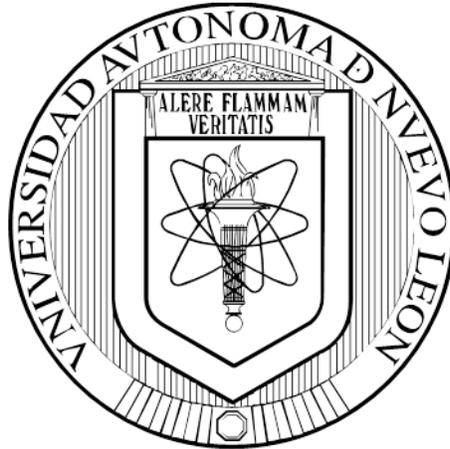


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



TESIS

EXPRESIÓN CUANTITATIVA DE CITOCINAS PRO Y ANTI INFLAMATORIAS
EN GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS CON *Encephalitozoon cuniculi*
MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

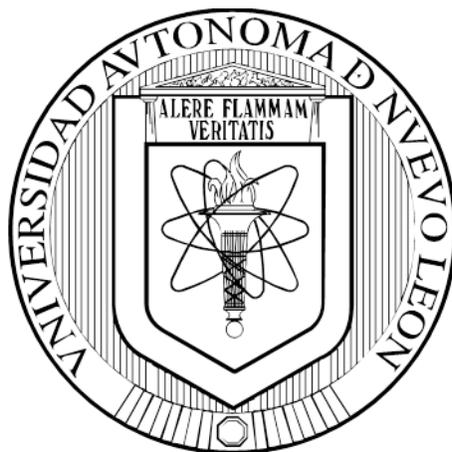
PRESENTA

MSc. ALICIA MAGDALENA NEVÁREZ GARZA

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

MAYO, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**EXPRESIÓN CUANTITATIVA DE CITOCINAS PRO Y ANTI INFLAMATORIAS
EN GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS CON *Encephalitozoon cuniculi*
MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

PRESENTA

MSc. ALICIA MAGDALENA NEVÁREZ GARZA

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

MAYO, 2017



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



TESIS

**EXPRESIÓN CUANTITATIVA DE CITOCINAS PRO Y ANTI INFLAMATORIAS
EN GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS CON
Encephalitozoon cuniculi MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL**

PRESENTA

MSc. ALICIA MAGDALENA NEVÁREZ GARZA

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

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

MAYO 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA

EXPRESIÓN CUANTITATIVA DE CITOCINAS PRO Y ANTI INFLAMATORIAS
EN GRANULOMAS DE CONEJOS INFECTADOS CON *Encephalitozoon*
cuniculi MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL

Aprobación de tesis por el comité particular de
MSc. Alicia Magdalena Nevárez Garza



Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Director



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez
Co – Director Externo



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Co-Director



Dr. Juan José Zárate Ramos
Co-Director



Dr. Gustavo Hernández Vidal
Co-Director

DEDICATORIA

A Dios, por su infinito amor y bondad.

Con mucho amor a **mi familia**, a mi esposo **Luis Edgar Rodríguez Tovar** por todo su apoyo incondicional y brindarme el tiempo necesario para realizarme profesionalmente; a mis hijos **Luis Roberto, Edgar Mauricio y Cristina Magdalena Rodríguez Nevárez** por siempre motivarme y por ser el estímulo que me impulsa salir adelante. Les ofrezco una sincera disculpa por todo el tiempo que los privé de mi atención.

Con profundo cariño a **mis padres, Roberto Nevárez Acevedo e Irma Alicia Garza de Nevárez (+)** por siempre estar a mi lado y por la herencia tan preciada que me dieron del sentido de la responsabilidad, **a mis hermanos Roberto (+), Irma Celina y Juan Javier y sus familias** por estar conmigo en los momentos más significativos de mi vida.

A mi familia política, por su gran apoyo y sus palabras de aliento en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Con profunda admiración a mi asesor principal el **Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar**, por contagiarme su pasión en este tema de tesis, por todas sus enseñanzas y por su paciencia al explicarme y fortalecerme en mis debilidades académicas y por apoyarme hasta el final con la publicación de este trabajo.

Por su disposición, al **Dr. Uziel Velázquez Castillo**, le agradezco su gran ayuda y admiro con mucho respeto su habilidad para manejar los protocolos de todos los experimentos realizados.

Por su dedicación, al **Dr. Adolfo Soto Domínguez**, al transmitir sus conocimientos y experiencia personal y así facilitar los procedimientos de las técnicas empleadas.

Con mucha admiración, a la **Dra. Diana Elisa Zamora Ávila**, por llevar el Posgrado tan acertadamente siempre actuando a favor de que los procesos se lleven a término, sin dejar de imprimir su calidad en todo momento.

