ultraestructurales. La localización de *E. cuniculi* en tejidos mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) es hasta la fecha la mejor técnica para identificar las esporas; sin embargo, esta técnica no está disponible en todos los laboratorios (Abu-Akkada, 2014). La sensibilidad de MET no puede ser igualada cuando se compara con análisis de biopsias, citologías, copro o urodiagnóstico. La morfología de los microsporidios es única y patognomónica para el filo y es debido a esto que la MET es realmente útil para la asignación de los variados géneros de

Encephalitozoon. La estructuras de la espora de *E. cuniculi* y el desarrollo de sus etapas como la merogonia y esporogonia, se estudian mucho mejor con la ayuda de éste instrumento, debido a que son organismos muy pequeños y se encuentran dentro de una célula (Joseph, 2006). No obstante y a pesar de que MET es considerada como la técnica de oro, estándar para el diagnóstico y confirmación de *E. cuniculi*, otras técnicas son necesarias para determinar los genotipos de este microorganismo, como técnicas moleculares (Ghosh et al., 2014). Una limitante de utilizar MET es su baja sensibilidad, pues solo puede utilizarse una pequeña cantidad de la muestra, lo que significa un considerable margen de error en el muestreo (Abu-Akkada, 2014).

2.5.2. Estudios inmunológicos

Existen 2 tipos de análisis inmunológico para el diagnóstico y detección de *E. cuniculi* en individuos infectados y en individuos aparentemente sanos: técnicas basadas en la detección de Ag y las basadas en la detección de Ac.

1) Detección antigénica. Se emplean Ac de animales inmunizados experimentalmente para detectar determinantes antigénicos específicos del agente patógeno. Para el caso de *E. cuniculi*, se emplean las técnicas de inmunofluorescencia (IFA), ELISA y Western Blot (WB). Las técnicas de ELISA y WB examinan al Ag completo o un homogenado del agente patógeno. Los Ac pueden ser policlonales o monoclonales. Existen Ac contra *E. cuniculi* en el mercado (Furuya et al., 2007), los cuales van dirigidos contra la pared de la espora o el tubo polar. Desafortunadamente, muchos de esos Ac han demostrado tener inmunidad cruzada contra otros microsporidios.

2) Detección de Ac. Existen pruebas serológicas encaminadas a detectar Ac contra *E. cuniculi* en varias especies animales, incluyendo al conejo, entre las técnicas más utilizadas se encuentran ELISA, inmunoblot y aglutinación (CIA) (Jordan et al., 2006). La utilidad de estas pruebas reside en la detección de las infecciones subclínicas en donadores de transplante prospectivos o en individuos que pueden estar en riesgo de una reactivación de la infección debido a un problema en la respuesta inmune.

2.5.3. Histología

Encephalitozoon cuniculi en conejos usualmente sigue un curso crónico, ya que toma semanas o meses para desarrollar una significativa carga parasitaria, la cual puede conducir o no a la presentación de signología clínica. Las esporas de *E. cuniculi* son difícilmente discernibles (Csokai et al, 2008), por varias razones: 1) las esporas no son teñidas con los colorantes habituales y los resultados son impredecibles. Frecuentemente, las esporas de *E. cuniculi* teñidas con Hematoxilina y Eosina (HE) se observan refráctiles, transparentes y poco nítidas, por lo que solamente personal entrenado puede reconocerlas, ya que pueden ser confundidas con protozoarios, bacterias, e incluso con material necrótico o artefactos (Giordano et al., 2005). 2) Otro factor que dificulta el diagnóstico, es el pequeño tamaño de la espora. Para el reconocimiento de las esporas es necesario utilizar el objetivo de inmersión 100X. 3) Las esporas pudieran no ser reconocidas debido a la intensa respuesta inflamatoria adyacente, la cual está caracterizada por una severa reacción multifocal granulomatosa. Además, el centro de estos granulomas contiene tejido necrótico, el cual está rodeado por células como:

linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, y en el área más externa, está cubierto por una capa de tejido conectivo fibroso. 4) Las lesiones pueden ser desde inaparentes a discretas hasta severas y pueden variar significativamente en individuos inmunocomprometidos o que reciben algún tratamiento inmunosupresor. 5) La secuencia de lesiones en el conejo infectado. A las pocas semanas de infección las primeras alteraciones discernibles se observan en los riñones, pero después de 15 semanas, las lesiones más significantes se observan en el encéfalo. Después de ese tiempo las lesiones decrecen y las esporas pueden estar ausentes en esos órganos (Zietek et al., 2014).

2.5.4. Citología

La encefalitozoonosis, así como otras microsporidiosis, involucran una invasión hacia membranas mucosas o tejido. Las muestras a considerar para el diagnóstico citológico incluyen el epitelio digestivo, corneal o conjuntival, traqueobronquial, renal y vesical (Csokai et al., 2008). El diagnóstico citológico puede llevarse a cabo mediante improntas o frotis tomados directamente del tejido o de biopsias. Siempre debe usarse el objetivo de 100X (inmersión) para observar las esporas de *E. cuniculi*. Igualmente, análisis citológicos de fluidos corporales como esputo, descarga nasal, líquido bronquiolo-alveolar, fluido ascítico y cefalorraquídeo, pueden llevarse a cabo mediante un muestreo directo centrifugado y después tñirlo con Giemsa el sedimento y colocarlo en una laminilla (Lallo et al., 2016).

2.5.5. Coproparasitoscópico y urodiagnóstico

Las tinciones más utilizadas para la determinación de esporas en heces y orina de conejos sospechosos de encephalitozoonosis son el azul de tricromo (Weber et al., 2000) y calcofluor White (Luna et al., 1995). Por otro lado, los procedimientos parasitológicos utilizados de manera rutinaria para concentrar huevos y parásitos no son de utilidad para encontrar las esporas de microsporidios en heces y orina. La toma directa de heces o sedimento urinario después de la centrifugación (1,500 x g / 10 minutos/ 4°C), parecen ser las técnicas más adecuadas para encontrar esporas en esas muestras (Accoceberry y D'Almeida-Fourquet, 2012). Generalmente, las esporas de *E. cuniculi* son más fáciles de identificar en fluidos corporales (orina, líquido cefalorraquídeo, etc.), que en excremento, debido a la ausencia de bacterias y detritos. Es recomendable llevar a cabo controles positivos para facilitar la identificación de las pequeñas esporas de *E. cuniculi* (1-2.5 µm), así como utilizar una combinación de tinciones cromotrópicas y quimiofluorescentes. Sin embargo, los agentes quimiofluorescentes pueden arrojar falsos positivos, ya que pueden reaccionar con levaduras y material vegetal (Didier et al., 1995). Otras tinciones recomendadas en el examen coproparasitoscópico y urodiagnóstico son Giemsa, Ziehl-Neelsen y Gram (Aldras et al., 1994).

2.5.6. Métodos moleculares

Los métodos moleculares utilizados para el diagnóstico de *E. cuniculi* en los cuales se involucra la utilización de PCR, poseen la característica de ser más rápidos y sensibles que la microscopía o serología; aunque, en medicina veterinaria no han sido utilizados extensivamente (Reabel, 2012). Para patógenos

como *E. cuniculi*, las pruebas con PCR se basan en la amplificación del ADN de esporas inmersas en la orina u otro fluido corporal, así como aquellas esporas maduras o en etapas intracelulares que estén presentes en los tejidos. Utilizando primers para amplificar porciones del gen del RNA de la subunidad menor ribosomal (SSU-rRNA), se logra incrementar la sensibilidad y especificidad de esta prueba, en comparación con métodos de detección no moleculares (Garcia, 2002; Weber et al., 2000; Weiss, 2000).

La sensibilidad de una prueba de PCR para *E. cuniculi*, recae en la calidad y cantidad del ADN extraído del microsporidio (Ghosh y Weiss, 2009). En conejos, la técnica de PCR es comúnmente utilizada en laboratorios de investigación animal, mientras que en laboratorios de diagnóstico clínico no se considera una prueba de rutina, debido a la falta de su estandarización como prueba de diagnóstico para *E. cuniculi* (Garcia, 2002).

Se han logrado avances considerables mediante la secuenciación de ADN en unos cuantos microsporidios, incluyendo *E. cuniculi* (Abu-Akkada, 2014). Existen reportes de detección de marcadores de este microsporidio mediante técnicas de PCR en biopsias intestinales o de muestras frescas tomadas inmediatamente después de la necropsia (Csokai et al., 2009) así como de la utilización de PCR en tiempo real (RT-PCR) para la detección de esporas en orina de conejo (Hester et al., 2002). Aunque esta última técnica se ha caracterizado por ser capaz de detectar cantidades tan pequeñas como 10 esporas por mililitro (Jeklova, 2010), se requiere del establecimiento y estandarización de las técnicas moleculares para determinar la presencia de esporas de *E. cuniculi* en conejos infectados.

2.5.7. Inmunohistoquímica e Inmunofluorescencia

Las técnicas de inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia (IFA) se han ubicado en un lugar importante en el diagnóstico de padecimientos patológicos. Actualmente, la identificación de epítomos es un proceso rutinario en tejidos embebidos en parafina, utilizando un Ac específico y un apropiado sistema de marcaje (Ghosh et al., 2014). El fundamento básico de la IHC es la interacción de un Ac con un Ag en un tejido o muestra citológica. Posteriormente, el sitio de interacción Ac es identificado por marcaje directo del mismo, o empleando un Ac secundario marcado o conjugado con biotina. En el caso de IFA, el procedimiento es exactamente el mismo, solo que el marcaje del Ac primario o secundario se realiza con un agente fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) y la identificación del Ag se realiza mediante el uso de un microscopio de luz UV (Habenbacher et al., 2012). En el caso de la identificación de microsporidios mediante IHC o IFA, anticuerpos monoclonales o policlonales biotinilados (ABC) o marcados con fluoresceína, estas técnicas han sido recomendadas como métodos de identificación de esporas en tejidos embebidos en parafina (Cox et al., 1977; Abu-Akkada, 2014). Tanto la IHC como IFA puede ser recomendada para la identificación específica de *E. cuniculi* en las muestras de tejidos, como el ojo, cerebro y riñón, y ha resultado útil para la demostración específica del patógeno y su localización en los tejidos; sin embargo, se requiere de pericia y personal especializado para su realización (Giordano et al., 2005).

2.5.8. Histoquímica

Utilizando únicamente la tinción de HE, las esporas de *E. cuniculi* aparecen pálidas, mal definidas y rodeadas por un halo de quitina (pared de la espora), las cuales no logran teñirse, razón por la cual pueden confundirse con levaduras. La falta de gemación pudiera ayudar a la diferenciación entre esporas de *E. cuniculi* y estos hongos; sin embargo, los detalles o características morfológicas de la espora, como el tubo polar, no son visibles con esta tinción (Didier et al., 1995). Se han utilizado una variedad de metodologías en tinciones especiales para demostrar las esporas en tejidos fijados con formol y embebidos en parafina. La birrefringencia es observable en muchas tinciones y resulta de la presencia de quitina en la endospora. Esta propiedad se ha observado con muchos microsporidios al ser teñidos con Gram y Warthin-Starry, siendo las tinciones recomendadas por la literatura, por los adecuados resultados con la mayoría de las esporas microsporidianas y son las confiadas para tejidos embebidos en parafina (Garcia, 2002). Otras tinciones recomendadas son PAS, la cual tiñe la vacuola posterior de un color violeta y la de Ziehl-Neelsen, que tiñe de rojo la espora microsporidiana. Sin embargo, para las esporas de *E. cuniculi* se han utilizado algunas tinciones especiales tales como: Azul Alciano, Calcofluor White, Giemsa, Gram, Grocott, Luna, Luxol Azul, Tricromico de Mason, Azul de Tricromo, Acido Peryodico de Schiff, VanGieson, Warthin-Starry y Ziehl-Neelsen.

2.6. Granuloma

El granuloma, está constituido por una colección focal y compacta de células inflamatorias, predominando las células mononucleares. Este es el resultado de

varios mecanismos de protección tisular y es formado cuando el proceso inflamatorio agudo no es capaz de destruir el agente invasor (Zumla y James, 1996). Esta estructura es la secuela de una compleja interacción entre un organismo invasor o antígeno, químico, droga u otro irritante, una prolongada antigenemia o actividad de macrófagos, una respuesta de linfocitos CD4⁺ (T_{H1} y T_{H2}), reactividad excesiva de células B, complejos inmunes circulantes y un vasto arraigo de mediadores biológicos (James, 2000). El granuloma es un sitio activo de numerosas enzimas y citocinas, que con el tiempo serán remplazadas por fibronectina y factores de reparación. Originalmente se sabe que las áreas de inflamación o actividad inmunológica atraen macrófagos, los cuales pueden fusionarse, formando células gigantes multinucleadas y células epitelioides a partir de éstos (inflamación granulomatosa). Existe una estrecha relación entre poblaciones de macrófagos activados que expresan un incremento en sus moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y de linfocitos CD4⁺ (Zumla y James, 1996). Estas últimas células, llamadas también células T cooperadoras, reconocen los péptidos proteicos que las células presentadoras expresan en sus moléculas MHC II; induciendo a la producción de interleucina 1 (IL-1) y TNF- α (Factor de necrosis tumoral alfa) por parte de los macrófagos. Posteriormente, una cascada de factores quimiotácticos como la proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1/CCL2), la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 α) y RANTES/CCL5 promueven la granulomagénesis. Entre tales elementos se encuentran también citocinas como interferón gamma (IFN- γ), que incrementa la expresión de la molécula MHC II en macrófagos, así como la externalización de la fracción cristalizable (Fc) de inmunoglobulinas G

(IgG) que potencializará la habilidad fagocítica de estos (Broos et al., 2013). El resultado final es el granuloma epitelioides, el cual progresará bajo la influencia de otros factores a una fibrosis (James, 2000). La activación de las células T cooperadoras (T_H1) también requiere de la activación de ciertas vías coestimuladoras como la B7:CD28/CTLA (Epstein et al., 1996). La sobreestimulación de T_H1 , conlleva a una pronunciada hiperreactividad mediada por células, destrucción de tejido y formación de granulomas (inmunidad tipo T_H1). Mientras que una respuesta T_H2 que supere las influencias de T_H1 , se desencadena en una anergia y apoptosis que puede ser revertida con agonistas de CD28 (Zumla y James, 1996) (inmunidad tipo T_H2).

2.6.1 Tipos de granuloma

Se han establecido numerosas clasificaciones, identificando la variedad de granulomas que se pueden desarrollar en el organismo y en las cuales se pretende comprender las distintas presentaciones u orígenes que esta estructura puede tener. Las clasificaciones se han realizado en base al origen del estímulo inicial (James, 2000) y comprendiendo, infecciones, vasculitis, aberraciones inmunológicas, defecto en la oxidasa de leucocitos, neumonía por hipersensibilidad, químicos y neoplasias. Además de clasificaciones a partir del agente etiológico causal (Zumla y James, 1996) o la distribución de las células participantes (morfológica) (Zachary y McGavin, 2012), esta última, señala tres factores que participan en el desarrollo de un granuloma: el agente incitante, usualmente relacionado con antígenos persistentes, indigestibles o pobremente degradables (ej., *Mycobacteria spp.*); la respuesta inmune del hospedador (ej., tipo

de respuesta T_H o de macrófagos); la interacción entre las citocinas, quimiocinas y otros mediadores pro y anti-inflamatorios producidos por las células ubicadas dentro de la lesión inflamatoria crónica. Tal clasificación se utilizará en el presente escrito y se explicará en el apartado siguiente.

2.6.1.1. Nodular o tuberculoide (Granulomas tipo T_H1)

Los granulomas causados por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* o por infecciones micóticas profundas (coccidioidomicosis), son claros ejemplos de granulomas nodulares o tuberculoideos. Macroscópicamente, el granuloma nodular se describe de color gris o blanco, redondo u oval y de firme a duro. Se desarrolla como resultado de una respuesta linfocítica del tipo T_H1 , evidenciándose microscópicamente la presencia o ausencia de un centro necrótico (granuloma caseoso o no caseoso, respectivamente). Ambas presentaciones describen a un granuloma nodular, compuesto en su parte media por numerosos macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas. En la periferia o capa más externa, se pueden encontrar fibroblastos, linfocitos y células plasmáticas (Zachary y McGavin, 2012). Se considera que en este tipo de granulomas predominan las citocinas IL-2, IL-12, 1L-17, TNF- α e IFN- γ (Qiu et al., 2001; Yamamura, 1992), así como las quimiocinas RANTES (Regulado en activación, expresado y secretado en células T normales) y CCL19 (Wangoo et al., 2001) es decir, un microambiente pro-inflamatorio con actividad fagocítica activa. En modelos murinos infectados con tuberculosis, la secreción de las citocinas T_H1 activa a los macrófagos lo cual genera que estos predominen en el microambiente del granuloma nodular. Este fenotipo celular tiene la capacidad de eliminar las

bacterias presentes en el citoplasma, ya que producen óxido nítrico sintasa (iNOS), enzima que cataliza la síntesis de óxido nítrico (NO), el cual es inducido por IFN- γ (Miranda et al., 2012). Otras poblaciones derivadas de los monocitos y presentes en este microambiente son las células gigantes multinucleadas (MGC) y las células dendríticas derivadas de monocitos (mDCs). En donde la previa diferenciación de los macrófagos a MGC se da una vez que estas son estimuladas mediante sus receptores parecidos a Toll-2 (TLR-2), mientras que las mDCs mantienen una elevada expresión de receptores MHC II (Miranda et al., 2012). En cuanto a poblaciones linfocíticas, en ratones con tuberculosis se han identificado porcentajes de células T CD4⁺ de hasta 70%, mientras el resto corresponden en su mayoría a células T CD8⁺ (Tsai et al., 2006).

2.6.1.2. Granuloma difuso o lepromatoide (Granuloma tipo T_H2)

En el humano, *Mycobacterium leprae* produce agregados de macrófagos no caseosos con células de la respuesta inflamatoria crónica, lo mismo se observa en bovinos y ovinos con la enfermedad de Johne (*Mycobacterium avium*) (Zachary y McGavin, 2012) y en ratones infectados con huevos de *Schistosoma mansoni* (Chensue, 1997). Estas lesiones son pobremente delimitadas, comprenden una amplia distribución y son consistentes con una respuesta linfocítica del tipo T_H2, poseen una importante carga bacteriana intracelular, poca presencia de linfocitos, numerosos macrófagos alrededor de un límite poco diferenciado y distintos grados de fibrosis (Zachary y McGavin, 2012). Las citocinas predominantes en el granuloma del tipo T_H2, son consistentes con el desarrollo de un perfil anti-inflamatorio, identificándose a TGF β , IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Vaquero et al.,

2010). Estas citocinas inducen la diferenciación de macrófagos hacia macrófagos activados alternativamente (AAM), los cuales producen citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- β) y arginasa, esta última compete con iNOS en la utilización de L-arginina como sustrato. Aunado a este efecto, las citocinas IL-4, IL-10 e IL-13, activan la proliferación de linfocitos B (Miranda et al., 2012), generando una marcada respuesta humoral, mientras que la producción de IL-5 promueve la proliferación de eosinófilos y la quimiotaxis de basófilos. Se sabe que la proliferación de linfocitos T_{H1} se genera solamente con la presencia de IL-2, en cambio la proliferación de linfocitos con fenotipo T_{H2} es independiente de esta mientras que la IL-4 se encuentre en el microambiente. Por lo tanto, en las situaciones clínicas en las que esta citocina es limitada (pacientes con ciclosporina o glucocorticoides), solo los linfocitos T_{H2} serán capaces de propagarse en respuesta a un antígeno (Miranda et al., 2012). En ratones, este efecto se observa también bajo un estrés sistémico severo o tras una inoculación microbiana exacerbada, en donde el sistema inmune monta una respuesta del tipo 2 en contra de infecciones que normalmente se controlarían con una inmunidad del tipo 1 (Spellberg y Edwards, 2001).

2.6.1.3. Granuloma Microsporidiano

La infección por *E. cuniculi*, se caracteriza por la formación de lesiones granulomatosas en encéfalo y riñón, provocando una encefalomielitis granulomatosa multifocal no supurativa y una nefritis granulomatosa multifocal, respectivamente (Rodriguez-Tovar, 2016). Los granulomas están compuestos de un centro necrótico, rodeado de macrófagos y/o células gigantes, linfocitos, células

plasmáticas y fibroblastos (Csokai et al., 2008), lo cual coincide con las características descritas en el granuloma nodular o tuberculoide (tipo T_H1). Durante el examen histopatológico en conejos con encefalitozoonosis se pueden ubicar las esporas en los focos de necrosis encefálicas delimitados por una reacción inflamatoriagranulomatosa (Owen, 1992; Rodríguez-Tovar et al., 2016), en donde se observan abundantes linfocitos, células plasmáticas, células de la glía y abundantes “manguitos” perivasculares. Este tipo de lesión puede observarse principalmente en el cerebro, aunque también en el cerebelo y en el bulbo raquídeo. En los riñones, las lesiones granulomatosas con estas características también son típicas (Richardson, 1999; Rodríguez-Tovar et al., 2016).

Al utilizar ratones noqueados para los genes de ciertas citocinas, se ha validado la importancia de T_H1 en la respuesta inmune contra *E. cuniculi*, mientras que la producción de citocinas de perfil T_H2 se ha categorizado como mínima (Khan et al., 2001). Al tomar en cuenta la importancia de IL-4 en el montaje de una respuesta del tipo T_H2, se han evaluado los niveles de ARN mensajeros (mARN) presentes en esplenocitos de ratones con encefalitozoonosis, así como la presencia de la citocina en los sueros de estos, reportando niveles indetectables en ambos casos. Sin embargo, en los mismos esplenocitos se reportó un incremento de los mARN para IL-10 (Khan y Moretto, 1999), una potente citocina T_H2 capaz de regular la respuesta inmune tipo T_H1 en otros modelos animales (Scharton-Kersten et al., 1995), lo cual sugiere que en infecciones con *E. cuniculi* se podrían generar respuestas similares. En cuanto a las poblaciones de linfocitos presentes durante la encefalitozoonosis, en esplenocitos de ratones infectados se

han registrado incrementos en el número de células T CD8⁺, mientras que el número de células T CD4⁺ no mostraron un cambio aparente (Khan et al., 1999). Sin embargo, no se ha encontrado información que describa las características presentes en el microambiente (citocinas y fenotipo de células presentes) del granuloma microsporidiano en conejos.

2.7. Marcadores de superficie

Los marcadores de superficies celulares o antígenos de superficie celular, son proteínas expresadas en la superficie de las células, estas moléculas son convenientemente utilizadas como etiquetas de tipos específicos de células. Por ejemplo, los marcadores de superficie de linfocitos T, para identificar sus linajes y etapa de su proceso de diferenciación. La importancia de conocer el subtipo celular de las células a estudiar, en este caso los linfocitos (CD4 y CD8) o células presentadoras de antígeno (MHC II), recae en los procesos biológicos específicos que estas realizan y su contribución a las distintas respuestas inmunológicas en los que se les involucra. La presencia de ciertos marcadores de superficie también puede determinar si una célula expresa el receptor específico para alguna respuesta biológica, asegurando que su respectivo ligando será reconocido por el tipo celular de interés (Lydyard et al., 2011).

Los linfocitos T maduros expresan solo uno u otro de los antígenos de superficie celular, CD4 o CD8 y cuyos roles se discutirán más adelante, por otro lado, las células presentadoras de antígeno exponen la molécula MHC II. Este antígeno de

superficie se asocia con el receptor de células T (TCR) ubicado en linfocitos que poseen el marcador CD4 (ver más adelante) (Todd, 2015).

2.7.1. Marcador de superficie CD4

La glucoproteína CD4, se encuentra presente en la superficie celular de cierta subpoblación de linfocitos T (células T CD4⁺). Dicha población incluye las células cooperadoras o T_H, involucradas en la interacción cooperativa con células T_H2 o T_H1 (Todd, 2015). Esta molécula interactúa con el antígeno presentado por la proteína MHC II. Por lo tanto, la presencia de CD4⁺ en un linfocito T, indica que su receptor de célula T (TCR) reconoce un péptido en la región variable de una molécula de MHC II (Luckheeram et al., 2012), ubicada en la superficie de una célula presentadora de antígeno (CPA). La apropiada formación de este complejo (CD4⁺/TCR/ antígeno/MHC II), resulta en la aproximación de elementos citoplasmáticos que se asocian con CD4⁺ y TCR, generando señales intracelulares que activarán al linfocito (Harrison, 1993). El marcador CD4 de conejo (RbCD4) posee un peso molecular estimado de 48 kDa y un punto isoeléctrico de 9.5, así como regiones hidrofóbicas e hidrofílicas en su estructura. Estas últimas se presentan en espacios extensos de su secuencia, que al compararse con la de moléculas CD4 de ratón, gato y humano, muestran una marcada conservación de esta propiedad (Hague et al., 1992). En la porción del citoplasma, los residuos intracitoplasmáticos de serina que ejercen como objetivo de fosforilación y la región de unión a p56lck también se encuentran conservados entre la molécula CD4 de humano y RbCD4 (Turner et al., 1990), siendo identificadas estas estructuras como necesarias para la fosforilación de CD3 y las cadenas ζ de TCR,

por parte de la molécula tirosina proteín quinasa p56lck que conlleva a la posterior cascada de activación de tirosina (Veillette et al., 1991). Esta cascada de activación genera la movilización de iones de calcio intracelular (Ca^{2+}) y la activación de cascadas de señalización dentro del linfocito, entre las que se incluyen las vías Ras-MEK-ERK, que resulta en la activación de factores de transcripción como NFAT, NF- κ B, AP-1 (Chiang y Sefton, 2001), los cuales regulan la producción génica de múltiples moléculas. El tipo de diferenciación a experimentar (T_H1 o T_H2) por parte de las células T CD4^+ se da en torno al microambiente generado por las citocinas (IL-2, IL-4, IL-6 o IL-12), la concentración de antígeno, el tipo de CPA y las moléculas coestimuladoras presentes (Luckheeram, 2012). Una vez activadas, las células T CD4^+ producen una importante cantidad de las citocinas IFN- γ (T_H1) o IL-4 (T_H2) (Zhu y Paul, 2008).

2.7.2. Marcador de superficie celular CD8

La segunda mayor categoría de linfocitos T se define por aquellos que presentan el marcador CD8 (células T CD8^+) y que corresponden a los linfocitos T citotóxicos o CTC, los cuales poseen importantes funciones efectoras en las reacciones inmunes mediadas por células (Todd, 2015). La molécula CD8 en roedores, se compone por dos cadenas denominadas alfa (α) y beta (β), las cuales se muestran como un heterodímero *alfa/beta* unido por puentes de disulfuro, mientras que en el humano solo se expresan cadenas alfa unidas por los mismos puentes (Shiue, 1988). En su porción intracitoplásmica, la cadena alfa sirve de sitio de anclaje para la asociación con p56lck, lo que da como resultado la interacción de esta con el

complejo CD8/TCR, que a su vez interacciona con el antígeno contenido en la molécula del MHC I expresada en la superficie de la célula blanco. Al igual que CD4, la molécula CD8 potencializa la respuesta generada por la unión de TCR con la molécula de MHC, así como la afinidad por el antígeno contenido en este último (Wallace et al., 1993) y la posterior activación de la CTC. Una vez que las CTC son activadas, estas ejercen tres funciones principales: la secreción de las citocinas TNF- α e IFN- γ , la producción y liberación de gránulos citotóxicos conteniendo proteínas (perforinas y granzimas) y la destrucción de células infectadas mediante la interacción Fas/FasL (Todd, 2015).

2.7.3. Marcador de superficie celular MHC II

A diferencia de MHC I, la molécula MHC II no se expresa en todas las células del organismo; está presente solo en las CPA (ej. Macrófagos, linfocitos B y CD). Como se mencionó anteriormente, los TCR de células T CD4⁺, reconocen péptidos antigénico específicos solo cuando estos se encuentran asociados a una molécula MHC II en la superficie de una CPA (Todd, 2015). Esta glucoproteína está constituida por dos cadenas polipeptídicas glicosiladas, una pesada α y una ligera β . Sus porciones extracelulares contienen dos dominios (α 1 y α 2 ó β 1 y β 2) están conectadas mediante una corta secuencia a una región transmembranal para terminar con un dominio citoplasmático (Holling et al., 2004). Los dominios α 1 y β 1 poseen un gran polimorfismo, mientras que los dominios α 2 y β 2 tienen una homología estructural con la región constante de las inmunoglobulinas. El conejo, posee cinco genes distintos que codifican su cadena pesada α (Leguern et al., 1985), siendo una variedad casi tan amplia como la del humano. Además de su

función en la presentación de péptidos antigénicos, la molécula de MHC II, ejerce como una molécula de señalización en la CPA (Bishop, 1991). En la unión de MHC II de células B de ratón con Ac o con el TCR de un linfocito T cooperador, se generan señales que pueden afectar el estatus o supervivencia de dicha célula. Este marcador de superficie transduce señales como la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), que lleva a la activación de tirosín quinasa, hidrolisis lípida de inositol y movilización de Ca^{2+} , además de inducir un incremento en las actividades de ERK 1/2, AP-1 y NF- κ B. Lo cual da como resultado, el incremento de moléculas coestimuladoras, como CD86, incremento en la adhesión célula a célula mediante el aumento de LFA-1, inducción a la diferenciación de células B y muerte celular (Nashar y Drake, 2006). Se ha reportado también que en ratones, la deficiencia de MHC II atenúa la producción de citocinas proinflamatorias e interferón tipo 1, originados por la estimulación de TLR en macrófagos y CD (Liu et al., 2011).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales para el Estudio

Se utilizaron 40 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de las razas California y Nueva Zelanda, tanto hembras como machos, con un peso promedio de 1 Kg y con una edad de entre 1-4 meses. Veinte animales provenían del Centro de Especies Menores (CEM), ubicado en el municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, en Tlaxcala, México (19°19'N 98°22'O), los cuales conformaron los grupos control C y D, no infectados (ver apartado 3.2). Los veinte animales requeridos para los grupos infectados de manera natural (grupos A y B), se consiguieron en centros de producción ubicados en el área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León (25°40'N 100°18'O). Para el criterio de selección de los animales infectados con este patógeno, se utilizaron los análisis serológicos, orina y coprológicos (Ghosh et al., 2014; Künzel y Joachim, 2009) evidenciando de una manera confiable la presencia o ausencia de este microsporidio en los conejos del estudio y en base a esto, crear el acomodo del diseño experimental (ver apartado 3.2). Los animales se mantuvieron con agua purificada y alimento *ad libitum*, con periodos de luz/oscuridad de 12 hr. Estos animales fueron alojados en la Unidad de Experimentación Animal, del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), UANL. Las condiciones se mantuvieron de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio. Se manejó un periodo de cuatro días de reposo antes del inicio del experimento.

3.2. Diseño del Experimento

La conformación de los grupos para el experimento se realizó tomando en cuenta el estado inmunológico de los animales, así como la presencia o ausencia de la infección (Cuadro 1). De este modo, se formaron cuatro grupos (A, B, C y D), con 10 animales cada uno. El grupo A, conformado por animales infectados con *E. cuniculi*. El grupo B, se formó con animales a los que se les indujo una inmunosupresión y que a su vez estaban infectados. Los animales del grupo C recibieron solamente el tratamiento de inmunosupresión y en los cuales la infección se encontraba ausente. Por último, el grupo D se utilizó como grupo control, el cual estaba conformado por animales sanos. Para la inmunosupresión mencionada anteriormente, los animales de los grupos B y C, fueron tratados con tres aplicaciones de dexametasona (Bursol, Laboratorios Brovel, México) a razón de 6.5 mg/kg/IM (Jeklova et al., 2008), cada 7 días y utilizando jeringas de 3ml (Terumo, Japón). Mientras que a los animales del grupo D, solamente se les aplicó 3ml de solución salina fisiológica (SSF) conteniendo 0.9 de cloruro de sodio (Solución CS Pisa, Pisa Agropecuaria, México) en el mismo intervalo de aplicaciones (Cuadro 2) y con el mismo tipo de jeringa.

Cuadro 2.- Diseño del experimento. Grupos utilizados y las características de cada uno.

Grupos y características	Número de animales	Tratamiento
A Infectados	10	Ninguno
B Infectados e inmunosuprimidos	10	6.5mg/Kg Dexametasona IM a los días 4, 11 y 18.
C Inmunosuprimidos	10	6.5mg/Kg Dexametasona IM a los días 4, 11 y 18.
D Control	10	1ml Solución salina fisiológica IM a los días 4, 11 y 18.

3.2.1 Anestesia y eutanasia de los animales

Este procedimiento se llevó a cabo el día 4 para los animales del grupo A, mientras que para los grupos B, C y D se realizó hasta el día 25 del experimento (Figura 1). Primeramente se realizó la sedación y/o anestesia, donde los conejos recibieron una combinación de Tiletamina y Zolacepan (Zoletil 100, Virbac, Francia) a una dosis de 20 mg/kg/IM y utilizando jeringas de 1ml (Terumo, Japón). En este periodo se extrajeron las muestras de orina por punción suprapúbica y la sanguínea por punción intracardiaca (ver apartado 3.3.1) con jeringas de 5ml (Terumo, Japón). Una vez extraídas las muestras, cada animal fue colocado en un recipiente plástico transparente de boca ancha conteniendo torundas impregnadas en éter etílico anhidro (Jalmek, México) hasta inducir paro respiratorio.

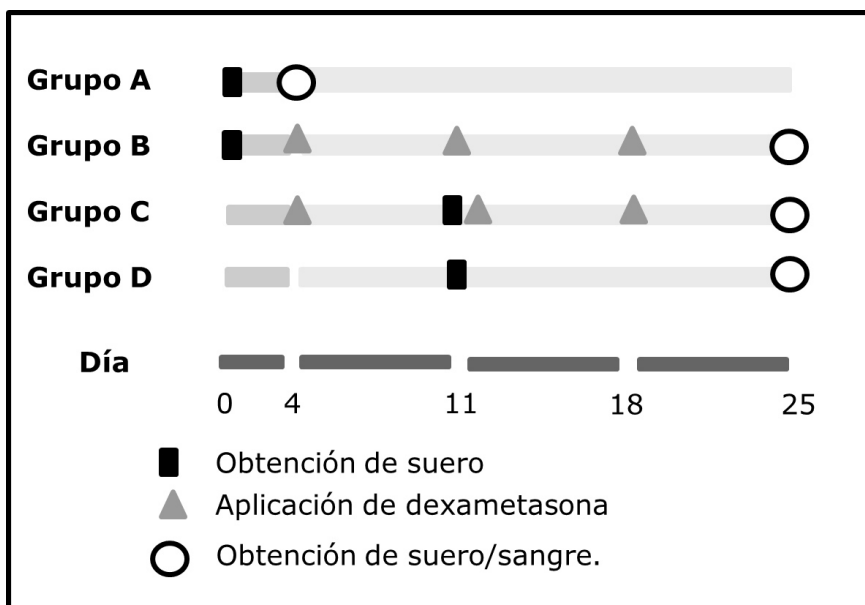


Figura 3.- Cronología del experimento y las actividades realizadas en este. El arribo de los animales se identificó como el inicio del experimento (día 0) y la finalización de este, como el día 4 para el grupo A y día 25 para los grupos B, C, y D. El periodo que comprende desde el día 0 hasta el día 4 fue tomado como periodo de aclimatamiento. El tratamiento de inmunosupresión en los grupos B y C comenzó el día cuatro y fueron repetidos los días 11 y 18 (triángulos). A cada grupo se le realizó un muestreo serológico en el transcurso del experimento (rectángulos). El procedimiento de toma de muestra sanguínea/ suero y eutanasia, se hizo al final de cada experimento (círculos).

3.3. Colección, Preservación y Procesamiento de las Muestras

3.3.1 Orina y heces

Las muestras de orina de cada conejo fueron colectadas durante el periodo de anestesia mediante una punción suprapúbica utilizando jeringas de 5ml, y depositadas en frascos de plástico que fueron almacenados a -20°C. Las heces se colectaron durante la necropsia del animal, directamente tanto del intestino delgado como el grueso. Estas muestras se colocaron en un bote plástico conteniendo formaldehído amortiguado al 10% con PBS (pH 7.4) para su fijación y almacenadas a temperatura ambiente.

3.3.2 Muestras sanguíneas

Se realizaron dos extracciones de sangre en todos los conejos; la primera, dos semanas antes de la eutanasia y la segunda, durante la fase de tranquilización previa a la eutanasia de los animales, tal y como se mencionó en el apartado anterior (Figura 3). Durante la primera extracción se extrajo 1ml de sangre de cada conejo utilizando jeringas de 3ml, tomadas directamente de las venas auriculares marginales y/o arterias centrales; estas fueron depositadas inmediatamente en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de 1ml (Tubos BD Microtainer EDTA K2, BD Vacutainer, EUA). La segunda extracción se realizó mediante una punción intracardiaca con jeringas de 5ml y las muestras de cada conejo fueron colocadas en dos tubos de 5 ml. Uno con anticoagulante (EDTA) (BD Vacutainer EDTAK3, BD Vacutainer, EUA) para obtener los parámetros

sanguíneos, utilizando el sistema Hemograms analyzer BC Vet^{MR} (Kontrolab, Italia), y otro sin anticoagulante (BD Vacutainer Serum, BD Vacutainer, EUA) para serología. El conteo mencionado, se utilizó para medir tres variables: hematocrito, porcentaje de linfocitos/monocitos y porcentaje de granulocitos (Burke et al., 2010). De los tubos sin anticoagulante se recuperó el suero, el cual se colocó en microtubos para centrifugación (Capp, Dinamarca). Dichos tubos se almacenaron a -20°C hasta su uso para la detección de anticuerpos presentes en los animales del estudio. La metodología que se empleó fue la de carbón inmunoensayo (CIA) según las instrucciones del fabricante (CIA-Medicago, Suecia). Esta consiste en utilizar las esporas completas (muertas por calor) de *E. cuniculi* suspendidas con carbón ya contenidas en el kit y exponerlas al suero del animal muestreado, que en caso de presentar Ac contra *E. cuniculi*, generarán una aglutinación que puede ser vista con un microscopio de luz convencional a 40X. Mediante esta técnica se descartó la presencia o ausencia de anticuerpos contra *E. cuniculi* en cada uno de los animales que conforman los grupos (Boot et al., 2000).

3.3.3 Obtención y preservación de muestras tisulares

Una vez realizada la eutanasia, se realizó una revisión anatómica general del cadáver y posteriormente se llevó a cabo la técnica de necropsia con la finalidad de extraer primordialmente cerebro y riñones. Al mismo tiempo, se extrajeron pulmones, lengua, ojos, porciones de intestino delgado y grueso, hígado, bazo, corazón, musculo, ganglios poplíteos y mesentéricos. Estas muestras fueron fijadas en 250 ml de formaldehído al 10% amortiguado en

PBS con pH 7.4, durante 48 horas. Los tejidos se embebieron en parafina siguiendo la inclusión de rutina (Apéndice A-1). Los cortes posteriores se realizaron a partir de los cubos obtenidos; utilizando un micrótopo (Microm HM 315 Microtome, GMI, EUA) para seccionar porciones de 4µm de grosor. Las secciones de cada tejido fueron colocadas en el baño de flotación (Modelo 14792, Boeckel Scientific, EUA) a 40-45°C que contenía gelatina ya diluida, esta última se omitió para las secciones destinadas a técnicas IFA e IHC donde se utilizó solo agua destilada. Una vez extendidas las secciones, estas fueron adheridas a sus laminillas correspondientes que posteriormente se dejaron alrededor de 4 horas antes de su uso. Una vez logrado esto, se tiñeron con las técnicas de (HE) (apartado 3.4.4.1), Azul de Tricromo (apartado 3.4.3.2), IFA (3.4.1.1) o IHC (apartado 3.4.1.2 y apartado 3.5.2). Todas estas técnicas fueron requeridas para la detección y discriminación de esporas, quistes o granulomas. Se observaron con un objetivo de 100X en un microscopio de luz Primo Star (Zeiss, Alemania) para buscar la presencia o ausencia de las características mencionadas. Los resultados se registraron utilizando una cámara PowerShotG10^{MR} (Canon, Japón).

3.4 Detección de esporas en muestras

3.4.1 Detección de esporas en tejido mediante tinción con anticuerpos conjugados

3.4.1.1 Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección de esporas en tejido (cerebro y riñón) mediante esta técnica (Alfa Cisse et al., 2002), se utilizaron secciones de tejido previamente incluido en bloques de parafina (apartado 3.3.3), fueron cortadas y fijadas en laminillas recubiertas con poli-L-lisina (Polysin^{MR} Microscope Adhesion Slides, Sigma, EUA). Por lo tanto, una vez que las secciones se desparafinaron y rehidrataron, se expusieron al proceso de desenmascaramiento de antígeno con calor utilizando un buffer de citratos (pH 6, 10mM Ac cítrico). De este modo se logró que el calor desnaturalizara dichas uniones mientras que el buffer mantuviera las conformaciones resultantes (Gutierrez et al., 1999; Meyers, 2011). Luego se retiraron del buffer y se dejaron atemperar para después fijarlas en metanol. Al terminar este paso, se sacaron y dejaron secar al aire para después colocarlas dentro de acetona previamente helada a -20°C con la que se realizó una segunda fijación. Después del secado se rehidrataron con PBS, el cual se retiró mediante un aspirado utilizando una micropipeta (Single Pippete LMP1000, PZ HTL, Polonia). Posteriormente, sobre cada sección se colocaron 60µl de la dilución comercial (no especificada) del anticuerpo primario (Mouse mAb anti-Microsporidia, Bordier Affinity Products, Suiza) con ayuda de una micropipeta, (Single Pippete, LMP200, PZ HTL, Polonia) para después lavarlas con PBS. Una vez terminado, se procedió a eliminar las fuentes de luz/iluminación del área de

trabajo, procurando una adecuada visualización de los materiales y reactivos. Hecho esto, se agregaron 60µl de la dilución (1:50) del anticuerpo secundario conjugado con FITC [Anti-Mouse IgG (whole molecule)–FITC antibody produced in goat, Sigma-Aldrich, EUA], PBS y azul de Evans (Evans Blue Dye content ≥75 %, Sigma-Aldrich, EUA). Después de su incubación, las laminillas fueron lavadas con PBS, secadas y montadas utilizando resina sintética (VectaMount Permanent Mounting Medium, Vector Laboratories, EUA). Al terminar este procedimiento, las laminillas se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia UV (Zeiss-Axiostar HBO 50, Zeiss, Alemania), con una longitud de onda de excitación de entre 380 y 490 nm (Apéndice A-2).

3.4.1.2 Inmunohistoquímica (IHC)

Para la detección de esporas en tejido mediante la técnica de IHC, se utilizaron secciones de las muestras parafinadas utilizadas en el apartado anterior, que una vez fijadas en laminillas recubiertas con poli-L-lisina se dejaron secar como mínimo 4 horas. Posteriormente se desparafinaron y rehidrataron utilizando alcoholes graduados. Una vez terminada esta primera etapa, se les expuso a un proceso de desenmascaramiento de antígeno con calor, utilizando un buffer de citratos (pH 6, 10mM Ac cítrico). Después de esto, las laminillas se dejaron enfriar antes de entrar al bloqueo de peroxidasa endógena, donde se utilizó peróxido de hidrogeno. Al terminar el bloqueo las laminillas se lavaron gentilmente con PBS, para pasar al bloqueo de sitios de unión inespecíficos utilizando el suero de equino contenido en el

mismo kit del anticuerpo secundario (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, EUA). Posteriormente se escurrió el exceso de suero de bloqueo y se incubó a 4°C por una noche con la dilución comercial (no especificada) del anticuerpo primario (Mouse mAb anti-Microsporidia, Bordier Affinity Products, Suiza). Al día siguiente, se lavaron con PBS nuevo y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado a biotina (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, EUA) previamente preparado bajo las condiciones del fabricante (1:50). Se realizó otra incubación con el reactivo del complejo enzima-biotina-avidina contenido en el mismo kit. Por último, se requirió de una incubación con el sustrato de peroxidasa (ImmPAC^{MR} DAB, Vector Laboratories, EUA) que se colocó sobre el tejido. Finalmente cada laminilla se deshidrató con alcoholes y se aclaró con xilol, antes de aplicar la resina sintética (VectaMount Permanent Mounting Medium, Vector Laboratories, EUA). Las muestras se secaron y se visualizaron al microscopio de luz Primo Star (Zeiss, Alemania) con objetivos de 4, 10, 40 y 100x (Apéndice A-3).