Con eterna gratitud, al **Dr. Juan José Zarate Ramos**, porque en su Administración de Director me dio el apoyo y las condiciones necesarias para cumplir con mis obligaciones como Docente, Coordinadora y Estudiante, exhortándome a seguirme preparando.

Por su confianza, al **Dr. Gustavo Hernández Vidal**, por la orientación en todas las etapas del Programa de Posgrado y por siempre darme palabras de ánimo.

A todos los integrantes del **Cuerpo Académico de Zoonosis y Enfermedades Emergentes** por su apoyo y sus valiosos comentarios vertidos en este trabajo.

Al Biol. Luis Gerardo Mendoza Dávila por su ayuda desinteresada, por todo su tiempo, disposición en toda consulta y conocimientos que nos otorgó para el uso del Termociclador de PCR en tiempo real.

Al Dr. Héctor Fimbres Durazo, por apoyarnos en el transporte de los conejos.

A Cynthia Padrón Carrillo del Laboratorio de Genética por todo el apoyo.

A la Dra. Virginia Garza Zermeño del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies por el préstamo de las jaulas para transportar a los conejos. A la Q. C. B. Lourdes Silva Páez por realizar las Biometrías Hemáticas de los grupos experimentales en el Laboratorio de Análisis Clínicos.

A todo el personal del Laboratorio de Inmunología en donde realice la mayoría del trabajo, principalmente a MC César Martínez Dávila y MC Ivone Salinas Navarro, por su gran ayuda, ya que compartimos el cuidado de los conejos, el desarrollo del diseño experimental y las tinciones de diagnóstico de *Encephalitozoon cuniculi*. A la Dra. Heidi Giselle Rodríguez Ramírez, por sus acertados comentarios.

Al Dr. Marco Antonio Cantú Martínez por permitir almacenar las muestras en el repco de - 80°C.

Al M. V. Z. Mauricio Benavides Salgado y Sandra Álvarez Arroyo del Laboratorio de Microbiología, por esterilizar todo el material utilizado.

A la M. V. Z. Erika Porras Méndez y el MC. Eliud Obregón Chagoya por facilitarnos el contador y los morteros del Laboratorio de Parasitología.

A Paola Garza Alemán por realizar los cortes histológicos de todas las muestras en el Laboratorio de Patología.

Al Dr. Rogelio Alejandro Ledezma Torres por la autorización del uso del equipo de ELISA del Laboratorio de Reproducción.

A Leslee de la Rosa Contreras por toda su disposición al usar su campana en el Laboratorio de Virología.

A mis compañeros de camino por el Programa de Posgrado a la MC. Aimé Jazmín Garza Arredondo y M. V. Z. Rubín González Machorro, por su ayuda y por compartir satisfacciones y frustraciones cuando salían o no los experimentos.

Proyecto financiado por el **Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, (PAYCIT), 2015**, “Expresión cuantitativa de citocinas anti - y pro - inflamatorias en granulomas de conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi* mediante PCR en tiempo real”. **Clave:** CT237-15.

ABREVIATURAS

AA	Azul Alciano
Ac(s)	Anticuerpo(s)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico cíclico
Ag	Antígeno
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
AT	Azul de tricromo
C	Centígrado
CEM	Centro de Especies Menores
CIA	Prueba de inmunoensayo con carbón
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
cm	Centímetro
CPAs	Células Presentadoras de Antígeno
CSF	Factor Estimulante de Colonias
C _T	Threshold cycle o ciclo umbral
CW	Calcoflúor White
DAB	Diaminobencidina
DAMP	Patrón Molecular Asociado a Daño Tisular
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
eNOS	Óxido Nítrico endotelial
g	Gramo
Gi	Giemsa
Go	Grocott
Gr	Gram
HE	Hematoxilina y eosina
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida
h	Hora
IC	Intracardiaca
IFA	Inmunofluorescencia

IFAT	Ensayo de inmunofluorescencia
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina - 12
IL-4	Interleucina - 4
INF γ	Interferón gamma
iNOS	Óxido Nítrico Sintasa
kg	Kilogramo
MET	Microscopía Electrónica de Barrido
mg	Miligramo
MHC clase II	Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida
NaNO ₂	Nitrato de Sodio
NED	Naphylethylenediamine thidrochoride
NK	Células Asesinas Naturales
NKT	Células T Asesinas Naturales
nm	Nanómetro
nNOS	Óxido Nítrico neurona
NO ₂	Óxido de Nitrógeno
NO ₃	Ácido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
ON	Óxido Nítrico
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PAS	Reacción de Ácido Peryódico de Schiff
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PRRs	Receptores de Reconocimiento de Patrones celulares
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
SNC	Sistema Nervioso Central

TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
TUNEL	Terminal deoxinucleotidil transferasa
URE	Unidad Relativa de Expresión
WB	Western Blot
°	Grado
μ l	Microlitro
μ m	Micras
2 $\Delta\Delta$	Doble delta

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1. 1. JUSTIFICACIÓN	5
1. 2. Hipótesis.....	6
1. 3. Objetivo general.....	7
1. 4. Objetivos específicos	8
2. LITERATURA REVISADA	9
2. 1. HISTORIA DE <i>ENCEPHALITOOZON CUNICULI</i>	9
2. 2. Características morfológicas del <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	11
2. 3. Ciclo de vida y desarrollo del <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en leporidos	14
2. 4. Signología y lesiones causadas por <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	19
2. 4. 1. Lesiones en el Sistema Nervioso Central.....	20
2. 4. 2. Lesiones en Riñón.....	20
2. 5. Granuloma	21
2. 5. 1. Tipos de granuloma	25
2. 5. 1. 1. Granuloma Nodular o tuberculoide (Granuloma tipo Th1).....	25
2. 5. 1. 2. Granuloma difuso o lepromatoide (Granuloma tipo Th2)	26
2. 5. 1. 3. Granuloma Microsporidiano	27
2. 6. Diagnóstico de Laboratorio de Microsporidiosis	28
2. 6. 1. Técnicas de Tinción.....	29
2. 6. 1. 1. Cromotrópo-tinción. Azul de Tricromo Modificado	29
2. 6. 1. 2. Histoquímica. Tinción de Giemsa	29
2. 6. 1. 3. Agentes quimiofluorescentes. Calcoflúor white	30
2. 6. 2. Inmunofluorescencia (IFAT)	31
2. 6. 3. Microscopía	32
2. 6. 3. 1. Histología de rutina.....	32
2. 6. 3. 2. Secciones embebidas en resina	32

2. 6. 3. 3. Microscopia Electrónica de Transmisión	33
2. 6. 4. Métodos moleculares	34
2. 6. 5. Pruebas serológicas	35
2. 6. 5. 1. Métodos basados en la detección de Ac	35
2. 6. 5. 2. Métodos basados en la detección de Ag	36
2. 7. Apoptosis y Microsporidiosis	36
2. 8. Óxido Nítrico y Microsporidiosis	38
2. 9. Citocinas y Microsporidiosis	40
3. Materiales y Métodos.....	42
3. 1. Animales para el experimento	42
3. 2. Mantenimiento y alojamiento	42
3. 3. Modelo experimental.....	42
3. 4. Tranquilización, anestesia y sacrificio	45
3. 5. Extracción de sangre y obtención de suero	45
3. 6. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón (CIA)	48
3. 7. Examen coproparasitoscópico y examen de orina.....	49
3. 8. Examen histopatológico e histoquímica	50
3. 9. Extracción de ARN	51
3.10. Síntesis de ADN complementario	52
3.11. Cuantificación de ARNm de citocinas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	53
3.12. Inmunohistoquímica para la detección de células apoptóticas con la técnica de TUNEL	56
3.13. Determinación de Óxido Nítrico (NO) con la técnica de Griess	57
4. Resultados	59
4. 1. Extracción de sangre	59
4. 1. 1. Comparación del hematocrito	59
4. 1. 2. Comparación de linfocitos y monocitos	61
4. 1. 3. Comparación de granulocitos.....	63
4. 2. Obtención de suero.....	65
4. 2.1. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón (CIA)	65
4. 3 Examen coproparasitoscópico y examen de orina	68
4. 3. 1. Técnica de Calcoflúor White en heces y en orina.....	68

4. 3. 2 Tinción de tricromo modificada o técnica de Weber para heces y orina	69
4. 4 Histoquímica	75
4. 4. 1 Tinción Hematoxilina y Eosina (HE)	75
4. 4. 2 Tinción de Azul de Tricromo.....	77
4. 4. 3 Tinción de Reacción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS)	79
4. 5 Cuantificación de ARN mensajero	81
4. 5. 1 Expresión diferencial de las interleucinas pro-inflamatorias en riñón y en cerebro.....	81
4. 5. 1. 1 Tumor de Necrosis Tumoral - α	81
4. 5. 2 Expresión diferencial de las interleucinas anti-inflamatorias en riñón y en cerebro.....	83
4. 5. 2. 1 Interleucina - 4	83
4. 5. 2. 2 Interleucina - 10	85
4. 6 Inmunohistoquímica para el análisis del conteo de células apoptóticas con la técnica de TUNEL.....	87
4. 7 Producción de Óxido Nítrico (ON).....	94
5. Discusión	96
6. Conclusiones	107
Referencias Bibliográficas.....	109
APÉNDICES.....	119

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Esquema de la espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	13
2. Ciclo de vida de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	16
3. Diseño de los tratamientos. Días de aplicación a los tratamientos de los animales de los diferentes grupos A, B, C y D.....	47
4. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón positiva. La presencia de esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> aglutinadas (flecha) y rodeadas de partículas de carbón del suero de los animales de los grupos A y B. Barra = 10µm.....	66
5. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón negativa. Se aprecia que la muestra de suero es negativa a las esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en los grupos C y D. Barra = 10µm.....	67
6. Espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (flecha) en muestra de heces teñida con la técnica calcoflúor white en los animales del grupo A. 100X. Barra = 5µm.....	71
7. Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (flecha) en la muestra de orina teñida con calcoflúor white del grupo A. 100X. Barra = 5µm.....	72
8. Espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (flechas) en muestra de heces teñidas con la técnica de azul de tricromo modificada en conejos del grupo A. 100X. Barra = 10µm.....	73
9. Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (flecha) en la muestra de orina teñida con azul de tricromo en conejos del grupo A. 100X. Barra = 5µm.....	74
10. Riñón. Grupo A. Las esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> se observaron ligeramente basófilos, transparentes y con mala definición (flechas). HE. 40X. Barra = 20 µm.....	76
11. Riñón. Grupo A. Las esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> se aprecian como estructuras ovoides eosinofílicas y el típico cinturón en el plano ecuatorial de la espora (flecha). Azul de tricromo. 100X. Barra = 10 µm.....	78
12. Riñón. Grupo A. Las esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> se observan como estructuras redondas, basófilos, con mala definición y transparentes (flecha). La lámina basal de los túbulos renales se aprecian claramente. PAS. 40X. Barra = 10 µm.....	80

13. La expresión del TNF- α en los grupos experimentales. En el riñón se observa una diferencia significativa $p \leq 0.001$ del grupo B en comparación con el resto de los grupos (A, C y D). En el cerebro no existe diferencias $p \geq 0.05$ entre los grupos.....	82
14. Expresión de IL-4. No existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en la expresión en riñón y cerebro de los grupos experimentales.....	84
15. Expresión de IL - 10. No existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) de la expresión en el riñón entre los grupos experimentales. En el cerebro, el grupo B presenta una diferencia significativa de $p \leq 0.01$ en comparación con los otros grupos experimentales (A, C y D).....	86
16. Controles de la Técnica. A. Intestino. Control negativo. B. Timo. Control positivo. Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μm	88
17. Grupo A. A. Riñón. Se aprecian células positivas a la fragmentación de la cromatina (flecha). B. Cerebro. Se reconocen células TUNEL positivas (flecha). Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μm	89
18. Grupo B. A. Riñón. Presencia de células positivas a la fragmentación de la cromatina (flecha). B. Cerebro. Células TUNEL positivas (flecha). Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μm	90
19. Grupo C. A. Riñón y B. Cerebro. Se observan células TUNEL negativas. Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μm	91
20. Grupo D. A. Riñón y B. Cerebro. Se aprecian células TUNEL negativas. Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μm	92
21. Células apoptóticas en los grupos experimentales. En el riñón no presentó diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los grupos. En el cerebro, el grupo B presentó diferencia significativa ($p \leq 0.01$) en comparación con el resto de los grupos	93
22. Producción de óxido nítrico en riñón y cerebro de los grupos experimentales. Los datos representan la media \pm SD de las determinaciones por triplicado. El grupo A en cerebro muestra una diferencia estadística de $p \leq 0.05$; y el grupo B, en riñón se observa una diferencia estadística de $p \leq 0.01$ en comparación con el resto de los grupos.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
1. Diseño Experimental. Distribución de los grupos y las dosis utilizadas.....	46
2. Secuencia y sonda de iniciadores de citocinas pro – inflamatorias, anti inflamatorias y genes constitutivos. Pro - inflamatorias TNF - α y anti inflamatorias IL - 4 e IL - 10 y los genes constitutivos G3PDH y β - actina...	55
3. Resultados del porcentaje del hematocrito en los grupos experimentales. En donde los grupos representados con la ^a (grupos A y D) presentan una probabilidad entre estos grupos de $p \leq 0.005$ y en ^b la probabilidad de estos grupos (C y D) presentan una probabilidad de $p \leq 0.075$ y la ^c representa los grupos no inmunosuprimidos (A y D) y la letra ^d representa los grupos inmunosuprimidos (C y D) presentaron una probabilidad de $p \leq 0.587$	60
4. Resultados del porcentaje de linfocitos y monocitos de los grupos experimentales. La diferencia entre grupos A y D representados con la ^a tienen una probabilidad de $p \leq 0.033$, y los grupos B y C con la ^b , la diferencia es de $p \leq 0.068$. La ^c indica los grupos no inmunosuprimidos (A y D) y la ^d los grupos inmunosuprimidos (B y C) con $p \leq 0.019$	62
5. Resultados del porcentaje de granulocitos entre los grupos experimentales. Diferencias ente los grupos no inmunosuprimidos (grupo A y D) representados con la ^a con $p \leq 0.005$, y la diferencia de los grupos inmunosuprimidos (B y C) indicados con ^b con $p \leq 0.404$. La diferencia entre los grupos no inmunosuprimidos e inmundsuprimidos indicados con ^c y ^d con una $p \leq 0.402$	64
6. Resultados de las técnicas diagnósticas de calcoflúor white y azul de tricromo modificada en heces y orina.....	70