3.4.2 Estudios coprológico y urológico

Se utilizaron las muestras de heces previamente conservadas en formol y las muestras de orina congeladas a -20°C (Garcia, 2002; Khanaliha, 2014) (ver apartado 3.3.1). La secuencia para preparar cada laminilla fue la siguiente: Con ayuda de un agitador rotatorio (Vortex Mixer VX-200, Labnet International Inc, EUA), se homogenizó el contenido fecal o de orina. Se esterilizó un asa bacteriológica (al rojo vivo) en la flama de un mechero de Bunsen. Se introdujo el asa en el frasco que contenía la muestra ya sea de

heces u orina, y se agitó ligeramente dentro de este a modo de que tuviera contacto con todo el contenido del frasco. Se hizo el frotis de la muestra sobre un portaobjetos y se pasó de una manera rápida y gentil de dos a tres ocasiones sobre la flama del mechero Bunsen a modo de fijar el líquido. La laminilla fue colocada sobre una toalla de papel con el frotis hacia arriba, esto permitiría que la muestra se seque a temperatura ambiente. Se guardó el frasco utilizado y el asa bacteriológica se volvió a esterilizar en el mechero, una vez hecho esto se pudo continuar con la siguiente muestra o procedimiento. Se colocaron las laminillas en una rejilla metálica, se identificaron posteriormente se inició el proceso de tinción correspondiente.

3.4.2.1 Tinción de tricromo modificada (técnica de Weber) para heces y orina

Para la visualización de las esporas estaes una de las técnicas más recomendadas en cuanto a su rapidez y facilidad realización (Garcia, L. S. 2002; CDC, 2013,). Las laminillas se fijaron en metanol, después se secaron al aire y se sumergieron en el azul de tricromo (Para-Pak® Trichrome Blue Stain, Meridian Bioscience, EUA). Se escurrió el exceso del colorante y rápidamente se sumergieron en alcohol ácido. Se continuó con un breve escurrimiento, las muestras se deshidrataron con alcoholes graduales (95, 95, 100) terminando con un aclaramiento con xilol. Finalmente se secaron y se montaron con una resina sintética (VectaMount Permanent Mounting Medium, Vector Laboratories, EUA). Una vez que la resina secó, las laminillas se analizaron (50 campos por muestra) utilizando el microscopio de luz Primo Star (Zeiss, Alemania), para comprobar la ausencia o presencia de

esporas en heces y orina. Los resultados se registraron mediante una cámara digital PowerShot G10^{MR} (Canon, Japón). Para la detección e identificación de esporas de *E. cuniculi*, se compararon con laminillas control positivas (Apéndice A-4) las cuales, se tiñeron de un color rojo rosáceo claro.

3.4.2.2 Calcoflúor White para heces y orina

Se inició con la obtención, colocación y fijación de las muestras de heces y orina en laminillas (apartado 3.4.2) de la misma manera que la técnica anterior hasta la fijación en metanol. Se elaboró una base para sostener las laminillas a tratar y sobre la cual se escurrió el reactivo excedente (Figura 4).



Figura 4.- Base para posicionamiento de laminillas. Utilizando una charola de metal, recubierta con aluminio. Sobre esta se colocaron 2 pipetas Pasteur a modo de que sostengan las laminillas y a su vez las mantengan niveladas, evitando el escurrimiento de lo que en ellas se depositaría.

Con una pipeta Pasteur se cubrieron las laminillas con calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, EUA). Después se lavaron con agua destilada y se dejaron secar mantenidas en oscuridad. Una vez secas, se montaron con resina sintética y se observaron en un microscopio de epifluorescencia UV (Zeiss-Axiostar HBO 50, Zeiss, Alemania) (Apéndice A-5).

3.4.3 Tinción histopatológica

3.4.3.1 Hematoxilina y Eosina (HE)

Para este procedimiento se requirieron cortes de tejido a partir de los cubos de parafina previamente elaborados (apartado 3.3.3). Estos se fijaron en laminillas convencionales (Pearl, China) que posteriormente pasaron por todo el proceso de una técnica de HE tradicional y su ulterior montaje con resina sintética (Apéndice A-6). Por último, cada laminilla procesada se visualizó bajo un microscopio de luz tradicional para evidenciar y localizar lesiones, infiltraciones celulares, presencia de esporas, quistes u otra manifestación de la encefalitozoonosis.

3.4.3.2 Azul de tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido

Se usó la misma metodología utilizada en heces y orina. Se sumergieron en Azul de Tricromo (Para-Pak[®] Trichrome Blue Stain, Meridian Bioscience, EUA); que después se retiró para poder continuar con el proceso, hasta su montaje en resina (Apéndice A-7).

3.5 Detección de CD4, CD8 y MHC II

3.5.1 Anticuerpos anti-marcadores de superficie

Se utilizaron tres Ac monoclonales: 1) anticuerpo de ratón anti-CD4 de conejo [Rabbit CD4 mAb (clone RTH1A), Kingfisher Biotech Inc, EUA], 2) anticuerpo de ratón anti-CD8 de conejo [Rabbit CD8 mAb (clone ISC27A), Kingfisher Biotech Inc, EUA] y 3) anticuerpo de ratón anti-MHC clase II de bovino que cruza antigénicamente con el MHC II de conejo [Bovine MHC II mAb (clone TH14B), Kingfisher Biotech Inc, EUA].

3.5.2 Inmunohistoquímica para la detección de marcadores de superficie

Se realizaron cortes de cerebro y riñón y se montaron en laminillas con poli-L-lisina (apartado 3.3.3). Primeramente, las laminillas se desparafinaron, luego se deshidrataron y posteriormente se les aplicó el desenmascaramiento de antígeno con las laminillas inmersas en TRS (pH 9, 1X) (Dako^{MR} Target Retrieval Solution High pH 10x concentrate, Dako, EUA) y calentadas en una vaporera (Hamilton Beach, USA). Después se continuó con los bloqueos de peroxidasa endógena y de sitios de unión inespecíficos, para después añadir e incubar la dilución del Ac primario (1:100). Una vez concluido el periodo de incubación, se realizó el lavado con TBS (Envision^{MR} Flex Wash Buffer 20x, Dako, EUA) y la posterior aplicación del Ac secundario (EnVision^{MR} Detection Systems Peroxidase/DAB, Dako, EUA). Continuando con el proceso; las laminillas se volvieron a lavar para después agregar el sustrato de peroxidasa-cromógeno (EnVision^{MR} Flex DAB+Chromogen, Dako, EUA). Por

último, se lavaron con agua destilada y se montaron en una rejilla metálica para comenzar los procesos de contraste con hematoxilina de Harris y continuar con los lavados, deshidratación, aclarado y montaje (Apéndice A-8).

3.6 Análisis estadístico

Para comprobar la inmunosupresión se utilizaron los parámetros de las muestrassanguíneas, para desarrollar un diseño multifactorial 2x2 entre variables independientes y bajo una distribución completamente al azar para 10 individuos por tratamiento. A esta información se le realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias utilizando la DMS, utilizando el software SPSS 15.0 y el Programa de Diseños Experimentales UANL Versión 1.6. Para comparar la expresión de los marcadores de superficie entre los grupos A y B, se analizaron los resultados del conteo de células positivas en los granulomas revisados con el programa ImageJ (National Institutes of Health, EUA); y sus datos fueron analizados por medio de un ANOVA de dos colas y la prueba de Bonferroni como comparación de medias utilizando el software Prism 4 (GraphPad Software, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Muestras sanguíneas

4.1.1 Prueba de Carbón Inmunoensayo (CIA)

Los sueros de los grupos A y B, aglutinaron las esporas contenidas en el kit (Figura 5A), por lo tanto, el resultado con la prueba CIA fue positivo para los 10 animales contenidos en cada grupo; mientras que los sueros de los conejos de los grupos C y D (10 c/u) no aglutinaron las esporas de *E. cuniculi* (Figura 5B).

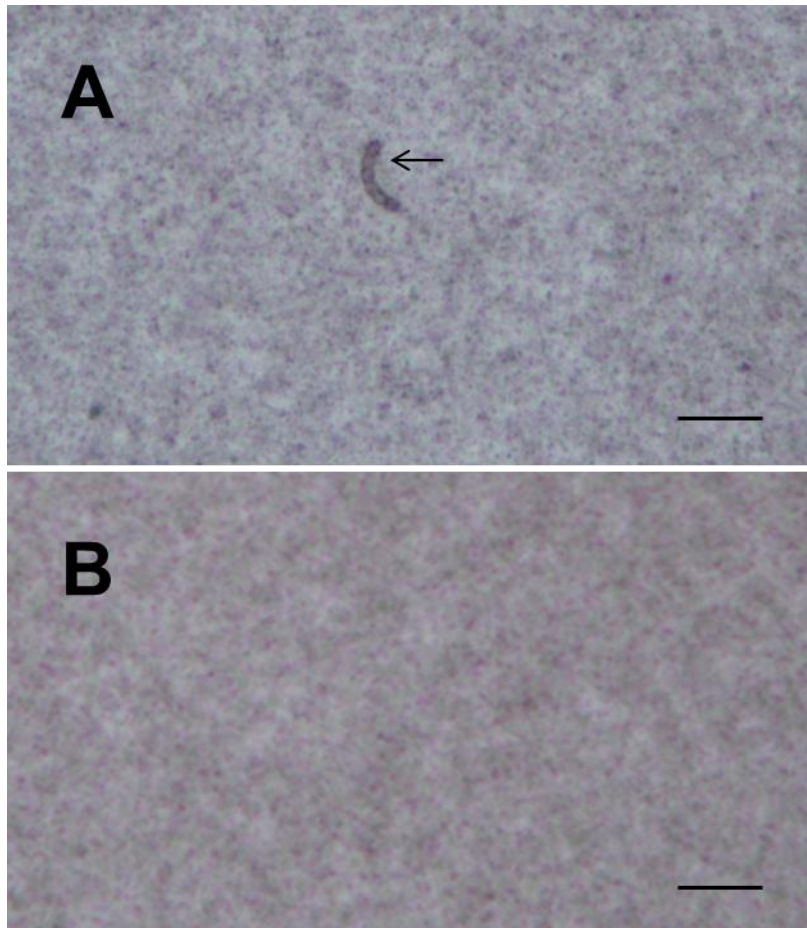


Figura 5.- Prueba de carbón Inmuno Ensayo. Conejo. (A) Muestra positiva a prueba CIA; anticuerpos anti-*E. cuniculi* interactuando con las esporas y permitiendo la visualización de estas (flechas). (B) Muestra negativa a prueba de CIA, no se evidencia interacción alguna y por consiguiente las esporas no son visibles. Barras = 10 μ m.

4.1.2 Parámetros sanguíneos

4.1.2.1 Porcentaje de hematocrito

Se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el grupo A, al ser comparado con los grupos B, C o D. Mientras que el grupo B, al compararlo con los grupos C o D no mostró diferencia alguna. Lo mismo resultó al cotejar los grupos C y D (Figura 6).

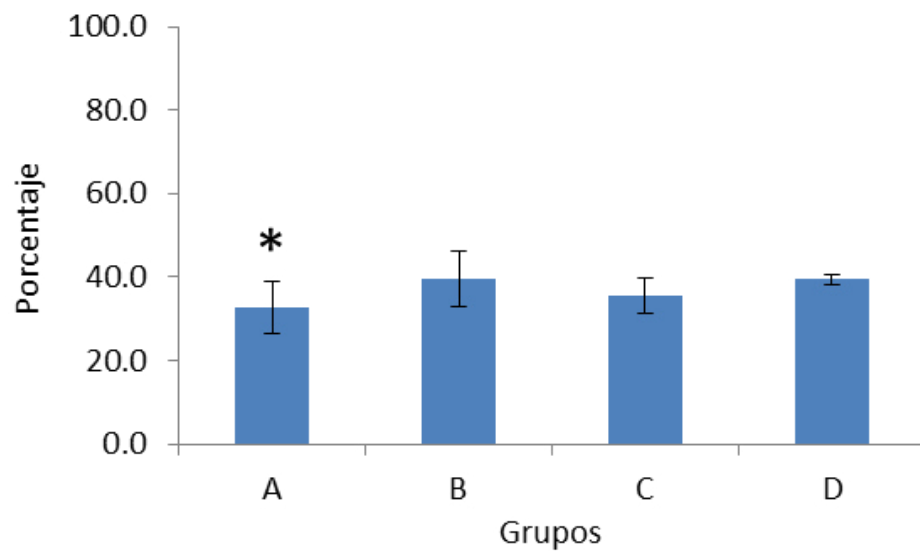


Figura 6.- Hematocrito de los grupos A, B, C y D. Los resultados se expresan como desviación estándar de la media. En el grupo A presentó 32.7%, el grupo B 39.6% se obtuvo, en el grupo C un 35.5% y grupo con D 39.4%. El asterisco denota una diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.1.2.2 Porcentaje de linfocitos/monocitos

Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo A y los grupos C o D, mas no al compararlo con el grupo B. En cuanto al grupo B solo mostró unadiferencia significativa ($p < 0.05$) al compararlo con el grupo D, mientras que el grupo C, también presentó una diferencia significativa con el grupo D (Figura 7).

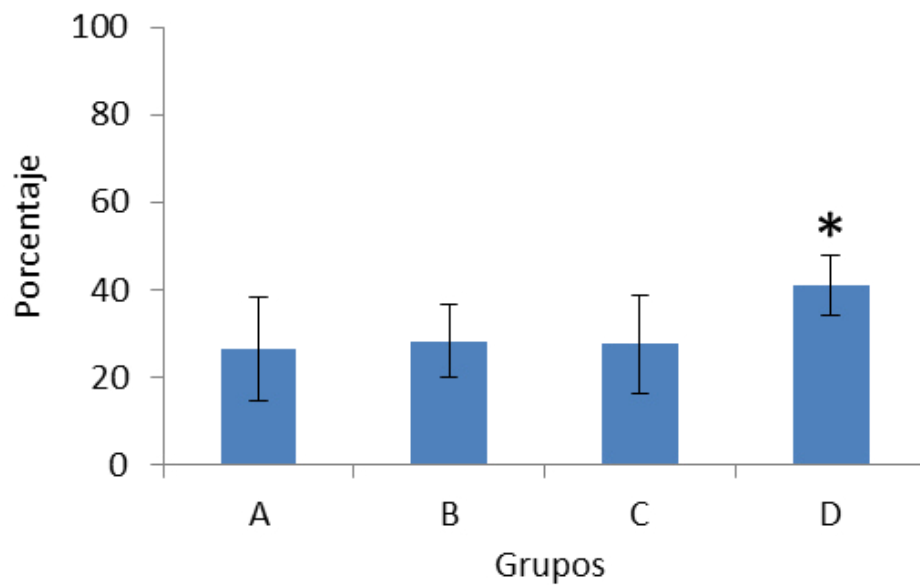


Figura 7.- Valores de Linfocitos/Monocitos de los grupos A, B, C y D. Los resultados se expresan como la desviación estándar de la media. El grupo A un 26.5%, el grupo B presentó un 28.3%, el grupo C, 27.5% y el grupo D presentó 41%. El asterisco denota una diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.1.2.3 Porcentaje de granulocitos

Se registró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el grupo A respecto a los grupos C y D, mas no con el grupo B. Los grupos B y C no tuvieron diferencia significativa. El grupo D fue distinto a todos ($p < 0.05$) (Figura 8).

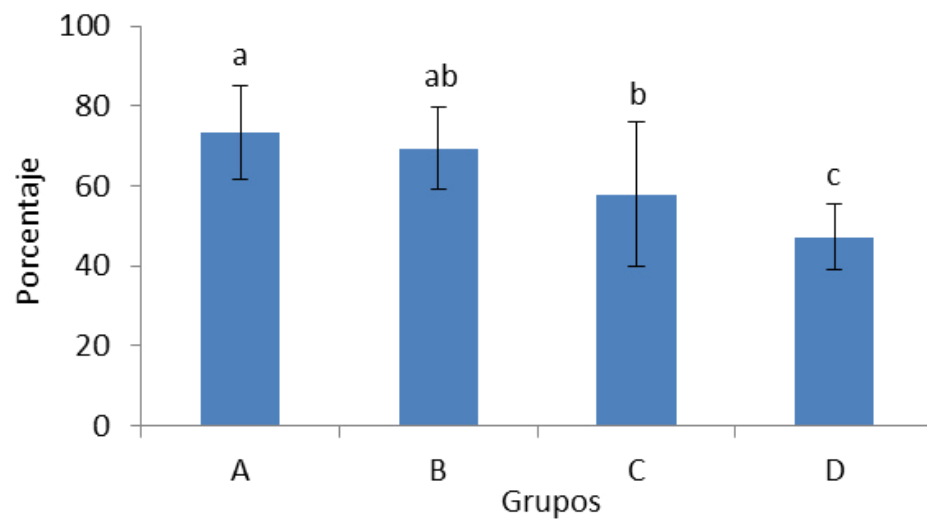


Figura 8.- Valores de los granulocitos de los grupos A, B, C y D. Los resultados se expresan como la desviación estándar de la media. El grupo A, un 73.5%, el grupo B, 59.5%, grupo C un 57.9% y grupo D, 47%. El asterisco denota una diferencia significativa ($p < 0.05$).

4.2 Detección de esporas en muestras

4.2.1 Detección de esporas en tejido mediante tinción con anticuerpos conjugados

Ambas técnicas tanto IF como IHC, mostraron resultados satisfactorios al permitir evidenciar la presencia de esporas de *E. cuniculi* en los tejidos de los conejos infectados (A y B), así como el comprobar la ausencia de estas en las secciones de tejido tomadas de los grupos de conejos no infectados (C y D).

4.2.1.1 Inmunofluorescencia indirecta

Se confirmó la presencia de esporas de *E. cuniculi* en muestras de tejido renal de animales de los grupos A y B. Las esporas se localizaron tanto en los glomérulos como en las células epiteliales de los túbulos renales (Figura 9). Las esporas se apreciaban en un verde-amarillo fluorescente intenso, agrupadas en cúmulos fácilmente identificables.

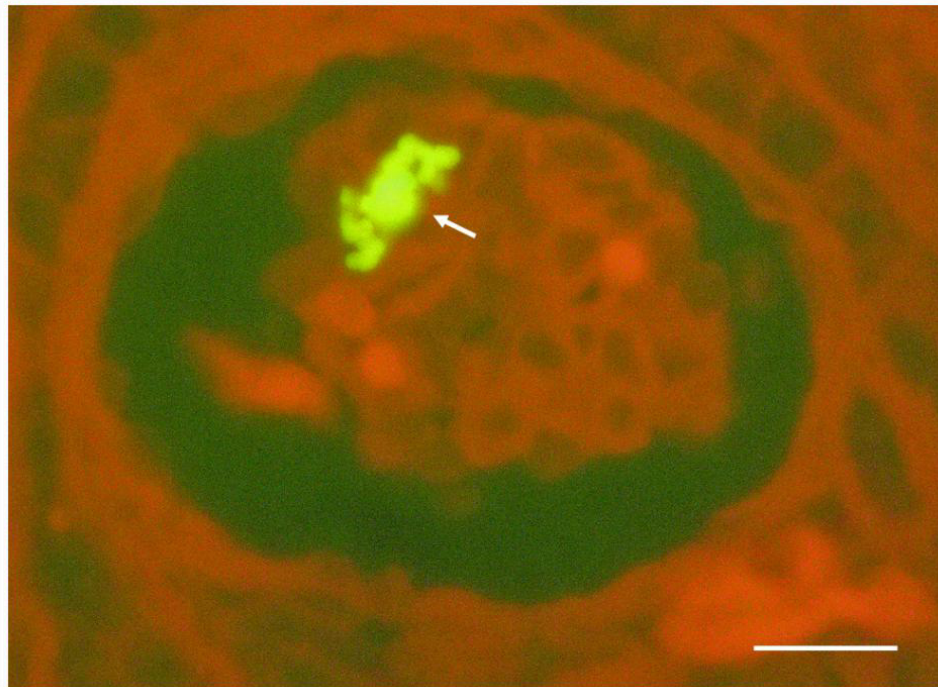


Figura 9.- Riñón de conejo infectado. Epifluorescencia. Tejido renal, mostrando esporas de *E. cuniculi* inmunomarcadas con FITC (flecha). Se aprecia un grupo de esporas dentro de un glomérulo renal. Barra = 10 μ m.

Por otro lado, esta reacción fue negativa tanto para tejido cerebral como para el renal de los animales de los grupos C y D.

4.2.1.2 Inmunohistoquímica indirecta

Los anticuerpos monoclonales anti-microsporidia, permitieron localizar las esporas de *E. cuniculi* tanto en tejido renal como en el tejido nervioso de los conejos de los grupos A y B. La inmunoreacción reveló la forma y tamaño de las esporas que se encontraban localizadas en el tejido (Figura 10) e incluso dentro de las células que lo conformaban, formando los característicos quistes intracelulares (Figura 11). Estos últimos se observaron en los túbulos renales. Esta reacción no se observó en los tejidos cerebrales o renales de los conejos de los grupos C y D, coincidiendo con los controles negativos y corroborando los resultados negativos previos de CIA (apartado 4.1.1).