RESUMEN

Encephalitozoon cuniculi es un importante patógeno microsporidiano, zoonótico y emergente que puede infectar a individuos clínicamente sanos e inmunocomprometidos. El propósito de este estudio fue evaluar la expresión de ARNm local de TNF- α , IL-4 e IL-10, así como las respuestas de apoptosis y óxido nítrico en cerebro y riñones de conejos inmunocompetentes e inmunosuprimidos infectados naturalmente con *Encephalitozoon cuniculi*. La infección promueve la expresión de TNF- α en los riñones de conejos infectados, principalmente en el grupo que recibió tratamiento con corticosteroides, (Grupo B), mostrando una diferencia significativa ($p \leq 0.001$). Esto es paralelo a la respuesta del óxido nítrico en los mismos grupos de animales, lo que sugiere que la eliminación de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* es inducida por TNF- α . La interleucina-4 se expresa de forma similar tanto en el cerebro como en los riñones, independientemente del estado inmunológico del conejo, no muestra diferencia significativa ($p \geq 0.05$). La mayor expresión de ARNm de IL-10 en el cerebro de conejos infectados presenta una diferencia significativa ($p \leq 0.01$) entre el grupo A y los conejos inmunocompetentes del grupo C y D, esto sugiere un control equilibrado de TNF- α por la respuesta inmune del huésped o por *Encephalitozoon cuniculi*. Por el contrario, la expresión de TNF- α regula la expresión de IL-10 en los riñones ya que no existe diferencia significativa entre los grupos ($p \geq 0.05$). La infección indujo células positivas a apoptosis en conejos infectados (Grupo A), pero mayor en los animales infectados-inmunosuprimidos (Grupo B). Bajo un efecto inmunosupresor, la infección por *Encephalitozoon cuniculi* induce la apoptosis de células de tipo mononuclear en granulomas. Así mismo, los niveles de ON se incrementaron en

animales infectados con *Encephalitozoon cuniculi*, presentándose mayor concentración en cerebro. Es posible proponer que el aumento de la modulación de la respuesta de ON por *Encephalitozoon cuniculi* contribuye a la supervivencia del parásito dentro de las células fagocíticas en granulomas por un mecanismo aún desconocido.

1. INTRODUCCIÓN

Los microsporidios son microorganismos intercelulares obligados que pertenecen al filum Microsporidia y parasita una amplia variedad de especies como mamíferos, insectos, peces y aves (Wasson, 2009). Los microsporidios han causado significativas pérdidas en la agricultura e investigación biomédica. El estado maduro de la microsporidia se caracteriza por producir esporas, las cuales son de forma oval o alargadas. Las esporas de las especies que afectan a los mamíferos son muy pequeñas y presentan una gruesa pared celular, un aparato de extrusión y material genético. La pared celular presenta dos estructuras: 1. La endospora (capa interna) compuesta de quitina, considerada un potente inmunoestimulante y, 2. La exoespora (capa externa proteica), la cual le proporciona resistencia a las condiciones del medio ambiente (Didier *et al*, 2000). *Encephalitozoon cuniculi* es la especie de microsporidia más extensamente estudiada en mamíferos en infecciones espontáneas (Wasson, 2009). Los microsporidios son agentes patógenos que causan controversia en cuanto a si son hongos o parásitos, ya que aunque son considerados como células eucarióticas, no poseen mitocondrias ni aparato de Golgi. Durante su evolución se adaptaron totalmente a la vida intracelular y, por lo tanto, han dependido casi exclusivamente del metabolismo energético de la célula huésped (Ghosh *et al*, 2011). Basado en las características bioquímicas y en el análisis molecular, a los microsporidios se les considera ahora más relacionados con los hongos que con los protozoarios (Valencakova *et al*, 2011). Estos microorganismos forman esporas infectantes cuando se encuentran en etapa ambiental.