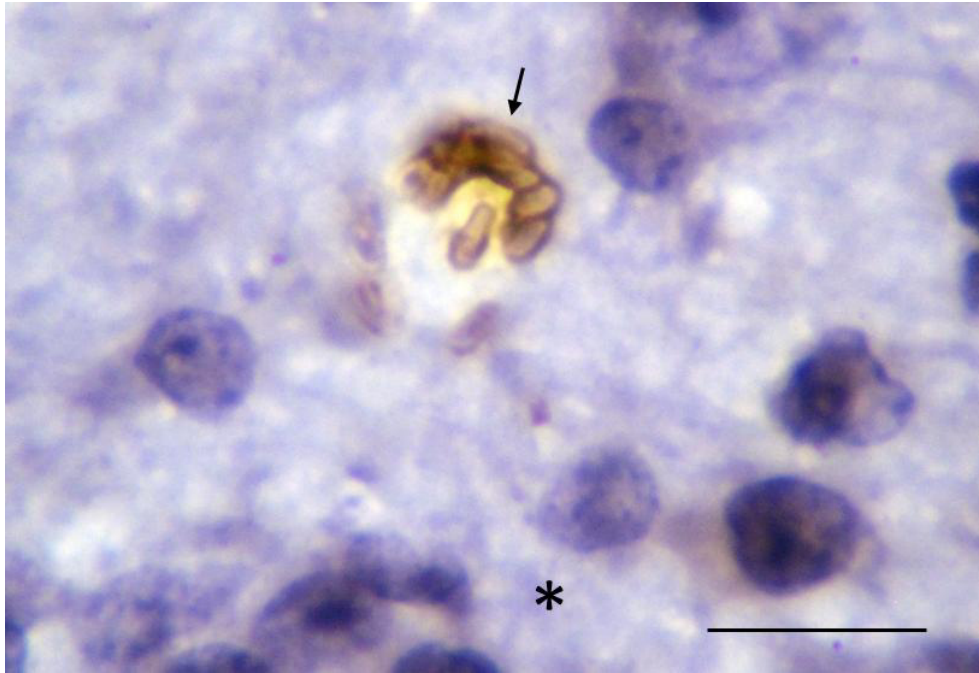


Figura 10.- Encéfalo de conejo infectado naturalmente. Esporas de *E. cuniculi* en tejido nervioso cerebral (flecha), adyacente a una zona granulomatosa (*). Barra = 10 μ m.

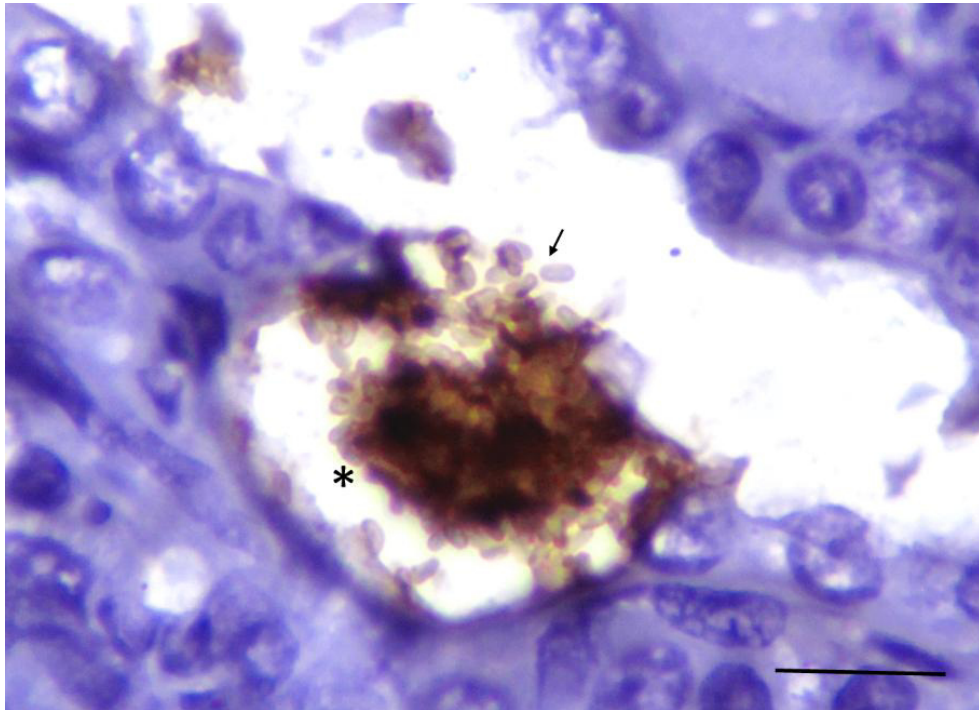


Figura 11.- Riñón de conejo infectado naturalmente. Esporas maduras de *E. cuniculi* dentro (*) y fuera (flecha) de una célula de epitelio de túbulo renal. Barra = 10 μ m.

Debido a la tinción de contraste propia de esta técnica, se logró una rápida localización de las esporas y estableció su relación con las estructuras y células del tejido afectadoadyacente.

4.2.2 Estudio coprológico y de orina

En los grupos infectados (A y B) se lograron identificar esporas de manera más frecuente en muestras fecales. Aunque, se observó al menos una muestra positiva para cada animal ya sea proveniente de heces u orina o al ser procesada con las técnicas de Weber o calcoflúor White.

4.2.2.1 Tinción de Tricromo modificada (técnica de Weber) para heces y orina

En los grupos A y B se identificaron muestras positivas en orina, 4 y 1 respectivamente (Figura 12A). Mientras que en las muestras fecales se registraron 8 muestras positivas del grupo A y 7muestras positivas del B donde las esporas también eran visibles (Figura 12B).

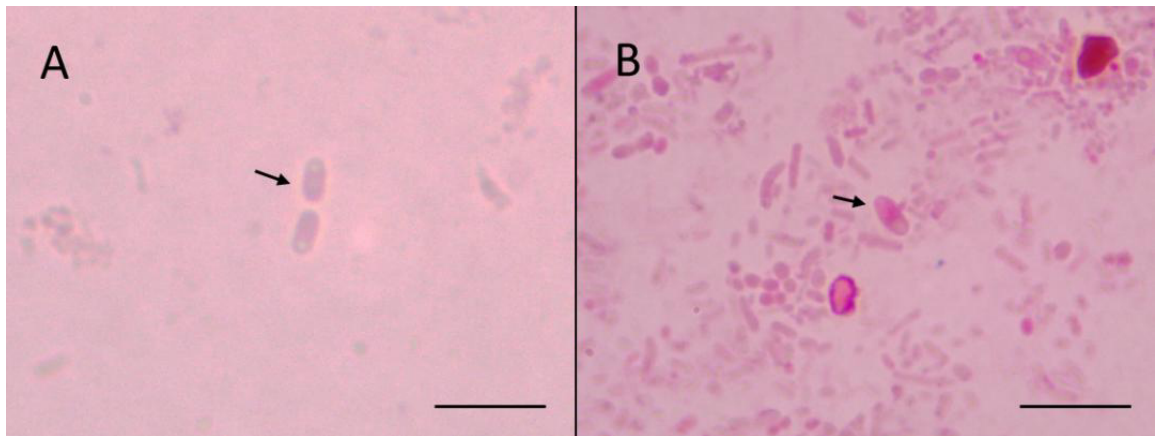


Figura 12.- Conejo infectado naturalmente. A) Esporas de *E. cuniculi* (flecha) en muestra de orina teñida con azul de tricromo. B) Heces. Espora de *E. cuniculi* (flecha) en muestra de heces teñida con la técnica mencionada. Barras = 5 μ m.

Ninguna de las muestras de orina o heces de los conejos pertenecientes a los grupos C o D presentaron evidencia alguna de las esporas, manteniendo el estatus de no infectados.

4.2.2.2 Calcoflúor White para heces y orina

Las esporas en los conejos infectados naturalmente se observaron, tanto en orina como heces. Fue posible visualizar la reacción de contraste característica de la técnica; la cual permitió una rápida identificación de esporas en los grupos clasificados como positivos (A y B), que a diferencia de la técnica de azul de Tricromo (apartado 4.2.2.1) ésta permitió identificar un mayor número de muestras como positivas. Resultando en 4 muestras de orina para el grupo A y 6 para el B (Figura 13A).

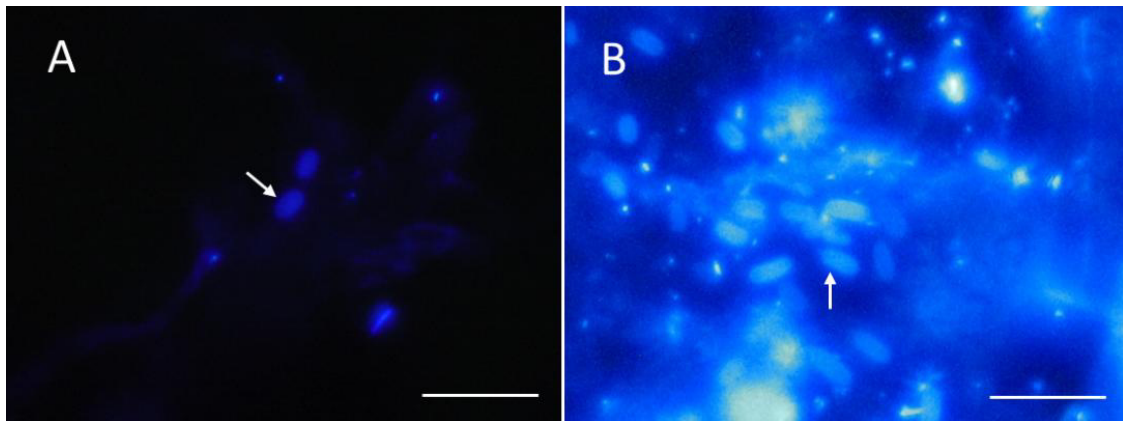


Figura 13.- Conejo infectado naturalmente. A) Esporas de *E. cuniculi* (flecha) en muestra de orina teñida con el fluorocromo calcoflúor White. B) Espora de *E. cuniculi* (flecha) en muestra de heces teñida con la técnica mencionada. Barras = 5 μ m.

Por otro lado, las muestras de orina provenientes de los grupos C y D, fueron negativas. Al analizar las muestras de heces, todas las muestras de los grupos A (10) y B (10) se registraron como positivas. Ya que fue aquí donde la presencia de las esporas fue más evidente (Figura 13B). No se evidenciaron esporas en las secciones recuperadas de los grupos C y D.

4.2.3 Tinción histopatológica

4.2.3.1 Hematoxilina y Eosina (HE)

Esta técnica histológica permitió identificar las lesiones granulomatosas en las muestras de tejido cerebral y renal, así como lesiones diversas relacionadas con la propia reacción inflamatoria y el daño celular. En los animales de los grupos grupo A y B, todas las secciones de cerebro presentaron lesiones granulomatosas no supurativas en grado variable desde cúmulos de células y satelitosis, hasta la visualización de los distintos grados de lesión granulomatosa según los parámetros establecidos por Csokai *et al* (Csokai et al., 2008, Rodríguez-Tovar et al., 2016) (Figura 14).

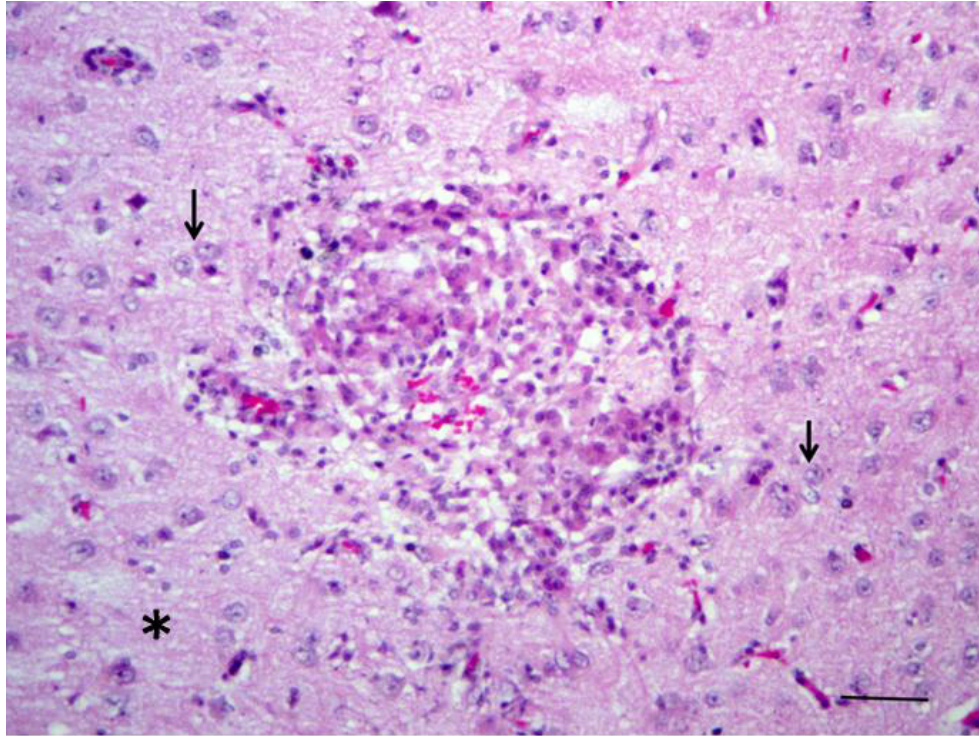


Figura 14.- Conejo infectado naturalmente. Encéfalo. Granuloma compuesto por células microgliales y células mononucleares, rodeado por tejido edematizado (*). Se puede observar astrocitosis alrededor del granuloma (flechas). HE. Barra = 50µm.

Además se mostraron extensas áreas de infiltrado perivascular linfocitario que dieron lugar a la formación de manguitos perivasculares mononucleares, aunque; en otras secciones se presentaron solo edemas perivasculares. Por otro lado, las secciones tisulares de los grupos C y D no presentaron lesión.

En todas secciones de riñón del grupo A se presentó un número considerable de lesiones que variaban en cuanto a su severidad, mientras que solo 8/10 muestras del grupo B presentaron este tipo de cambios. La presencia de quistes intracelulares de *E. cuniculi* se hizo evidente en dos de las muestras del grupo B (Figura 15), una de ellas presentando descamación del epitelio renal. Por otro lado, en todas las muestras de los grupos A y B, se apreció atrofia glomerular y dilatación de capsulas de Bowman, así como también la presencia de múltiples áreas de infiltrado perivascular en médula renal y que variando de moderado a intenso.

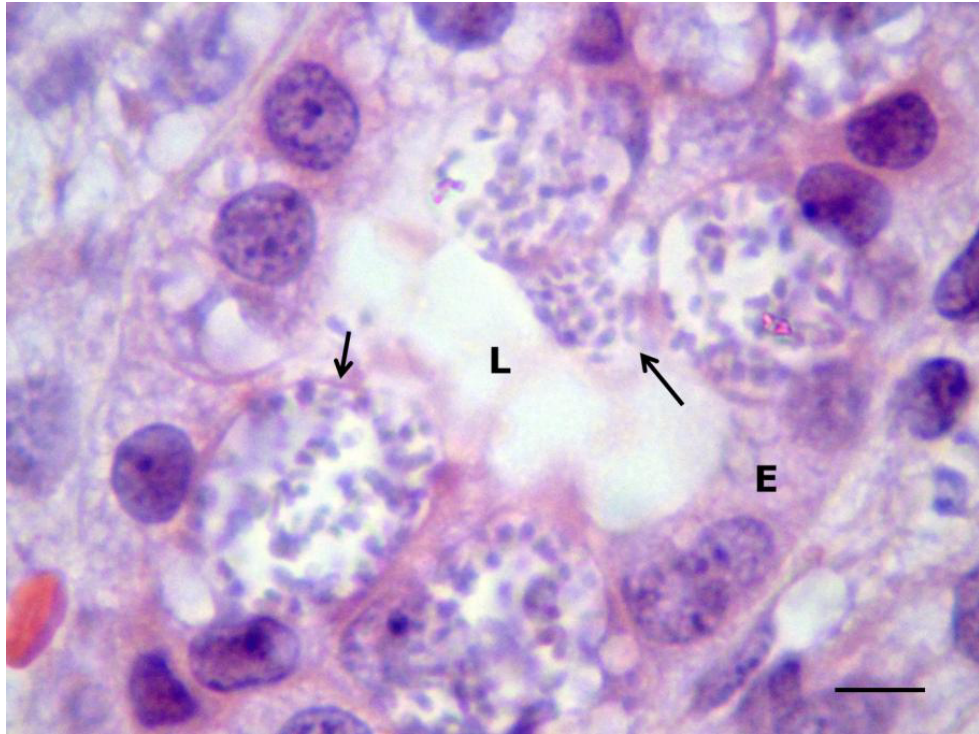


Figura 15.- Conejo infectado naturalmente. Riñón. Quistes intracelulares de *E. cuniculi* en epitelio renal (**E**). Se distingue la presencia de numerosos quistes parasitarios (flechas) conteniendo gran cantidad de esporas de *E. cuniculi* en su interior. Lumen del túbulo renal (**L**). HE. Barra = 5 μ m.

Otra característica encontrada a nivel medular, fue la presencia de numerosas hemorragias, áreas de infarto y/o fibrosis, presentándose de moderadas a severas. No se encontraron lesiones en las secciones de los grupos C y D.

4.3.3.2 Azul de tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido

Se encontraron quistes intracelulares en células del epitelio renal tubular de 2/10 muestras del grupo B. Las esporas contenidas se tiñeron positivas, permitiendo discriminar el tejido circundante u otras estructuras (Figura 16).

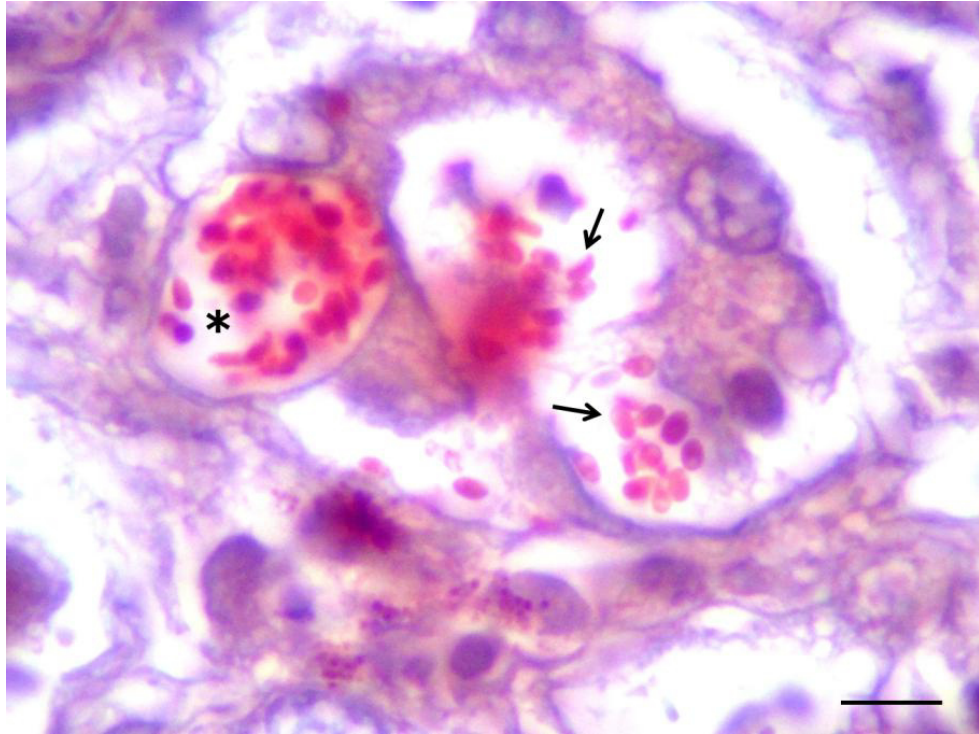


Figura 16.- Conejo infectado naturalmente. Riñón. Las esporas de *E. cuniculi* se observan tanto dentro (*) como fuera del epitelio renal (flechas). Tinción de azul de Tricromo modificada. Barra = 5 μ m.

4.3 Detección de marcadores de superficie leucocitaria CD4, CD8 y MHC II

Los granulomas de encéfalo variaron en estructura y conformación; en las secciones del grupo A, éstos poseían una distribución más focalizada y con mayor consolidación a diferencia de los de secciones del grupo B. En los granulomas de ambos grupos se logró la inmunolocalización de las células que expresan a los antígenos de superficie de interés para este estudio, las cuales fueron posibles de visualizar al realizarse la reacción con inmunoperoxidasa característica de la técnica de IHC utilizando el revelado con DAB.

4.3.1 Marcador de superficie leucocitaria CD4

4.3.1.1 Cerebro

Los granulomas previamente localizados con la técnica de HE (ver apartado 4.2.3.1) en las secciones de los grupos A y B mostraron variado número de células inmunomarcadas (Figuras 17) las cuales se encontraron ubicadas dentro y fuera de estos cúmulos de células inflamatorias. No se observó inmunomarcaje en secciones de los grupos control (C y D).

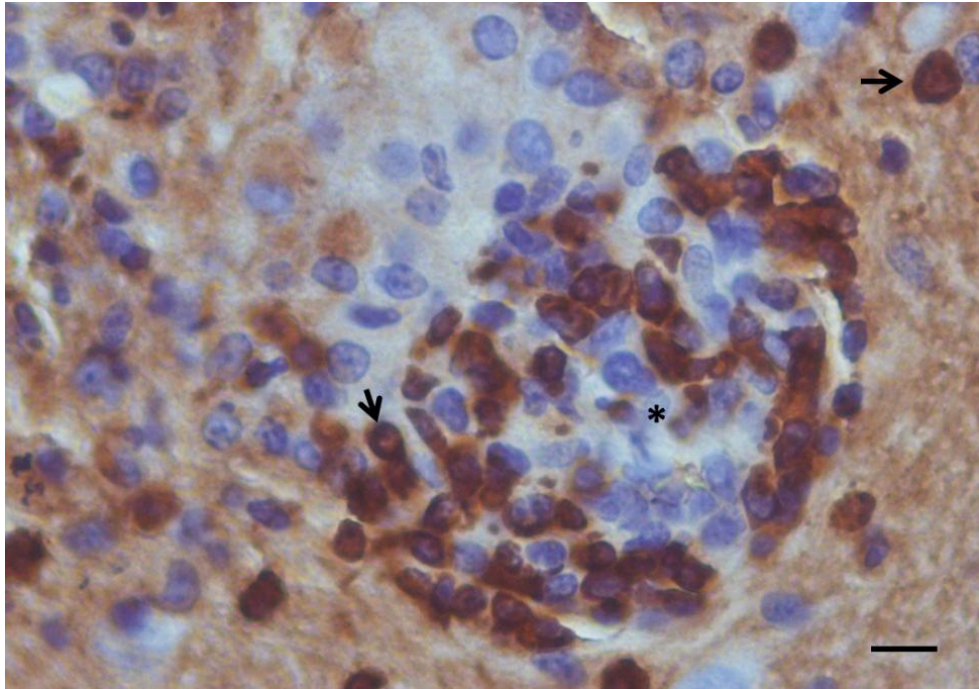


Figura 17.- Conejo infectado naturalmente. Encéfalo. Linfocitos T CD4⁺ (flechas) en la periferia o formando parte de un granuloma (asterisco). IHC anti-CD4. Barra = 10 μ m.