Las esporas miden aproximadamente 2-4 μm de largo y además de la cubierta interna y externa, poseen un aparato de extrusión el cual está formado por el tubo polar, la vacuola posterior y el esporoplasma o agente infeccioso, el cual es considerado el núcleo verdadero del parásito. La presencia o ausencia de una vacuola parasitófora y el número de vueltas del tubo polar dentro de la espora ayuda a diferenciar las especies dentro del género *Encephalitozoon* (Ghosh y Valencakova *et al*, 2011). Todo este proceso se lleva a cabo en una vacuola intracitoplásmica llamada vacuola parasitófora, separa al parásito del resto de los componentes de la célula huésped y consiste principalmente de lípidos derivados de la célula.

Los estudios sobre el papel de la citocinas sobre *Encephalitozoon cuniculi* es controversial. Por ejemplo, se tiene referencia del estudio de citocinas contra *Encephalitozoon cuniculi* en modelos murinos *in vitro*. Se investigó la actividad de interleucina - 10 (IL-10), interleucina - 12 (IL-12), y factor de necrosis tumoral - alfa (TNF- α) en ratones BALB/c inmunocompetentes e inmunodeficientes infectados intraperitonealmente con esporas viables de *Encephalitozoon cuniculi*, observándose que IL - 10 controla la respuesta inmune celular en ratones inmunocompetentes al inhibir la síntesis de IFN- γ y previniendo la diseminación temprana del microorganismo (Valencakova *et al*, 2003). Al parecer, ni la IL-12 ni el TNF- α participan en el control del microorganismo en ratones (Didier, 2005). No obstante, otros estudios hechos por Khan y Moreto han demostrado que la IL-12 sí participa en el mecanismo de resistencia de este parásito empleando en el modelo murino (Khan, 2004).

1. 1. Justificación

Debido a que la encefalitozoonosis es una enfermedad zoonótica y emergente, el estudio de la expresión de las citocinas, la apoptosis y el estallido respiratorio permitirá dilucidar los mecanismos de la respuesta inmune que participan en la interacción de *Encephalitozoon cuniculi* con el hospedero siendo que el microambiente de citocinas determina el desarrollo.

1. 2. Hipótesis

La expresión diferencial de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, como mecanismo de control antimicrosporidiano, es regulada por la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en los granulomas de animales infectados.

1. 3. Objetivo General:

Cuantificar mediante PCR en tiempo real la expresión de citocina proinflamatoria, TNF- α , y las antiinflamatorias IL - 4 e IL - 10 en granulomas de conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi*.

1. 4. Objetivos Específicos:

1. Medir los parámetros de hematocrito, linfocitos, monocitos y granulocitos en los animales infectados y no infectados con *Encephalitozoon cuniculi*.
2. Detectar conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi* mediante histopatología, serología y examen coproparasitoscópico.
3. Cuantificar mediante PCR cuantitativo la expresión de la citocina proinflamatoria y las antiinflamatorias en los granulomas microsporidianos.
4. Medir la apoptosis mediante la técnica de TUNEL en riñón y cerebro infectados por *Encephalitozoon cuniculi*.
5. Medir la producción de óxido nítrico mediante espectrofotometría en los granulomas microsporidianos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2. 1. Historia de *Encephalitozoon cuniculi*

En 1918, parásitos protozoarios fueron observados por primera vez en secciones de riñones de conejos alojados en bioterios para propósitos experimentales. En 1922, Wright y Craighead refirieron como Encephalitozoonosis a una enfermedad crónica de roedores que esta empezaba a ser común y con condiciones latentes de muchas colonias de conejos con una prevalencia de hasta un 76 % reportado en conejos salvajes (Pakes, 1974). Estos mismos autores aislaron el parásito en conejos con nefritis encontrando la presencia de éste en el Sistema Nervioso Central y los riñones de conejos que sufrían parálisis motora (Flat, R. E., 1970). En 1924, en los animales del laboratorio del Instituto Rockefeller en Princeton, New Jersey, una fuerte infección los afectó y fue entonces cuando a este microorganismo se le reconoció como un verdadero microsporidio, pudiéndose comprobar que el tubo polar fue extruido de las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* al interior de los macrófagos peritoneales de ratones infectados (Csokai *et al.*, 2009).