4.3.1.2 Riñón

Las secciones de riñón (grupos A y B), mostraron un marcaje positivo en cuanto a las células que presentaban el antígeno de superficie CD4 y que a su vez se encontraban formando parte de los granulomas; la distribución del marcaje en estos grupos presentaba una estructura más diseminada dentro del tejido (Figura 18). No se detectaron reacciones positivas en las secciones control (secciones de Grupos C y D).

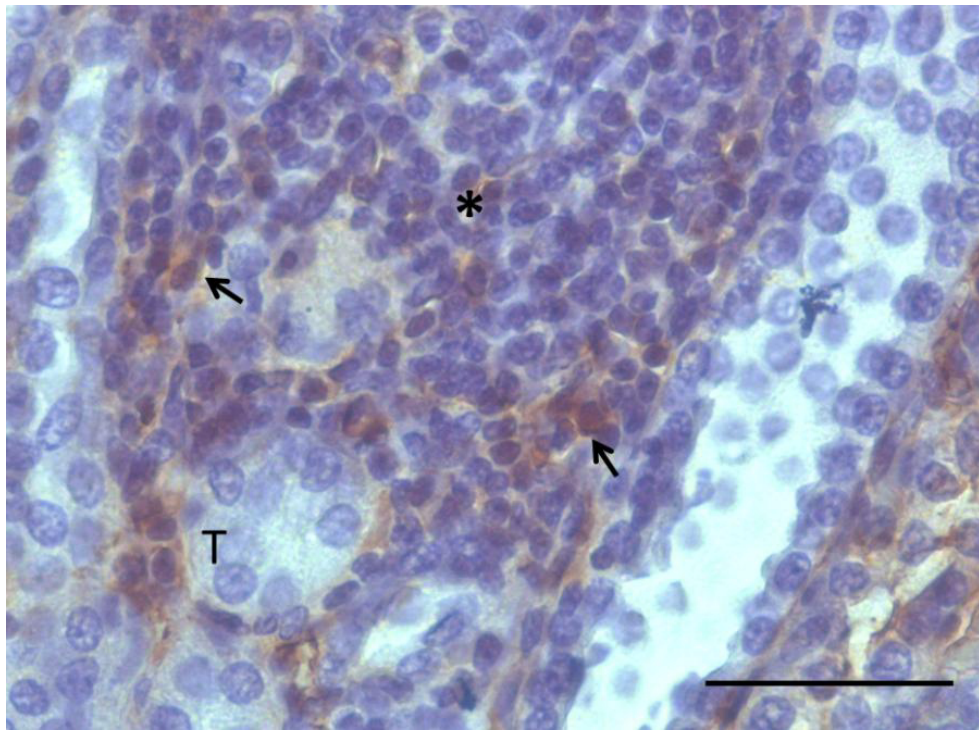


Figura 18.- Conejo infectado naturalmente. Riñón. Linfocitos T CD4⁺ (flechas) localizados en un granuloma (*). Se aprecia la extensión del granuloma y su difusión entre los túbulos renales (T) con epitelio degenerado. IHC anti-CD4. Barra = 50µm.

4.3.2 Marcador de superficie leucocitaria CD8

4.3.2.1 Cerebro

Se detectaron numerosas reacciones de inmunomarcaje a lo largo de los granulomas ubicados en las secciones de cerebro de los grupos A y B, permitiendo visualizar la posición y la presencia de estos linfocitos respecto a los granulomas formados en ese tejido (Figura 19).

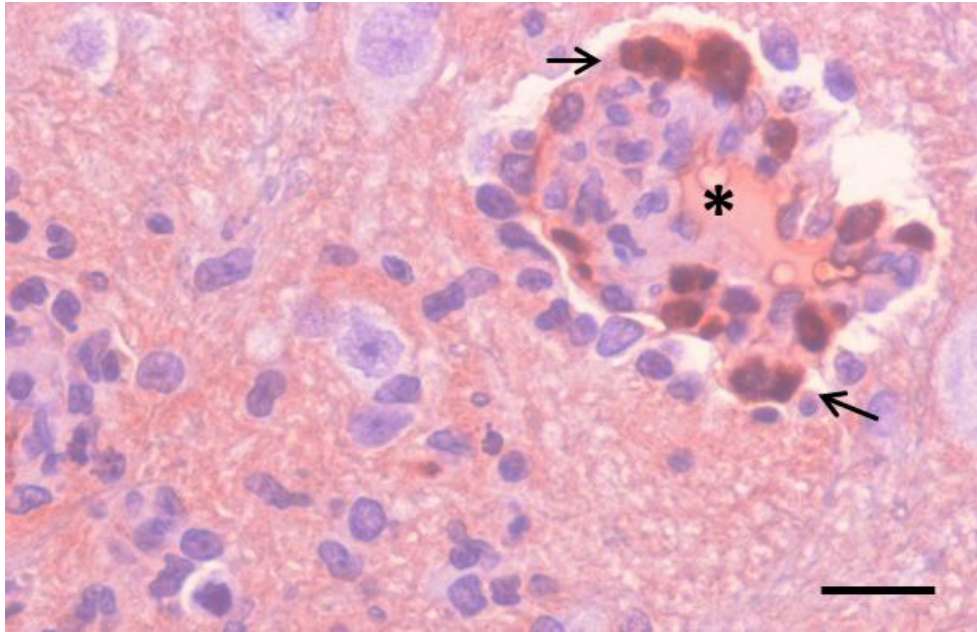


Figura 19.- Conejo infectado naturalmente. Encéfalo. Linfocitos T CD8⁺ (flechas) presentes en un granuloma (*). IHC anti-CD8. Barra = 20µm.

Estas reacciones no fueron observadas en secciones de tejidos control, recuperadas a partir de muestras de los grupos C y D.

4.3.2.2 Riñón

Tomando en cuenta la amplia difusión de los granulomas renales dentro del tejido se observaron reacciones positivas en la periferia y dentro de estas estructuras (Figura 20).

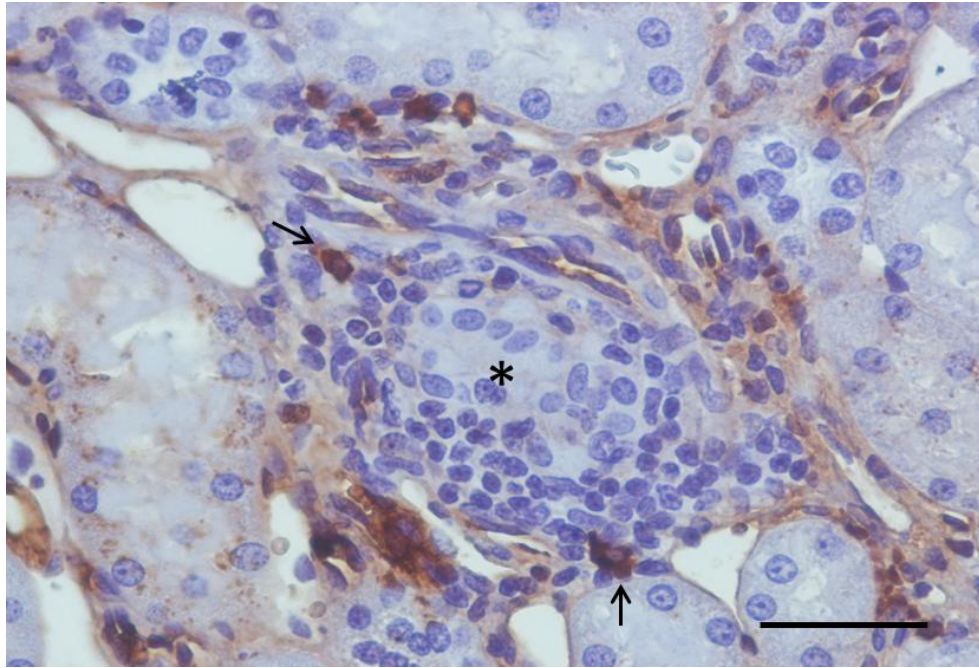


Figura 20.- Conejo infectado naturalmente. Riñón. Linfocitos T CD8⁺ (flechas) presentes en un granuloma renal (*). IHC anti CD8. Barra = 50µm.

Por otro lado, las reacciones no se vieron presentes en secciones de tejidos controles tratados con el mismo procedimiento.

4.3.3 Marcador de superficie leucocitaria MHC II

4.3.3.1 Cerebro

En los cortes provenientes de los grupos A y B, se registraron marcajes positivos en poblaciones celulares que ocupaban extensas áreas de cada granuloma (Figura 21), aunque la tendencia de inmunomarcaje fue mayor en secciones del grupo B. No se registraron reacciones en secciones control.

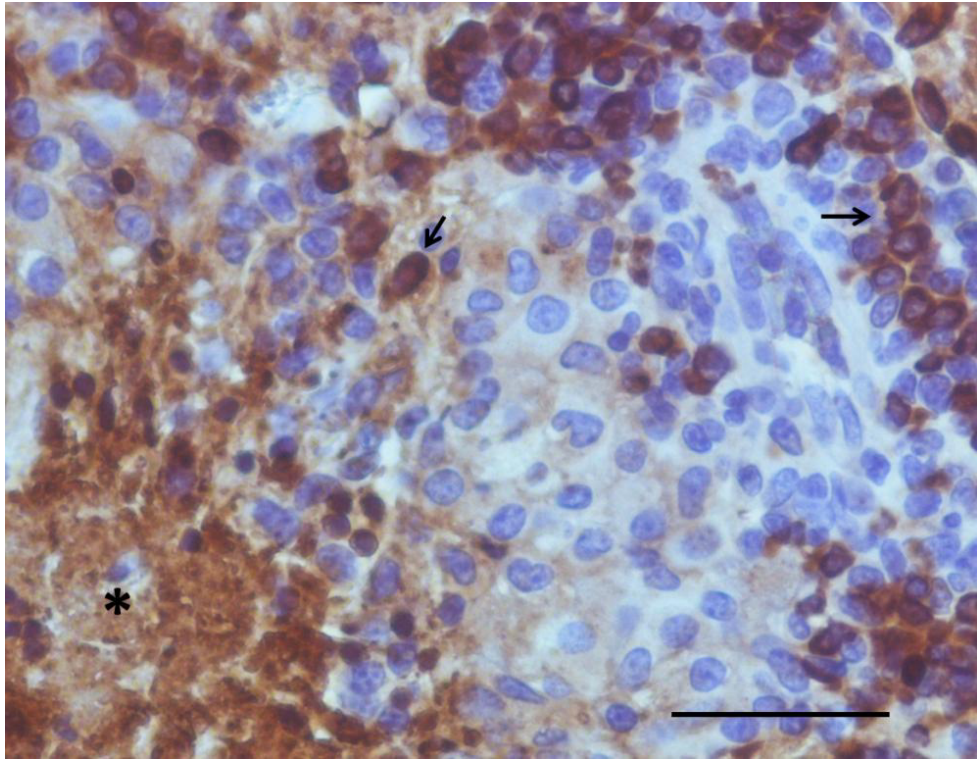


Figura 21.- Conejo infectado naturalmente. Encéfalo. Células expresando la molécula de superficie MHC II (flechas) presentes en una reacción inflamatoria granulomatosa. El asterisco denota el centro necrótico del granuloma. IHC anti MHC II. Barra = 50 μ m.

4.3.3.2 Riñón

Se observaron marcajes positivos en los granulomas de los grupos A y B, observándose una menor presencia de células con este antígeno de superficie (Figura 22) a diferencia de los ubicados en granulomas de tejido cerebral.

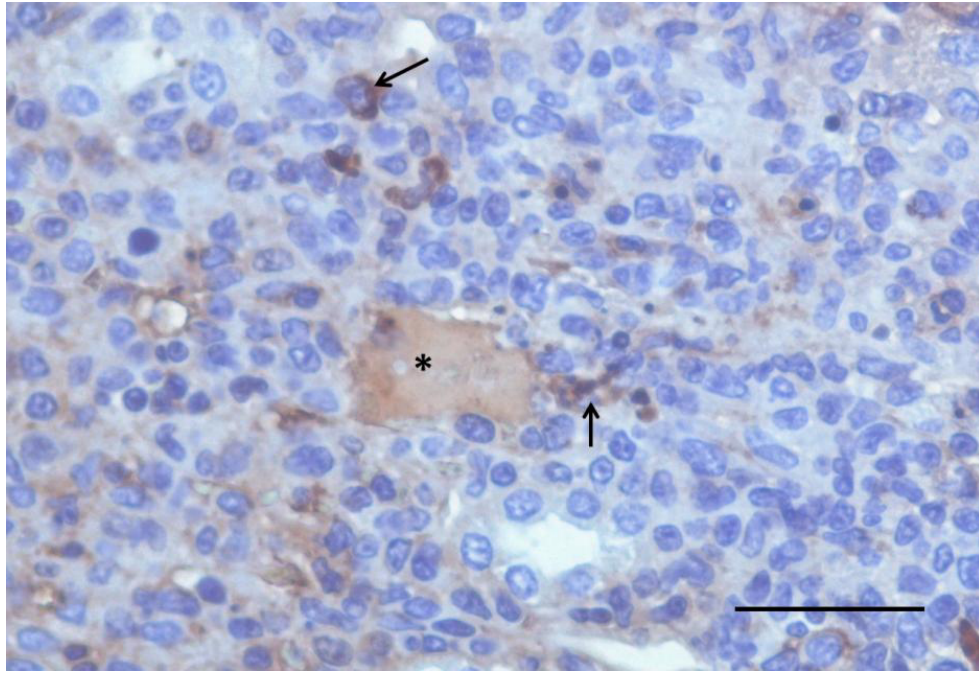


Figura 22.- Conejo infectado naturalmente. Riñón. Células inmunomarcadas con el anticuerpo anti MHC II (flechas) en un granuloma renal. IHC anti MHC II, riñón. Barra = 50 μ m.

No se encontró reacción positiva en secciones de tejido control (Grupos C y D).

4.3.3.3 Secciones control negativas

Como se mencionó anteriormente, estos controles consistieron en secciones recuperadas de tejido proveniente de animales de los grupos C y D. En los cuales se realizó la misma técnica de IHC y bajo las mismas condiciones (Figuras 23 y 24).

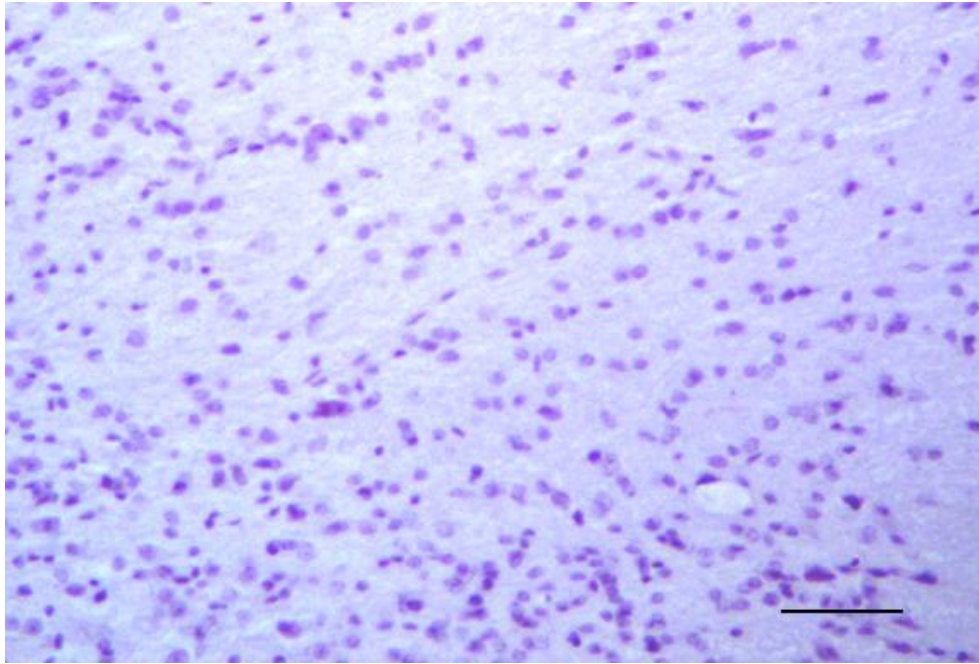


Figura 23.- Conejo clínicamente sano. Encéfalo. IHC. Barra = 50 μ m.

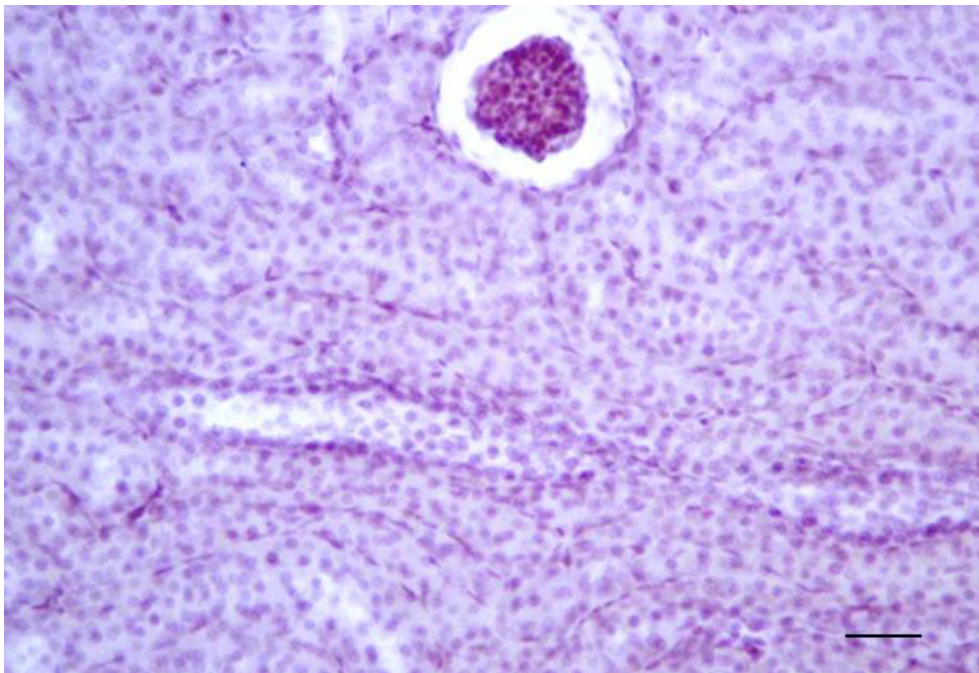


Figura 24.- Conejo clínicamente sano. Riñón. IHC. Barra = 50 μ m.

4.4 Conteo celular

El análisis de los datos obtenidos en el conteo de células inmunomarcadas arrojó resultados significativos en cuanto a sus medias, al ser comparadas entre sus distintas variables; ya sea entre las poblaciones marcadas contra cierto antígeno comparando los grupos A y B (Figuras 25 y 26) o entre los datos obtenidos de los órganos de cada animal de los cuatro grupos (A, B, C y D). En encéfalo, la comparación de las medias del número de células inmunomarcadas para MHC II asociadas a granulomas de los grupos A y B mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$), siendo mayor en el grupo A. En el inmunomarcaje para CD8 no se presentó alguna diferencia entre sus medias observándose solo un mayor aumento en el número de células en el grupo B. En cuanto a las reacciones positivas para CD4, ambos grupos presentaron una diferencia significativa ($p < 0.01$) mostrando resultados significativos para el grupo B (Figura 25).

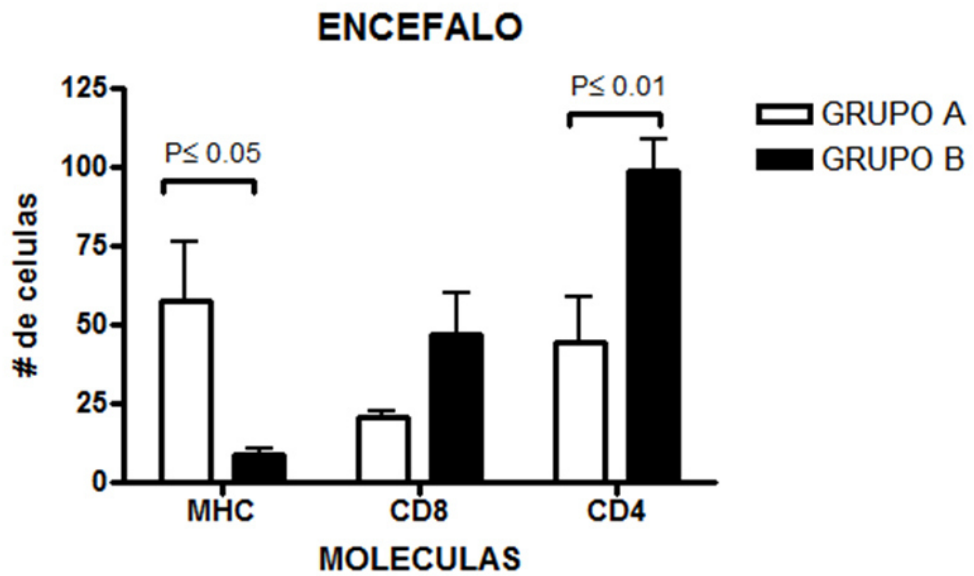


Figura 25.- Comparación entre grupos A y B en cuanto al número de células con marcaje positivo para las moléculas de superficie del estudio y ubicadas en granulomas formados en encéfalo.

En los granulomas de las secciones de tejido renal, las medias del número de células inmunomarcadas para MHC II y CD8 no mostraron diferencia significativa, siendo ligeramente más altos los conteos del grupo B. Sin embargo; en el inmunomarcaje para CD4, el número de reacciones positivas entre ambos grupos presentaron una diferencia significativa ($p < 0.01$) mostrando resultados más altos para el grupo B (Figura 26) tal y como se observó en granulomas de tejido cerebral.