Tiempo después en 1925, la nefritis en conejos causada por éste agente etiológico fue bien documentada; sin embargo, algunos investigadores no asociaban el organismos causal de las lesiones renales con la encefalitis granulomatosa crónica que ocurría concomitantemente (Testoni, F. J., 1974). En 1964, se pensaba que el *encephalitozoon* pertenecía a la familia *Nosematidae* y éste organismo que dañaba a los mamíferos se denominó *Nosema cuniculi*. Sin embargo tiempo después, Sprague y Vernick; 1971, compararon a la microsporidia

con el género *Nosema* (*Nosema bombycis* que ocasionaba la enfermedad del gusano de seda) observando que se presentan notorias diferencias en el desarrollo del ciclo, decidiendo dejarlo con el nombre original de *Encephalitozoon cuniculi*.

Encephalitozoon cuniculi es el microsporidio considerado como un microorganismo formador de esporas, obligado, intracelular. Que infecta herbívoros, carnívoros, primates incluyendo a los humanos, pájaros y roedores. Sin embargo, los conejos (*Oryctolagus cuniculus*), son los huéspedes definitivos más afectados (Csokai *et al.*, 2009).

El primer caso de microsporidiosis reportado en el ser humano ocurrió en 1959 en un niño asiático de 9 años de edad, el cual presentó convulsiones, espasmos, cefalea y náusea. Como se sospechó de *Encephalitozoon cuniculi*, se le tomó líquido cefalorraquídeo, mismo que se inoculó en los ratones. Éstos desarrollaron encefalitozoonosis sistémica y se logró aislar *Encephalitozoon cuniculi*. (Lobo *et al.*, 2012). En 1973, se diagnosticaron dos casos de microsporidiosis corneal en pacientes que recibieron trasplantes corneales (Ashton and Wirasinha, 1973). Desde ese tiempo a la fecha han sido diagnosticados mundialmente muchos casos de microsporidiosis por *Encephalitozoon cuniculi*, es considerado actualmente un patógeno oportunista presente en animales y personas inmunodeprimidas, en trasplante de órganos infectados, y en quienes reciben tratamiento anticancerígeno e inmunosupresor (Galvan *et al.*, 2011). También se le ha reportado en los que presentan el Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida (VIH) (Boschere, H., 2000).

Es entonces que la microsporidiosis ha despertado un gran interés en la Patología Humana y Veterinaria y enfocado sobre el papel que los animales poseen en la transmisión de este padecimiento. Sin embargo, a pesar de que *Encephalitozoon cuniculi* es el único microsporidio que ha sido considerado como zoonótico, hasta ahora no existe una seguridad científica que lo confirme. Actualmente tres cepas de *Encephalitozoon cuniculi* han sido caracterizadas: Tipo I en perros: en áreas donde la convivencia con perros es diario, los dueños pueden estar infectados; tipo II presente en roedores y el tipo III, en conejos, el cual ocurre en las personas que tiene a los conejos como mascotas (Didier *et al.*, 2000; Snowden *et al.*, 1999; Flynn *et al.*, 2007).

2. 2. Características morfológicas del *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi es un microsporidio que es considerado como eucariote, aunque carece de ciertas estructuras vitales para una célula eucariótica como las mitocondrias, el complejo de Golgi y los peroxisomas (Vávra and Ronny-Larson, 1999). Durante su evolución, estos microorganismos se adaptaron totalmente a la vida parasitaria intracelular y, por lo tanto, han dependido completamente del metabolismo energético de la célula huésped (Ghosh *et al.*, 2011). De acuerdo a sus características bioquímicas y análisis moleculares, taxonómicamente se clasifican más como hongos que como protozoarios de acuerdo a lo que anteriormente se consideraba (Keeling *et al.*, 2005; Valencakova *et al.*, 2011).

Estos microorganismos forman esporas infectantes cuando se encuentran en etapa ambiental. Las medidas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* son aproximadamente de 1.5 μm de ancho y de 2 a 4 μm de largo y las estructuras que la conforman se dividen en dos porciones: La externa que es una cápsula la cual está formada de la exoespora (capa externa proteica electrodensa) y la endoespora (capa interna de quitina). La interna está formada del aparato de extrusión, reproducción o infección compuesto por el tubo polar, la vacuola posterior y el esporoplasma (agente infeccioso), el cual es considerado el núcleo verdadero del parásito (Figura 1).