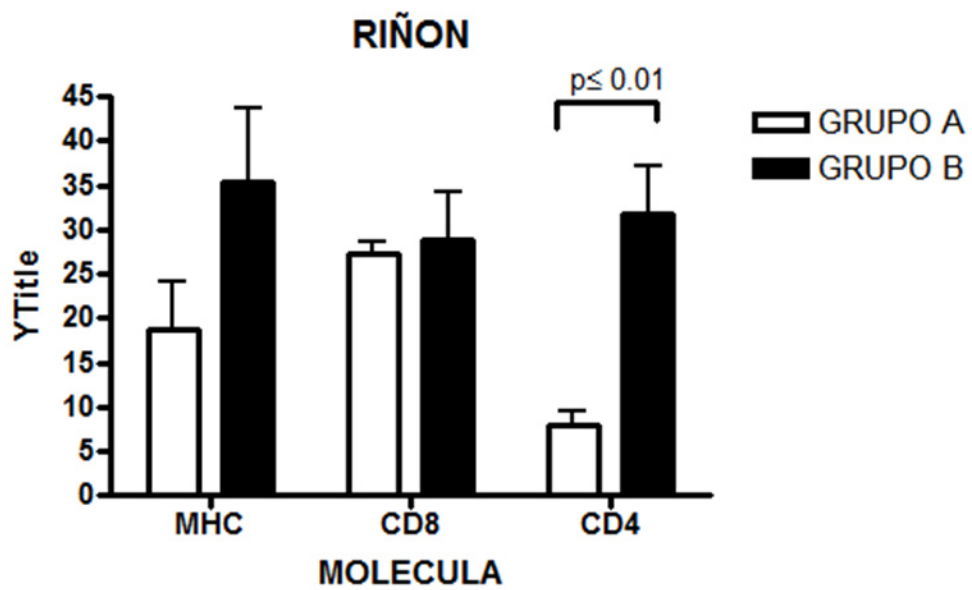


Figura 26.- Comparación entre los grupos A y B del número de células con marcaje positivo a las moléculas de superficie del estudio y localizadas en los granulomas del riñón.

Se compararon los granulomas del encéfalo y riñón del grupo A, encontrándose diferencias. En cuanto número de células con inmunomarcaje para el antígeno CD4 (linfocitos T CD4⁺) ubicadas en granulomas de encéfalos del grupo A; se encontró una diferencia altamente significativa ($p \leq 0.001$) al compararse con las variables de los datos de riñones del mismo grupo (Figura 27) siendo mayor para encéfalo. Dentro de los órganos de los animales del grupo B; también se encontraron diferencias en el número de células positivas a CD4, al encontrarse significativamente distintos ($p \leq 0.05$) los conteos de células en granulomas de encéfalos y riñón (Figura 27). Estos últimos, al igual que en el grupo A mostraron mayor significancia en encéfalo que en riñón.

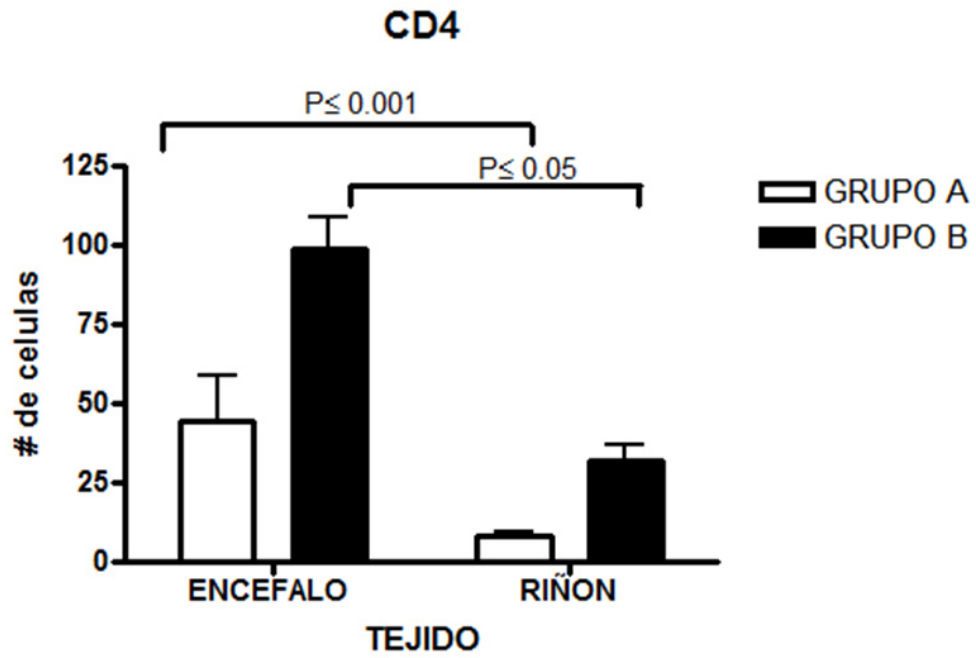


Figura 27.- Comparación entre los órganos de cada grupo, midiendo el número de células con marcaje positivo a las molécula CD4 localizadas en los granulomas ubicados en cada tejido.

Al realizar el análisis estadístico con los datos obtenidos en el conteo de células positivas al inmunomarcaje para la molécula CD8 (linfocitos T CD8⁺) se observó que no había diferencias significativas entre los órganos de los grupos A o B. Sin embargo se observó cierta diferencia en el conteo de células de riñón sobre las de encéfalo del grupo A; mientras que se apreció lo contrario en el grupo B, siendo mayor en encéfalo que en riñón (Figura 28).

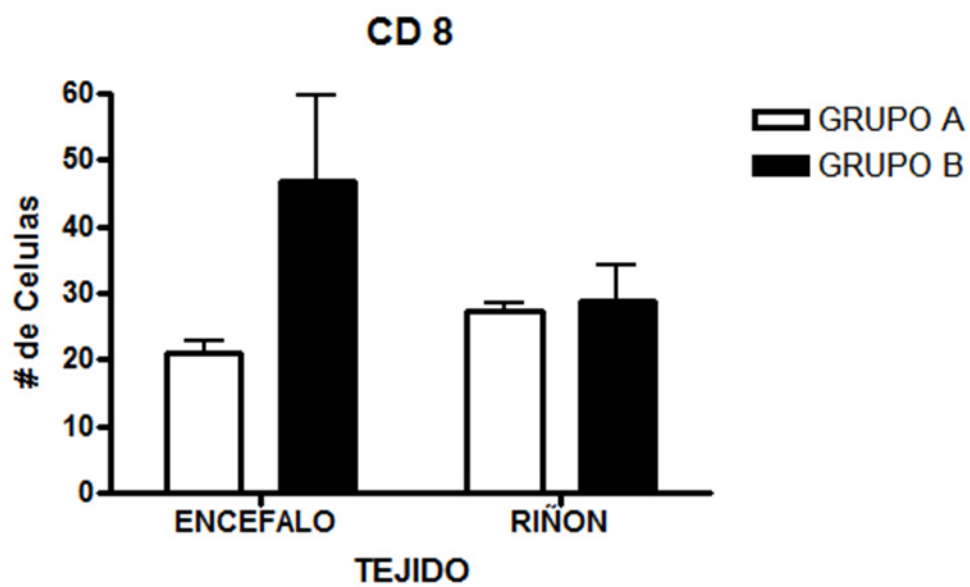


Figura 28.- Comparación entre los órganos de los grupos A y B, midiendo el número de células con marcaje positivo a CD8 localizadas en los granulomas ubicados en cada órgano.

Al comparar las medias de encéfalo con respecto al riñón en el conteo de células positivas a MHC II se obtuvo una diferencia estadística de $p < 0.001$ en mayor número de células en los granulomas de encéfalo (Figura 29). Lo cual no se observó en los conteos del grupo B; donde el conteo celular en granulomas de riñón resultó más alto que en encéfalo, y en los que no se encontró una significancia estadística (Figura 29).

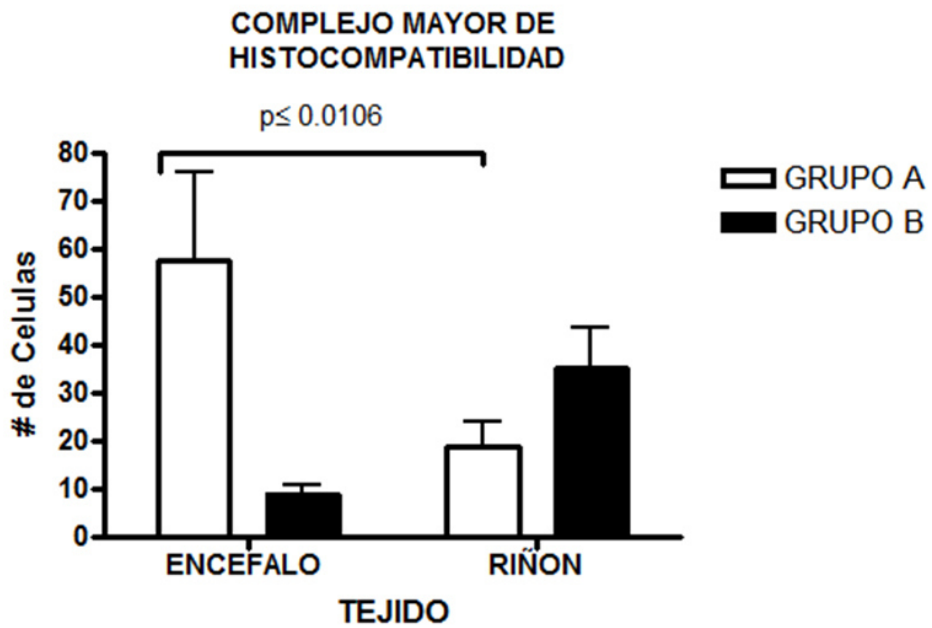


Figura 29.- Comparación entre los órganos de cada grupo, midiendo el número de células con marcaje positivo a MHC II localizadas en los granulomas ubicados en cada tejido.

4. DISCUSIÓN

La encefalitozoonosis representa un potencial zoonótico tanto para los animales domésticos como salvajes, así como para las personas y profesionales que interactúan con ellos. Debido a esto, se han encaminado numerosos estudios enfocados a identificar los múltiples mecanismos de defensa del huésped que participan durante su transmisión, diseminación sistémica, así como su patogenia (Lindsay y Weiss, 2004; Percy y Barthold, 2007). Actualmente se ha estudiado también el papel que juegan tanto la respuesta inmune celular como la humoral, así como la producción de citocinas contra *E. cuniculi*, mayormente en modelos murinos y humanos, tanto en individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos (Salát et al., 2006; Ghosh et al., 2012; Valencakova y Halanova, 2012). No obstante, aunque se cuenta con información relacionada a la infección por *E. cuniculi* en otras especies, es poca la investigación referente en el huésped definitivo, el conejo. Este animal se considera como un modelo experimental idóneo para el estudio las interacciones entre la respuesta inmune y el agente causante de la infección.

Actualmente se conoce muy poco sobre la respuesta inmune generada durante la infección natural con *E. cuniculi* en conejos. En el presente estudio, se investigó la presencia de los marcadores de superficie leucocitaria CD4⁺, CD8⁺ y MHC II, en las células inflamatorias dentro de los granulomas desarrollados en conejos Nueva Zelanda inmunocompetentes e inmunosuprimidos, infectados con *E. cuniculi* de manera natural. El grupo

inmunosuprimido representó una infección microsporidiana oportunista en individuos bajo condiciones de estrés. Para estudiar ambos estados inmunológicos y su interacción con la infección por *E. cuniculi*, se organizaron en cuatro grupos experimentales: A y D representaron los controles positivo y negativo de la infección, respectivamente. Los grupos B y C representaron los tratamientos con dexametasona en animales infectados y no infectados, respectivamente.

La infección natural en los grupos A y B se confirmó con los resultados positivos obtenidos al utilizar las técnicas de la prueba de CIA, histopatología, coprodiagnóstico, urodiagnóstico, IFA e IHC. Con la prueba de CIA, se verificó la presencia de anticuerpos anti-*E. cuniculi*, la cual se evidenció mediante la visualización de la aglutinación de las esporas al desafiarlas con los sueros de los animales infectados (Boot et al., 2000). Posteriormente se identificaron en los conejos de los grupos A y B, las lesiones no supurativas y granulomatosas en el tejido renal y cerebral mediante histopatología. Utilizando el coprodiagnóstico y urodiagnóstico se demostró la presencia de las esporas de *E. cuniculi* en heces y orina, sugiriendo con esto su liberación hacia el medio ambiente (Ozkan et al., 2011; Fukui et al., 2013; Carhan, 2015). Por último, mediante IFA e IHC, se logró la visualización y la localización de las esporas en encéfalo y riñón.

El estado de inmunosupresión generado en los grupos B y C se comprobó mediante el análisis de los parámetros sanguíneos de los mismos al compararlos con el grupo D, el cual representaba a individuos sanos y sin inmunosupresión. Al analizar los porcentajes de hematocrito, se observó que

el estado de anemia se presentó solo en el grupo A, a pesar de que también el grupo B tenía la infección latente. Además, el valor del hematocrito de este último fue similar al de los grupos C y D. Esto quizá pudo deberse al restablecimiento de algún mecanismo compensatorio (homeostasis), a raíz del tratamiento con dexametasona. Y que en estudios *in vitro* utilizando células hematopoyéticas de rata, ratón y humano tratadas con glucocorticoides se han caracterizado como una sensibilización a la eritropoyetina endógena, la cual genera un incremento en los índices de eritropoyesis (Malgor et al., 1974; Golde et al., 1976; von Lindern et al., 1999; Srivastava et al, 2006). Esta información es comparable con la reportada en ratones tratados con dexametasona e infectados con *Schistosoma spp.* (Pyrrho, 2004); infección que genera un cuadro granulomatoso que se asemeja al producido por *E. cuniculi* como el observado en este estudio en los animales del grupo B (ver más adelante).

En los leucogramas se demostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) para los valores de L/M del grupo D con respecto a los demás grupos A, B y C, en los cuales se registró una disminución que sugiere una leucopenia (Manning et al, 1994; Brown, 2002). Mientras que el valor de granulocitos de los grupos A, B y C, se incrementaron con la misma significancia respecto al grupo D. Aunque el grupo B fue similar a A y C, considerando que el grupo B compartía al menos una característica con los demás grupos (infección o inmunosupresión). Por lo tanto, ambos resultados sugieren que la presencia de una infección por *E. cuniculi*, de una inmunosupresión por dexametasona o de ambas condiciones, pueden inducir a una granulocitosis como lo fue en

los grupos A, B y C, además de una monocitopenia y una linfopenia, lo cual coincide con otros estudios previos (Schwarz et al, 2005; Jeklova et al, 2008). Estos investigadores mencionan que tales parámetros son producidos principalmente por condiciones de estrés, como en las observadas en padecimientos infecciosos crónicos. Además, el bajo porcentaje de hematocrito (anemia) observado solamente en el grupo A, puede sugerir que dicho resultado fue producto de la encefalitozoonosis, la cual también se reflejó por los cambios en los demás parámetros analizados (Linfocitos/monocitos bajo y granulocitos alto), y que en conjunto pudieran corresponder con una respuesta inmune a la infección, tal y como fue reportado por Hinton (Hinton et al., 1982) y por Brown (Brown, 2002).

Al comparar las secciones histológicas, teñidas con HE, de los granulomas observados tanto en encéfalo como riñón de los dos grupos A y B, se observó que diferían en cuanto a su extensión y morfología. Tales diferencias histopatológicas coincidieron con lo reportado en conejos (Keeble, 2006) y en ratones (Kotkova et al., 2013) con encefalitozoonosis, en modelos murinos con schistosomiasis (Pyrrho et al., 2002; Pyrrho et al., 2004) y en humanos y conejos con tuberculosis (TB) (Thwaites et al., 2004; Manabe et al., 2008). En el presente estudio, los granulomas encontrados en encéfalo y riñón del grupo A concuerdan con Rodriguez-Tovar et al. (2016) y Leipig et al. (2012); es decir, estructuras compactas de aproximadamente 50-100µm de diámetro, bien delimitadas y con numerosos macrófagos, linfocitos y células epitelioides. Lo anterior es consistente con la descripción de un granuloma originado por una respuesta de tipo T_H1, la cual está mediada principalmente

por IFN- γ , y es responsable de la eliminación de microorganismos intracelulares (Berger, 2000). Sin embargo y como se ha descrito en conejos inmunosuprimidos (Keeble, 2006; Latney et al., 2014) las muestras del grupo B mostraron granulomas con un mayor número de células con inmunomarcaje positivo, pero con límites menos definidos y más diseminados; es decir, morfológicamente poseían características similares a las observadas en los granulomas del tipo T_H2. Esta variación en la morfología del granuloma se ha estudiado más a fondo en ratones infectados con *Schistosoma mansoni* y tratados con dexametasona, donde se registraron valores elevados de IL-10 y bajos niveles de IFN- γ (Phyrro et al., 2002; Aly et al., 2010). Esto pudiera provocar un retraso en el proceso de maduración de los granulomas, ya que esos perfiles de citocinas favorecen la formación de un microambiente anti-inflamatorio, es decir, del tipo T_H2 (Zumla y James, 1996; Berger, 2000). Se sabe que las células presentadoras de antígeno (CPA) proporcionan la señalización necesaria para conducir la respuesta de linfocitos T_H inmaduros hacia T_H1 o T_H2 (Tizard, 2013). En modelos murinos con esquistosomiasis, TB o encefalitozoonosis, se ha reportado la formación de granulomas del tipo T_H1 (Layland et al., 2005; Benoit et al., 2008; Lugo-Villarino et al., 2013; Marino et al., 2014). Sin embargo, en pacientes sanos se ha observado que bajo un tratamiento con corticosteroide se induce la expresión de IL-10 (Couper et al., 2008; Coutinho y Chapman, 2011). La IL-10 se considera como la principal citocina inmunorreguladora durante una respuesta del tipo Th2, ya que inhibe la actividad de los linfocitos T_H1, células NK y macrófagos (Clark, 2007).

Estudios *in vitro* utilizando monocitos y macrófagos humanos y murinos han evidenciado la producción de esta citocina después de la aplicación de glucocorticoides (Clark, 2007). Aunado a esto, la dexametasona afecta la maduración y la expresión de MHC II en células dendríticas (CD) de humanos y ratones (Piemonti et al., 1999; Pan et al., 2001). Lo anterior podría explicar el efecto que este glucocorticoide pudo ocasionar, en los granulomas presentes en el grupo B. Sin embargo, a la fecha no existen estudios inmunohistoquímicos comparativos referentes al microambiente inmunológico dentro del granuloma microsporidiano en modelos animales o modelos *in vitro* con y sin tratamientos inmunosupresor.

En este estudio se encontraron diferencias significativas entre las células CD4⁺ en los grupos A y B, siendo más evidente en los granulomas del grupo B. Estas células mostraron un aumento considerable del 100% y que pudo deberse al efecto de la dexametasona aplicada en los animales de este grupo, tomando en consideración las variadas vías en las que esta droga ejerce sus efectos inductores o supresores sobre el sistema inmune (Franchimont et al., 2000). Al analizar sus efectos en ratones, cerdos y conejos, se ha demostrado que dicho glucocorticoide influye en los procesos de maduración de los timocitos doble positivos (CD4⁺CD8⁺), ejerciendo un fuerte efecto apoptótico sobre estos (Purton et al., 2000; Jeklova et al., 2008) asociado con un posterior aumento en la diferenciación (selección positiva y negativa) de las células sobrevivientes, dirigiéndolas hacia CD4⁺ o CD8⁺ (Berki et al., 2002; Schwarz et al., 2005). Este aumento en el índice de maduración se ha explicado en ratones, identificando a nivel de corteza del

timo las células T doble positivas (CD4⁺CD8⁺) que contienen el marcador temprano de selección positiva CD69⁺ (Berki et al., 2002). En cerdos, se ha observado experimentalmente que dichas células (CD69⁺) son capaces de sobrevivir las señales apoptóticas ejercidas durante la selección negativa en la región cortico-medular del timo, al administrárseles dexametasona (Schwarz et al., 2005). En conejos clínicamente sanos, la administración de este glucocorticoide tiende a aumentar el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ a nivel general, mientras que el porcentaje de los linfocitos T CD8⁺ se mantienen sin un cambio aparente (Jeklova et al., 2008). Con esto último, se podría sugerir que el tratamiento con dexametasona en conejos afecta principalmente a las células CD4⁺. Sin embargo, en cuanto a la presencia de CD8⁺ en los granulomas del encéfalo y del riñón en los conejos del grupo B, ésta no se vio afectada por la aplicación del glucocorticoide. No obstante de que se observó un incremento de células CD8⁺ en ambos órganos del grupo B, no se consideró significativo, a pesar de que la señal positiva para células CD8⁺ fue más evidente en los granulomas de encéfalo. La razón para esta diferencia se desconoce, por lo que son necesarios estudios posteriores que permitan explicar quizás el papel de las células presentadoras de antígeno en el reclutamiento y selección de las células CD4⁺ y CD8⁺ en el microambiente del granuloma microsporidiano.

Para el caso de las moléculas MHC II las diferencias observadas entre los grupos A y B pudieron deberse a la interacción entre la infección y los resultados del tratamiento con dexametasona. En este estudio se sugiere que la expresión de MHC II en CPA de granulomas de encéfalo en el grupo A

fue debido a la captura, procesamiento y presentación de los antígenos de *E. cuniculi* (Khan et al., 2001). Por otro lado, la baja cantidad en el número de MHC II en los granulomas en encéfalos del grupo B, se interpretaría como resultado de los efectos desencadenantes tras la aplicación de la dexametasona. Esto se iniciaría por una inducción a la diferenciación de células productoras de citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) con una considerada disminución en su actividad antimicrobiana de macrófagos y células dendríticas, por efecto de la dexametasona (Coutinho y Chapman, 2011). Este efecto se ha visto en CPA de modelos experimentales humanos y murinos (Piemonti et al., 1999) y en células CD4⁺ y CD8⁺ en humanos (Richards et al., 2000; Bartels et al, 2007), en donde la alta producción de IL-10 en humanos y en modelos murinos, originada por la aplicación de un glucocorticoide, se relaciona con una baja expresión de MHC II y una limitada activación de CPA (Cella et al., 1996; Grewal et al., 1996; Xia et al., 2005). Por lo tanto, estos efectos se podrían relacionar con la disminución del inmunomarcaje para MHC II encontrada en encéfalos del grupo B, con una probable sobreexpresión de IL-10 producida a raíz de la aplicación de la dexametasona.

En el riñón, al comparar la cantidad de células que expresaron MHC II dentro del microambiente de granulomas para ambos grupos, no se encontró una diferencia significativa. No obstante, se sugiere que el discreto aumento en el número de células positivas para MHC II, en granulomas de riñón del grupo B respecto al grupo A, quizás se originó por una mayor presencia de la espora circulante (Jeklova et al., 2010). Esta posibilidad se abre, al

considerar que la aplicación de dexametasona en animales con encefalitozoonosis tiende a exacerbar las áreas de lesión renal así como el aumento en la distribución de la espora por el organismo (Latney et al., 2014), lo cual generaría una mayor captación y procesamiento de la misma, con el posterior aumento de MHC II. En este estudio, se corroboró esta observación, ya que la morfología de los granulomas formados en el grupo tratado con dexametasona fue consistente con las características de un granuloma del tipo T_H2, el cual no puede contener al agente infeccioso (Keeble, 2006).

5. CONCLUSIONES

El efecto de la dexametasona promueve un cambio en el fenotipo celular de T_H1 a T_H2 en el granuloma por efecto de la inmunosupresión bajo condiciones de infección natural.

El efecto de la inmunosupresión estimuló la presencia de células CD4⁺ en animales infectados naturalmente, modificando el fenotipo celular en el granuloma microsporidiano.

En el riñón se observó una mayor respuesta de tipo citotóxica sobre la de tipo cooperadora por efecto de la espora. Dicho fenotipo celular fue revertido por la inmunosupresión.

A nivel renal la inmunosupresión promovió un aumento en la presencia del MCH II en animales infectados y la redujo a nivel cerebral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Akkada, S. S., Ashmawy, K. I., y Dweir, A. W. (2014). First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. *Parasitology Research Parasitol Res*, 114(3), 843-850.

Accoceberry, I., y D'Almeida-Fourquet, M. (2012). Diagnostic des microsporidioses intestinales. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 440, 27-34.

Aldras AM, Orenstein JM, Kotler DP, Shadduck JA y Didier ES. (1994). Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol*.

Alfa Cisse, O., Ouattara, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Biligui, S. y Minta, D. et al. (2002). Evaluation of an Immunofluorescent-Antibody Test Using Monoclonal Antibodies Directed against *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* for Diagnosis of Intestinal Microsporidiosis in Bamako (Mali). *Journal Of Clinical Microbiology*, 40(5), 1715-1718.

Al-Mekhlafi, M. A.; Fatmah, M. S.; Anisah, N.; Azlin, M.; Al-Mekhlafi, H. M. y Norhayati, M. (2011). Species identification of intestinal microsporidia using immunofluorescence antibody assays. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42, 19-24.

Al-Sadi, H. I., y Al-Mahmood, S. S. (2014). Pathology of Experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunocompetent and Immunosuppressed Mice in Iraq. *Pathology Research International*, 1-6.

Aly, Ibrahim Rb, Mohamed A. Hendawy, Eman Ali, Eman Hassan y Mona Mf Nosseir. (2010). Immunological and Parasitological Parameters after Treatment with Dexamethasone in Murine Schistosoma Mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 105.6: 729-35. Web.

Anane, S. y Attouchi, H. (2010). Microsporidiosis: Epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroentérologie Clinique Et Biologique*, 34(8-9), 450-464.

Bartels, L. E., Jørgensen, S. P., Agnholt, J., Kelsen, J., Hvas, C. L. y Dahlerup, J. F. (2007). 1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone increase interleukin-10 production in CD4 T cells from patients with Crohn's disease. *International Immunopharmacology*, 7(13), 1755-1764.

Bártová, E., Marková, J., y Sedlak, K. (2015). Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in European hares (*Lepus europaeus*). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine Ann Agric Environ Med*, 22(4), 674-676.

Benoit, M., Desnues, B., y Mege, J. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology*, 181(6), 3733-3739.

Berger, A. (2000). Science commentary: Th1 and Th2 responses: What are they? *Bmj*, 321(7258), 424-424.

Berki, T., Palinkas, L., Boldizsar, F., Nemeth, P., 2002. Glucocorticoid (GC) sensitivity and GC receptor expression differ in thymocyte subpopulations. *Int. Immunol.* 14, 463–469.

Bishop, G. A. (1991). Requirements of class II-mediated B cell differentiation for class II cross-linking and cyclic AMP. *J. Immunol.* 147: 1107–1114.

Bohne, W., Böttcher, K., y Groß, U. (2011). The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: Biogenesis and characteristics of the host cell–pathogen interface. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 395-399.

Boot, R., Hansen, A. K., Hansen, C. K., Nozari, N., y Thuis, H. C. W. (2000). Comparison of assays for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animals*, 34(3), 281–289.

Broos, C. E., van Nimwegen, M., Hoogsteden, H. C., Hendriks, R. W., Kool, M., y van den Blink, B. (2013). Granuloma Formation in Pulmonary Sarcoidosis. *Frontiers in Immunology*, 4, 437.

Brown, F. (2002). Clinical Pathology. In Textbook of rabbit medicine (1st ed.). *Oxford: Butterworth-Heinemann*.

Burke, R. L., West, M. W., Erwin-Cohen, R., Selby, E. B., Fisher, D. E., y Twenhafel, N. A. (2010). Alterations in Cytokines and Effects of Dexamethasone Immunosuppression during Subclinical Infections of Invasive *Klebsiella pneumoniae* with *Hypermucoviscosity Phenotype* in Rhesus (*Macaca mulatta*) and Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) Macaques. *Comparative Medicine*, 60(1), 62–70.

Carhan, A., Ozkan, O., y Ozkaya, E. (2015). The First Identification of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in an Animal Care Worker in Turkey. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(2), 280–285.

CDC. (2013). Microsporidiosis. Retrieved November 12, 2015, de <http://www.cdc.gov/dpdx/microsporidiosis/dx.html>

Cella M, Sheidegger D, Palmer-Lehman K, Lane P, Lanzavechia A. y Alber G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med.* 184:747.

Chensue, S. W., Warmington, K., Ruth, J. H., y Kunkel, S. L. (1997). Effect of slow release IL-12 and IL-10 on inflammation, local macrophage function and the regional lymphoid response during mycobacterial (Th1) and schistosomal (Th2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. *Inflammation Research*, 46(3), 86-92.

Chiang GG, Sefton BM (2001). Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (25): 23173–8.

Clark, A. R. (2007). Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 275(1-2), 79-97.

Couper, K. N., Blount, D. G., y Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *The Journal of Immunology*, 180(9), 5771-5777.

Coutinho, A. E., y Chapman, K. E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(1), 2-13.

Cox J.C., Gallichio H.A., Pye D. y Walden N.B. (1977). Application of immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi*-free rabbit colony. *Lab Anim Sci* 27:204–209.

Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A., y Joachim, A. (2008). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): Pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology Research Parasitol Res*, 629-635.

Csokai, J., Joachim, A., Gruber, A., Tichy, A., Pakozdy, A., y Künzel, F. (2009). Diagnostic markers for encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 163(1-2), 18–26.

Dall, D. (1983). A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the microspora. *Journal of Theoretical Biology*, 105(4), 647-659.

Desportes, I., Charpentier, Y. L., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A. y Modigliani, R. (1985). Occurrence of a New Microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the Enterocytes of a Human Patient with AIDS1. *The Journal of Protozoology*, 32(2), 250-254.

Desportes-Livage, I. (2000). Biology of Microsporidia. Cryptosporidiosis and Microsporidiosis Contributions to Microbiology, 140-165.

Didier, E. S., Didier, P. J., Snowden, K. F. y Shadduck, J. A. (2000). Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection*, 2(6), 709-720.

Didier, E. S., Orenstein, J. M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L. B., y Janney, F. A. (1995). Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(12), 3138–3145.

Didier, E. y Weiss, L. (2011). Microsporidiosis. Current Opinion. *In Infectious Diseases*, 24(5), 490-495.

Didier, E., Stovall, M., Green, L., Brindley, P., Sestak, K. y Didier, P. (2004). Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology*, 126(1-2), pp.145-166.

Didier, E., Vossbrinck, C., Baker, M., Rogers, L., Bertucci, D. y Shadduck, J. (1995). Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*, 111(04), p.411.

Epstein, F. H., Reiser, H., y Stadecker, M. J. (1996). Costimulatory B7 Molecules in the Pathogenesis of Infectious and Autoimmune Diseases. *New England Journal of Medicine* N Engl J Med, 335(18), 1369-1377.

Fasshauer, V., Gross, U., y Bohne, W. (2005). The Parasitophorous Vacuole Membrane of *Encephalitozoon cuniculi* Lacks Host Cell Membrane Proteins Immediately after Invasion. *Eukaryotic Cell*, 4(1), 221-224.

Flynn, R. J., Baker, D. G., y Flynn, R. J. (2007). *Flynn's parasites of laboratory animals*. Ames, IA: Blackwell Pub.

Franchimont, D., Galon, J., Gadina, M., Visconti, R., Zhou, Y. y Aringer, M. et al. (2000). Inhibition of Th1 Immune Response by Glucocorticoids: Dexamethasone Selectively Inhibits IL-12-Induced Stat4 Phosphorylation in T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 164(4), 1768-1774.

Franzen, C. (2005). How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitologica*, 52(1), 36-40.

Franzen, C., Müller, A., Hartmann, P., y Salzberger, B. (2005). Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology*, 130(3), 285-292.

- Fukui, D., Bando, G., Furuya, K., Yamaguchi, M., Nakaoka, Y., Kosuge, M. y Murata, K. (2013). Surveillance for an Outbreak of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits Housed at a Zoo and Biosecurity Countermeasures. *Journal of Veterinary Medical Science J. Vet. Med. Sci.*, 75(1), 55-61.
- Furuya, K., Omura, M., Kudo, S., Sugiura, W., y Azuma, H. (2007). Recognition profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human immunoglobulin M antibodies. *Parasite Immunol Parasite Immunology*, 0(0).
- Garcia, L. S. (2002). Laboratory Identification of the Microsporidia. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(6), 1892-1901.
- Ghosh K., Schwartz D. y Weiss LM. (2014). Laboratory Diagnosis of Microsporidia. In: Weiss LM, Becnel JJ, editors. *Microsporidia*. John Wiley & Sons, Inc., 421-456.
- Ghosh, K. y Weiss, L. M. (2009). Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*.1-13.
- Ghosh, K., Nieves, E., Keeling, P., Cali, A., y Weiss, L. M. (2012).A new vesicular compartment in *Encephalitozoon cuniculi*.*Microbes and Infection*, 14(4), 324-328.
- Giordano, C., Weigt, A., Vercelli, A., Rondena, M., Grilli, G., y Giudice, C. (2005). Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Vet Ophthalmol Veterinary Ophthalmology*, 8(4), 271-275.

Golde, D. W., Bersch, N. y Cline, M. J. (1976). Potentiation of erythropoiesis in vitro by dexamethasone. *Journal of Clinical Investigation* J. Clin. Invest., 57(1), 57-62.

Grewal I, Foellmer H y Grewal K. (1996). Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation and experimental allergic encephalomyelitis. *Science*;273:1864.

Gutierrez, M., Forster, F., McConnell, S., Cassidy, J., Pollock, J., y Bryson, D. (1999). The detection of CD2⁺, CD4⁺, CD8⁺, and WC1⁺ T lymphocytes, B cells and macrophages in fixed and paraffin embedded bovine tissue using a range of antigen recovery and signal amplification techniques. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71(3-4), 321-334.

Habenbacher, B., Klang, A., Fragner, K., Dinhopf, N., Kunzel, F. y Weissenböck, H. (2012). Comparative evaluation of specific methods for labeling of *Encephalitozoon cuniculi* in paraffin wax-embedded tissue samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(2), 370-375.

Hague, B. F., Sawasdikosol, S., Brown, T. J., Lee, K., Recker, D. P., y Kindt, T. J. (1992). CD4 and its role in infection of rabbit cell lines by human immunodeficiency virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(17), 7963-7967.

Harrison, S. C. (1993). CD4: Structure and interactions of an immunoglobulin superfamily adhesion molecule. *Accounts of Chemical Research* Acc. Chem. Res., 26(8), 449-453.

Hester, J. D., Varma, M., Bobst, A. M., Ware, M. W., Lindquist, H. D. y Schaefer, F. W.,3rd. (2002). Species-specific detection of three human-pathogenic microsporidial species from the genus *Encephalitozoon* via fluorogenic 5' nuclease PCR assays. *Molecular and Cellular Probes* 16: 435-444.

Hinton M., Jones D. y Festing, M. (1982). Haematological findings in healthy and diseased rabbits, a multivariate analysis. *Laboratory Animals*, 123-129.

Hocevar, S. N., Paddock, C. D., Spak, C. W., Rosenblatt, R., Diaz-Luna, H., Castillo, I. y Kuehnert, M. J. (2014). Microsporidiosis Acquired Through Solid Organ Transplantation. *Annals of Internal Medicine Ann Intern Med*, 160(4), 213-220.

Holling, T. M., Schooten, E., y Elsen, P. J. (2004). Function and regulation of MHC class II molecules in T-lymphocytes: Of mice and men. *Human Immunology*, 65(4), 282-290.

James, D. G. (2000). A clinicopathological classification of granulomatous disorders. *Postgraduate Medical Journal*, 76(898), 457-465.

Jeklova, E., Leva, L., Jaglic, Z., y Faldyna, M. (2008). Dexamethasone-induced immunosuppression: A rabbit model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 122(3-4), 231–240.

Jeklova, E., Leva, L., Kovarcik, K., Matiasovic, J., Kummer, V., Maskova, J. y Faldyna, M. (2010). Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Parasitology*, 137(12), 1749-1757.

Jordan, C. N., Zajac, A. M., Snowden, K. S., y Lindsay, D. S. (2006). Direct agglutination test for *Encephalitozoon cuniculi*. *Veterinary Parasitology*, 135(3-4), 235-240.

Joseph, J., Vemuganti, G. K., Garg, P., y Sharma, S. (2006). Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by different stains. *BMC Clinical Pathology BMC Clin Pathol*, 6(1), 6.

Keeble, E. (2006). Nervous and musculoskeletal disorders. In Meredith A and Flecknell P (eds), *BSAVA Manual of Rabbit Medicine and Surgery* (2nd edn), *British Small Animal Veterinary Association, Gloucester*: 103-116.

Keeling, P. J y McFadden, G. I. (1998). Origins of microsporidia. *Trends Microbiol*, 6, 19-23.

Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH y Moretto M. (1999). CD8⁺ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol*. 162(10):6086-91.

Khan, I. A., Moretto, M. y Weiss, L. M. (2001). Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 3(5), 401–405.

Khan, I. A., y Moretto, M. (1999). Role of Gamma Interferon in Cellular Immune Response against Murine *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *Infection and Immunity*, 67(4), 1887–1893.

Khanaliha, K., Mirjanali, H., Mohebal, M., Tarighil, F., y Rezaeian, M. (2014). Comparison of Three Staining Methods for the Detection of Intestinal *Microspora Spp.* *Iranian Journal of Parasitology*, 9(4), 445–451.

Kim, K., Yoon, S., Cheun, H., Kim, J., Sim, S., y Yu, J. (2015). Detection of *Encephalitozoon spp.* from Human Diarrheal Stool and Farm Soil Samples in Korea. *Journal of Korean Medical Science J Korean Med Sci*, 30(3), 227.

Kotkova, M., Sak, B., Kvetonova, D., y Kvac, M. (2013). Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole. *PLoS ONE*, 8(4).

Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J. y Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 115-124.

Künzel, F., y Joachim, A. (2009). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research Parasitol Res*, 106(2), 299-309.

Lallo, M. A., Vidoto Da Costa, L. F., Alvares-Saraiva, A. M., Rocha, P. R. D., Spadacci-Morena, D. D., Konno, F. T. de C. y Suffredini, I. B. (2016). Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 78(2), 171–176.

Latney, L., Wyre, N. N. y Bradley, C. C. (2014). *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: Diagnosis and optimal management. *Veterinary Medicine: Research and Reports VMRR*, 169.

Lawlor, E. M., Moretto, M. M. y Khan, I. A. (2010). Optimal CD8⁺ T-Cell Response against *Encephalitozoon cuniculi* Is Mediated by Toll-Like Receptor 4 Upregulation by Dendritic Cells. *Infection and Immunity*, 78(7), 3097-3102.

Leguern, C., Marche, P. N., y Kindt, T. J. (1985). Molecular evidence for five distinct MHC class II? Genes in the rabbit. *Immunogenetics*, 22(2), 141-148.

Leipig, M., Matiasek, K., Rinder, H., Janik, D., Emrich, D., Baiker, K. y Hermanns, W. (2012). Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1), 16-26.

Lindsay, D. S. y Weiss, L. M. (2004). Opportunistic infections: Toxoplasma, sarcocystis, and microsporidia. *Boston: Kluwer Academic*.

Liu, X., Zhan, Z., Li, D., Xu, L., Ma, F., Zhang, P. y Cao, X. (2011). Intracellular MHC class II molecules promote TLR-triggered innate immune responses by maintaining activation of the kinase Btk. *Nature Immunology* Nat Immunol, 12(5), 416-424.

Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., y Xia, B. (2012). CD4 T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 1-12.

Lugo-Villarino, G., Hudrisier, D., Benard, A. y Neyrolles, O. (2013). Emerging Trends in the Formation and Function of Tuberculosis Granulomas. *Front. Immun. Frontiers in Immunology*, 3.

Luna, V. A., Stewart, B. K., Bergeron, D. L., Clausen, C. R., Plorde, J. J., y Fritsche, T. R. (1995). Use of the Fluorochrome Calcofluor White in the Screening of Stool Specimens for Spores of Microsporidia. *American Journal of Clinical Pathology* Am J Clin Pathol, 103(5), 656-659.

Lydyard, P. M., Whelan, A., Fanger, M. W., y Lydyard, P. M. (2011). *Immunology. New York: Garland Science.*

Malgor, L., Torales, P., Klainer, E., Barrios, L. y Blanc, C. (1974). Effects of Dexamethasone on Bone Marrow Erythropoiesis. *Hormone Research Horm Res*, 5(5), 269-277.

Manabe, Y., Kesavan, A., Lopez-Molina, J., Hatem, C., Brooks, M., Fujiwara, R. y Mendez, S. (2008). The aerosol rabbit model of TB latency, reactivation and immune reconstitution inflammatory syndrome. *Tuberculosis*, 88(3), 187-196.

Manning, P., Ringler, D. y Newcomer, C. (1994). Hematology. *The Biology of the Laboratory Rabbit*, Xi-Xi.

Marino, S., Cilfone, N. A., Mattila, J. T., Linderman, J. J., Flynn, J. L., y Kirschner, D. E. (2014). Macrophage Polarization Drives Granuloma Outcome during *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Infection and Immunity Infect. Immun.*, 83(1), 324-338.

Mathis, A. (2000). Microsporidia: Emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *International Journal for Parasitology*, 30(7), 795-804.

Mathis, A., Weber, R. y Deplazes, P. (2005). Zoonotic Potential of the Microsporidia. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(3), 423–445.

Meyers, J. (2011). Overview of heat-induced Epitope retrieval (HIER) techniques and devices. Retrieved November 13, 2015, from http://www.ihcworld.com/_protocols/epitope_retrieval/overview.htm

Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F., y Altare, F. (2012). The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1-14.

Nashar, T y Drake, J. (2006). Dynamics of MHC Class II-Activating Signals in Murine Resting B Cells. *The Journal of Immunology*, 176(2), 827-838.

Neuschl J, Čonkova E, Krokavec P, Čelarova E, Halanova M, Hipikova V, Balent P y Šutiak V (1999) The development of encephalitozoonosis in rabbits after infection by *Encephalitozoon cuniculi* and treatment with albendazole. *Acta Vet (Beograd)* 49 (4):327–334.

Owen, D. (1992). Parasites of laboratory animals. Laboratory Animals Ltd por *Royal Society of Medicine Services Limited*.

Ozkan, O., Ozkan, A. T. y Zafer, K. (2011). Encephalitozoonosis in New Zealand rabbits and potential transmission risk. *Veterinary Parasitology*, 179(1-3), 234-237.

Pan, J., Dianwen J., Qingqing W., Minghui Z., Dajing X., Lihuang Z., Hai Y. y Xuetao C. (2001). Dexamethasone Inhibits the Antigen Presentation of Dendritic Cells in MHC Class II Pathway. *Immunology Letters* 76.3: 153-61.
Web.

Pan, Y., Wang, S., Liu, X., Li, R., Sun, Y. y Gadahi, J. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Humans and Rabbits in China. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(2), 290–295.

Pelin, A., Moteshareie, H., Sak, B., Selman, M., Naor, A., Eyahpaise, M. y Corradi, N. (2016). The genome of an *Encephalitozoon cuniculi* type III strain reveals insights into the genetic diversity and mode of reproduction of a ubiquitous vertebrate pathogen. *Heredity*.

Percy, D. y Barthold S. (2009). Pathology of laboratory rodents and rabbits. Third, 290-293. *Blackwell Publishing*.

Petri, M. (1969). Studies on *Nosema cuniculi* found in transplantable ascites tumours with a survey of microsporidiosis in mammals. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*. Suppl. 204.

Piemonti L., Monti P., Allavena P., Leone B., Caputo A. y Di Carlo V. (1999). Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*; 162: 6473–6481.

Purton, J., Boyd, R., Cole, T. y Godfrey, D. (2000). Intrathymic T cell development and selection proceeds normally in the absence of glucocorticoid receptor signaling. *Immunity* 13, 179–186.

Pyrrho, A. D., Ramos, J. A., Neto, R. M., Silva, C. S., Lenzi, H. L., Takiya, C. M., y Gattass, C. R. (2002). Dexamethasone, a Drug for Attenuation of *Schistosoma mansoni* Infection Morbidity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3490-3498.

Pyrrho, A. S., Lenzi, H. L., Ramos, J. A., Moura-Neto, R., Cachem, F. C., Silva, C. S. y Gattass, C. R. (2004). Dexamethasone treatment improves morphological and hematological parameters in chronic experimental schistosomiasis. *Parasitology Research*, 92 (6), 478-483.

Qiu, B., Frait, K. A., Reich, F., Komuniecki, E., y Chensue, S. W. (2001). Chemokine Expression Dynamics in Mycobacterial (Type-1) and Schistosomal (Type-2) Antigen-Elicited Pulmonary Granuloma Formation. *The American Journal of Pathology*, 158(4), 1503-1515.

Reabel, S. (2012). Molecular diagnostic methods for detection of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits. Msc thesis in Pathobiology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.

Richards, D., Fernandez, M., Caulfield, J. y Hawrylowicz, C. (2000). Glucocorticoids drive human CD8 T cell differentiation towards a phenotype with high IL-10 and reduced IL-4, IL-5 and IL-13 production. *European Journal of Immunology Eur. J. Immunol.*, 30(8), 2344-2354.

Richardson, V. (1999). Rabbits: Health, husbandry and diseases. Oxford: *Blackwell Science*.

Rodríguez-Tovar, L., Rodríguez Ramírez, H., Valdez Nava, Y., Nevárez Garza, A., y Ramírez Romero, R. (2011). Empleo de una tinción rápida para el diagnóstico de microsporidiosis. *Veterinaria México*, 42(2), 179-185.

Rodríguez-Tovar, L. E., Nevárez-Garza, A. M., Trejo-Chávez, A., Hernández-Martínez, C. A., Hernández-Vidal, G., Zarate-Ramos, J. J., y Castillo-Velázquez, U. (2016). *Encephalitozoon cuniculi*: Grading the Histological Lesions in Brain, Kidney, and Liver during Primoinfection Outbreak in Rabbits. *Journal of Pathogens*, 1-9.

Rodriguez-Tovar, L., Wadowska, D., Wright, G., Groman, D., Speare, D., y Whelan, D. (2003). Ultrastructural evidence of autoinfection in the gills of

Atlantic cod *Gadus morhua* infected with *Loma* sp. (phylum *Microsporidia*). *Diseases of Aquatic Organisms Dis. Aquat. Org.*, 57, 227-230.

Rosell, J. (2000). Enfermedades del conejo. Madrid (España): Ediciones Mundi-Prensa.

Sak, B., Kváč, M., Kučerová, Z., Květoňová, D., y Saková, K. (2011). Latent Microsporidial Infection in Immunocompetent Individuals—A Longitudinal Study. *Plos Negl Trop Dis*, 5(5), e1162.

Scharton-Kersten, T., Denkers, E., Gazzinelli, R., y Sher, A. (1995). Role of IL 12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Research in Immunology*, 146(7-8), 539-545.

Schwarz, E., Saalmüller, A., Gerner, W. y Claus, R., (2005). Intraepithelial but not lamina propria lymphocytes in the porcine gut are affected by dexamethasone treatment. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105, 125–139.

Shadduck, J. A. y Pakes, S. P. (1971). Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *American Journal of Pathology*. 64, 657-674.

Shiue, L. (1988). A second chain of human CD8 is expressed on peripheral blood lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 168(6), 1993-2005.

Spellberg, B., y Edwards, J. E. (2001). Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 32(1), 76-102.

Srivastava, A. S., Kaushal, S., Mishra, R., Lane, T. A. y Carrier, E. (2006). Dexamethasone facilitates erythropoiesis in murine embryonic stem cells differentiating into hematopoietic cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(2), 508-516.

Stark, D., Barratt, J. L., Hal, S. V., Marriott, D., Harkness, J. y Ellis, J. T. (2009). Clinical Significance of Enteric Protozoa in the Immunosuppressed Human Population. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(4), 634-650.

Suter C, Müller-Doblies U., Hatt J., y Deplazes P. (2001). Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Vet Rec* 148:478–480.

Thwaites, G. E., Bang, N. D., Dung, N. H., Quy, H. T., Oanh, D. T., Thoa, N. T. y Farrar, J. J. (2004). Dexamethasone for the treatment of tuberculous meningitis in adolescents and adults. *New England Journal of Medicine* N Engl J Med, 351(17), 1741-1751.

Tizard, Ian R. (2013). *Veterinary Immunology*. St. Louis, MO: Elsevier/Saunders. Impreso.

Todd, I. (2015). *Immunology: Lecture notes*. Chichester: Wiley-blackwell.

Tsai, M. C., Chakravarty, S., Zhu, G., Xu, J., Tanaka, K., Koch, C. y Chan, J. (2006). Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: Cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell Microbiol Cellular Microbiology*, 8(2), 218-232.

Turner, J. M., Brodsky, M. H., Irving, B. A., Levin, S. D., Perlmutter, R. M. y Littman, D. R. (1990). The intracytoplasmic serine residues that serve as phosphorylation targets and the p56LCK-binding region (Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56lck with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs). *Cell* 60, 755-765.

Valencakova, A., Balent, P., Ravaszova, P., Horak, A., Obornik, M., Halanova, M. y Goldova, M. (2011). Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. *Parasitology Research Parasitol Res*, 110(2), 689-693.

Valencakova, A., y Halanova, M. (2012). Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 35(1), 1-7.

Valencakova, A.; Lesnik, F. y Balent, P. (2004). Host immune response in mammals to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 53, 136-41.

Vaquero, N. L, Mussari, C, y Girard Bosch, M. C. (2010). Modelo natural de dicotomía TH1-TH2: La enfermedad de Hansen. *Revista argentina de dermatología*, 91(3), 00.

Veillette, A., Abraham, N., Caron, L. y Davidson, D. (1991). The lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56lck. *Semin.Immun.* 3, 143–152.

von Lindern M, Zauner W. y Mellitzer G. (1999). The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood*, 94(2):550–559.

Wallace, V. A., Penninger, J., y Mak, T. W. (1993). CD4, CD8 and tyrosine kinases in thymic selection. *Current Opinion in Immunology*, 5(2), 235-240.

Wangoo, A., Sparer, T., Brown, I. N., Snewin, V. A., Janssen, R., Thole, J. y Young, D. B. (2001). Contribution of Th1 and Th2 Cells to Protection and

Pathology in Experimental Models of Granulomatous Lung Disease. *The Journal of Immunology*, 166(5), 3432-3439.

Wasson, K., y Peper, R. L. (2000). Mammalian Microsporidiosis. *Veterinary Pathology*, 37 (2), 113-128.

Weber, R., Deplazes, P., y Schwartz, D. (2000). Diagnosis and Clinical Aspects of Human Microsporidiosis. *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis Contributions to Microbiology*, 166-192.

Weiss, L. (2000). Molecular Phylogeny and Diagnostic Approaches to Microsporidia. *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis Contributions to Microbiology*, 209-235.

Weiss, L. M. (2014). Microsporidia: Pathogens of opportunity. Ames, IA: *Wiley Blackwell*.

Wright, J. H. (1922). Infectious Motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Medicine*, 36 (1), 135-140.

Wright, K. (2014). The life cycle of *Encephalitozoon cuniculi*. Retrieved March 12, 2016, from <http://www.smallanimalchannel.com/critter-magazines/rabbits-usa/2012-annual/e-cuniculi-life-cycle.aspx>

Yamamura, M. (1992). Defining protective responses to pathogens: Cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 255(5040), 12-12.

Yazar, S., Koru, O., Hamamci, B., Cetinkaya, U. Karaman, U. y Kuk, S. (2013). Microsporidia and microsporidiosis. *TurkiyeParazitoloDerg.* 37, 123-34.

Zachary, J. F., y McGavin, M. D. (2012). Pathologic basis of veterinary disease (5th ed.). St. Louis, MO: *Elsevier*.

Zhu, J. y Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: Fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569.

Zietek J, Adaszek L, Dziegiel B, Kalinowski M, Bartnicki M. y Kalinowska A. (2012) Diagnosis of the *Encephalitozoon cuniculi* infections in pet rabbits with neurological symptoms. *Pol J Vet Sci*; 17(2):361-363.

Zumla, A., y James, D. G. (1996). Granulomatous Infections: Etiology and Classification. *Clinical Infectious Diseases*, 23(1), 146-158.

APÉNDICE

A.- Técnicas y métodos

A-1 Inclusión en parafina

- 1.- Obtener la muestra.
- 2.- Fijar con formaldehído al 10% por 48 horas.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Deshidratar en alcoholes graduales del 60 al 100%.
- 5.- Aclarar con xilol.
- 6.- Preincluir en parafina.
- 7.- Incluir en parafina formando los bloques.

A-2 IFA de esporas en tejido

Pasos previos:

- 1.- Tener las muestras fijadas en laminillas recubiertas con poli-L-lisina.
- 2.- Precalear el buffer de citratos a 80°C.
- 3.- Preparar una cámara húmeda a 35-40°C.

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar en xilol por 5 minutos.
- 2.- Rehidratar en alcoholes graduales (etanol) del 100%, 100%, 70% y 30%, 5 minutos c/u.
- 3.- Terminar hidratación con agua destilada, 5 minutos.
- 4.- Recuperar antigenicidad, colocando las laminillas dentro de algún estuche (permitiendo el contacto con los líquidos) y este a su vez dentro del buffer de citratos (pH 6, Ac. cítrico 10Mm) previamente calentado (¡Precaución, manejará materiales calientes!). Dejar por 80 minutos.
- 5.- Retirar del buffer y dejar atemperar. Se puede colocar un poco del mismo buffer de citratos para evitar que se reseque la sección de tejido.
- 6.- Fijar en metanol de 3-5 minutos.
- 7.- Retirar y dejar secando de 1-2 minutos.
- 7.- Fijar en acetona, previamente helada a -20°C por 10 minutos.
- 8.- Secar por 1-2 minutos
- 9.- Rehidratar utilizando PBS por 5 minutos, para luego aspirarlo con una micropipeta.
- 10.- Colocar 60µl del anticuerpo primario (producto listo para usarse) sobre el tejido de las laminillas y mantenerlo dentro de la cámara húmeda (previamente calentada) por 30 minutos.
- 11.- Lavar con PBS (dejarlo húmedo hasta el paso 13) no dejar que la temperatura de la cámara húmeda baje demasiado.

12.- Eliminar las fuentes de iluminación del área de trabajo al mínimo posibles, durante el resto del procedimiento.

13.- Agregar 60µl de la dilución (1:50) del anticuerpo secundario conjugado con FITC y el Azul de Evans/PBS (5mg/ml) por 30 minutos y mantener en la cámara húmeda.

14.- Lavar con PBS, después secar muy bien y montar utilizando resina sintética.

15.- Secar y guardar, manteniéndolas en la oscuridad en todo momento incluso al momento de su uso.

A-3 IHC de esporas en tejido

Pasos previos:

1.- Obtener las secciones fijadas en laminillas recubiertas con poli-L-lisina y secadas por no menos de 4 horas.

2.- Comenzar a calentar el Buffer de Citratos (pH 6, Ac. cítrico 10Mm) hasta que alcance los 80°C.

3.- Preparar una cámara húmeda a 35-40°C.

4.- En caso necesario, colocar las laminillas en una rejilla de metal para realizar los pasos iniciales (pasos 1,2 y 3 del procedimiento).

Procedimiento:

1.- Desparafinar en Xilol por 5 minutos.

- 2.- Rehidratar mediante alcoholes graduales (etanol) del 100%, 100%, 70% y 30%, 5 minutos c/u.
- 3.- Sumergir en agua destilada, 5 minutos.
- 4.- Realizar el desenmascaramiento de antígeno, utilizando Buffer de Citratos a 80°C por 80 min.
- 5.- Sacar (con mucho cuidado) y dejar enfriar a temperatura ambiente por 10 minutos sin que la muestra se seque (se le puede agregar un poco del mismo buffer de citratos).
- 6.- Realizar el bloqueo de peroxidasa endógena con la solución de peróxido de hidrógeno, colocándola sobre el tejido (100µl aproximadamente) y ubicar las laminillas dentro de la cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Lavar con PBS.
- 8.- Bloquear sitios de unión inespecíficos; utilizando el suero de bloqueo sobre el tejido, guardar las laminillas en la cámara húmeda y mantener ahí por 20 minutos.
- 9.- Escurrir el exceso y secar los bordes del tejido sin tocarlo y con ayuda de una gasa.
- 10.- Colocar anticuerpo primario (100µl aproximadamente) (listo para usarse), e incubar dentro de la cámara húmeda por una noche a 4°C.
- 11.- Lavar gentilmente con PBS.

12.- Agregar Anticuerpo secundario, cubrir la muestra con el anticuerpo secundario conjugado a biotina (1:50) (2 gotas o 100µl) e incubar dentro de la cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.

13.- Lavar con PBS.

14.- Agregar el reactivo que contiene el complejo enzima- biotina avidina e incubar dentro de la cámara húmeda por 30 minutos.

15.- Lavar con PBS y agregar el sustrato de peroxidasa por 3-7 minutos (cuando se genere la reacción deseada. ¡Carcinogénico! Utilizar guantes y protección necesarios). Contrateñir.

16.- Lavar con agua de la llave.

17.- Deshidratar con alcoholes graduales (70%, 96%, 100% y 100%) y aclarar con xilol. 5 minutos c/u.

18.- Montar con resina sintética.

A-4 Tinción de Tricromo modificada o técnica de Weber (heces y orina)

Pasos previos:

1.- Recordar que *E. cuniculi* es zoonótico, utilizar guantes y cubreboca.

Proceso:

1.- Colocar los frotis sobre las laminillas (ver texto de apartado 3.4.2)

2.- Sumergir en metanol por 5 minutos.

- 3.- Secar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
- 4.- Sumergir en Azul de Tricromo por 90 minutos.
- 5.- Escurrir el exceso (no demorar).
- 6.- Sumergir dentro de alcohol acido por 10 segundos. Después, dejar escurrir.
- 7.- Pasar la canastilla por dos recipientes con alcohol al 95%, cinco minutos cada uno.
- 8.- Dejar escurrir.
- 9.- Introducir en alcohol al 100% por 10 minutos, después de esto escurrir.
- 10.- Aclarar con xilol por otros 10 minutos.
- 11.- Escurrir la canastilla y dejar secar sobre una toalla de papel en un área ventilada.
- 12.- Montar con resina sintética.
- 13.- Etiquetar y dejar reposar una noche.

A-5 Tinción con calcoflúor White (heces y orina)

Pasos previos

- 1.- *E. cuniculi* es zoonótico; utilizar guantes y cubreboca en todo momento.

Procedimiento:

- 1.- Colocar el frotis sobre la laminilla (apartado 3.3.4.1)

- 2.- Fijar en metanol por 5 minutos.
- 3.- Dejar secando mientras se realiza el siguiente paso.
- 4.- Colocar una charola cubierta con aluminio y dentro de ella algún soporte para las laminillas, a modo de que estas no entren en contacto con el aluminio y se mantengan en posición horizontal con el tejido hacia arriba (Figura 4).
- 5.- Acomodar las laminillas en los soportes del paso anterior, de la forma más equilibrada y horizontal posible.
- 6.- Apagar y cubrir cualquier fuente de luz, aunque permitiendo continuar así por todo procedimiento.
- 7.- Colocar con ayuda de una pipeta, el fluorocromo sobre el tejido por 5 minutos a TA.
- 8.- Retirar la tintura con agua destilada, utilizando una piseta o una pipeta Pasteur sin rociarla directamente sobre el área de la muestra.
- 9.- Secar al aire libre y mantenidas con cierta oscuridad.
- 10.- Una vez completamente secas; montar con resina sintética volver a dejar secando y guardar en recipiente cerrado y fuera de la luz.
- 11.- Se utiliza un microscopio de epifluorescencia para identificar las esporas teñidas con esta técnica.
- 12.- Nunca exponer estas laminillas a la luz.

A-6 Tinción de hematoxilina y eosina

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 minutos.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 2 minutos.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y alcohol etílico al 96% por 2 minutos cada uno.
- 4.- Enjuagar en agua destilada por 2 min.
- 5.- Sumergir en hematoxilina de Harris, 2 min.
- 6.- Colocar en agua de la llave, 1 min.
- 7.- Sumergir en alcohol acido, rápidamente y solo una vez.
- 8.- Sumergir en agua destilada 2 min.
- 9.- Realizar una inmersión rápida en agua amoniacal.
- 10.- Introducir en agua destilada 2 minutos.
- 11.- Sumergir en Eosina, 30 segundos.
- 12.- Deshidratar con alcohol etílico 96% 2 cambios, 2 inmersiones c/u.
- 13.- Deshidratar en etanol absoluto, 2 inmersiones.
- 14.- Sumergir en etanol-xilol 2 minutos.
- 15.- Aclarar en xilol, 2 cambios, 2 minutos c/u.
- 16.- Montar con resina sintética.

A-7 Azul de Tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido

- 1.- Se utilizan laminillas con secciones del tejido a estudiar y se colocan en una canastilla, orientadas e identificadas.
- 2.- Se sumergen las laminillas en metanol por 5 minutos, después se retiran de este y se dejan secar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
- 3.- Se depositan en Azul de tricromo por 90 minutos
- 4.- Sacar y escurrir el exceso (no tardar mucho en este paso).
- 5.- Inmediatamente se pasa a sumergir dentro de alcohol ácido por 10 segundos. Se retira de este rápidamente y se deja escurrir.
- 6.- Se pasa por dos recipientes con alcohol al 95% por cinco minutos cada uno y se vuelven a dejar escurrir.
- 7.- Alcohol al 100% por 10 minutos, escurrir.
- 8.- Xileno (Xilol) por 10 minutos.
- 9.- La canastilla se retira de esta última solución para dejarla escurrir y secar sobre una hoja de papel, ubicada en un área ventilada.
- 10.- Montar con resina sintética.
- 11.- Se etiquetan las laminillas (etiqueta adhesiva) y se dejan reposar una noche.

A-8 IHC de marcadores de superficie

Pasos previos:

- 1.- Obtener las secciones (4 μ m) fijadas en laminillas con poli-L-lisina
- 2.- Colocar las jarras coplin con TRS dentro de la vaporera y el agua destilada en el recipiente de esta para precalentar (100°C) por 20 minutos, a modo de que coincida el término de este tiempo con el punto 4 del procedimiento.
- 3.- Preparar y calentar una cámara húmeda (30-40°C)

Procedimiento:

- 1.- Desparafinar con dos pasos en xilol, 5 min c/u.
- 2.- Hidratar en etanol al 100, 95 y 70% 3min c/u.
- 3.- Hidratar con agua destilada y solución Tris-Buffer salino (TBS) 3 min c/u, escurrir y retirar el exceso sin dejar secar.
- 4.- Recuperar los antígenos con TRS, 20 min a 100°C y dejar reposar dentro del mismo TRS otros 20 min.
- 5.- Bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 3%, 10 min dentro de la cámara húmeda.
- 6.- Lavar con solución buffer TBS, 3-5 min.
- 7.- Bloquear sitios de unión inespecíficos, 30-45 min en cámara húmeda después y escurrir (no lavar).

- 8.- Añadir anticuerpo Primario (1:100 en diluyente [EnVision FLEX Antibody Diluent, DAKO, EUA]), en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C, por una noche.
- 9.- Lavar con solución buffer TBS 3-5 min y volver a calentar la cámara húmeda.
- 10.- Añadir Ac secundario –Polímero, 45 min en cámara húmeda.
- 11.- Lavar con solución buffer TBS, 3-5 min.
- 12.- Revelar con solución sustrato-cromógeno, estandarizar tiempos (3-10 min).
- 13.- Lavar con agua destilada, 2 min dos veces.
- 14.- Contrateñir con HE, 30 segundos.
- 15.- Lavar con agua corriente y con un flujo constante.
- 16.- Enjuagar en agua destilada.
- 17.- Deshidratar gradualmente con etanol 70% (dos cambios), 90% (dos cambios), 100% (dos cambios) y xilol (dos cambios).
- 18.- Escurrir exceso de xilol, montar con resina sintética y almacenar.

B. Preparación de soluciones y reactivos

B.1 Azul de Tricromo modificada (Técnica de Weber) en tejido, heces y orina

B.1.1 Alcohol ácido

*Para preparar 100 ml

99.5 ml de alcohol al 90% (con agua destilada).

0.5 ml de Ac. Acético.

B.2 IHC e IFA

B-2.1 Buffer de Citratos

*Para preparar 1 litro se utilizó.

10mM Ácido cítrico (1.92g de Citric acid ACS reagent, ≥99.5% (Sigma-Aldrich, EUA))

998.5ml de Fosfato bufferado salino (5 tabletas de PBS Tablet (Sigma-Aldrich, EUA) en 1 litro de agua destilada)

0.05% de Polietilenglicol sorbitan monolaurato [1.5ml de Tween 20 (Sigma-Aldrich, EUA)].

Ajustar pH a 6.0

Se esteriliza dentro de un contenedor apropiado que permita ser esterilizado con calor (Botellas PYREX^{MR} o con tapa y empaque de polipropileno, Corning, EUA) y se refrigera hasta su uso.

B.2.2 Solución de peróxido de hidrógeno para Bloqueo

*Para preparar 100ml

10% de peróxido de hidrogeno al 3% (10ml de H₂O₂, Uso doméstico)

50% PBS (50ml)

40% de metanol (40ml)

B-2.3 Fosfato bufferado salino (PBS)

Para 200ml se utilizó

1 tableta de PBS Tablet (Sigma-Aldrich, EUA) en 200ml de agua destilada, mezclar por 10-15 min.

B.2.4 Solución TRIS-buffer salino con Tween 20 (TBS)

Para 200ml

10ml Envision^{MR} Flex Wash Buffer 20x

190ml Agua tridestilada

B.2.5 Solución recuperadora de antígeno (TRS)

Para 100ml

10 ml Dako^{MR} Target Retrieval Solution High pH 10x concentrate

90ml Agua tridestilada

B.2.6 Solución de sustrato-cromógeno

Para 1ml

EnVision™ Flex Substrate Buffer 1ml

EnVision™ Flex DAB+Chromogen, una gota (50-60µl).