En el sitio de la infección la presencia o ausencia de una vacuola parasitófora y el número de vueltas del tubo polar dentro de la espora ayuda a diferenciar a las especies del genero *Encephalitozoon*. En el caso de *Encephalitozoon cuniculi*, el tubo polar presenta alrededor de 5 a 7 vueltas. El sitio primario de infección de *Encephalitozoon cuniculi* es típicamente el epitelio digestivo o respiratorio, pero también se ha sugerido que puede infectar células como macrófagos, monocitos, linfocitos y endotelio vascular. Las esporas infectan a las células huésped a través de un mecanismo único de invasión, el cual comprende un tubo polar, que descarga el esporoplasma a través de la membrana celular, directamente en el citoplasma de las células huésped después de la extrusión del tubo polar. La estimulación de la extrusión del tubo polar se debe a la presión interna causada por la vacuola posterior, la cual consiste de una serie de vesículas membranosas,

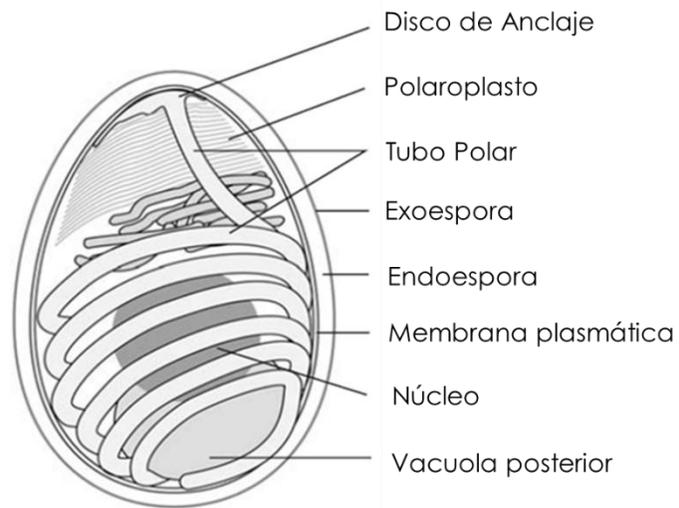


Figura. 1. Esquema de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* (Franzen *et al.*, 2005).

considerados como vestigios del aparato de Golgi (Bigliardi and Sacchi, 2001). Se cree que las esporas responden a uno o más estímulos tales como pH, concentración de iones, osmolaridad, enzimas digestivas, potencial oxido - reducción y productos como los iones de sodio y potasio , dentro de un rango de pH limitado (Franzen, 2005).

El tubo polar es expelido con fuerza desde el interior de la espora a través de la parte más delgada de la porción apical de la misma, siguiendo un movimiento en espiral que da aceleración extra al tubo polar durante la germinación de la espora y le ayuda a expulsar bruscamente al esporoplasma desde el citoplasma del parásito (Chioralia *et al.*, 1998). De esta manera, el esporoplasma no establece contacto con el medio extracelular, siendo no reconocido por la respuesta inmune (Dall, 1983).

El *Encephalitozoon cuniculi* presenta un genoma extremadamente pequeño, el cual abarca hasta 2.9 Mpb. Esta reducción en el tamaño de su genoma se debe al apretado empaquetamiento de la información genética dentro del cromosoma (Weiss, 2000).

2. 3. Ciclo de vida y desarrollo del *Encephalitozoon cuniculi* en lepóridos

Los microsporidias se pueden transmitir por diferentes vías: 1. La horizontal, la cual inicia cuando un huésped susceptible ingiere las esporas infectantes; 2. La vertical, también conocida como intrauterina (Baneux *et al.*, 2003), y 3. A través de

la inhalación de esporas infectantes (Vivarès, 2001; Dunn and Smith, 2001). Una vez que las esporas son ingeridas, se da el mecanismo de extrusión del tubo polar. Una vez dentro de la célula huésped el esporoplasma sufre dos etapas de desarrollo en el citoplasma del huésped: La primera, llamada merogonia, la cual es la etapa inmadura del parásito (meronte), en donde se da la proliferación y el crecimiento. La segunda etapa es la esporogonia, en la cual el parásito (esporonte) sufre la etapa de desarrollo y maduración para infectar al huésped (Bohne *et al.*, 2011) (Figura 2).

Todo este proceso se lleva a cabo en la vacuola intracitoplásmica llamada vacuola parasitófora, la cual separa al parásito del resto de los componentes de la célula huésped. Sin embargo, el mecanismo de germinación no ocurre espontáneamente, sino que sucede una vez que se ha establecido una interacción específica entre un ligando de microsporidia y un receptor de la célula huésped (Foucault and Drancourt, 2000).

Todo este ciclo dura de 24 a 48 horas, pero está relacionado con factores como la temperatura, la cual afecta de manera notable el número de esporas, el tejido infectado del huésped, la respuesta inmune (fagocitosis) y las enzimas digestivas. (Fasshauer *et al.*, 2005). Posteriormente después, la célula comprometida se rompe debido a la excesiva proliferación del parásito en el interior de la misma, liberando las esporas directamente en el huésped, en el sistema

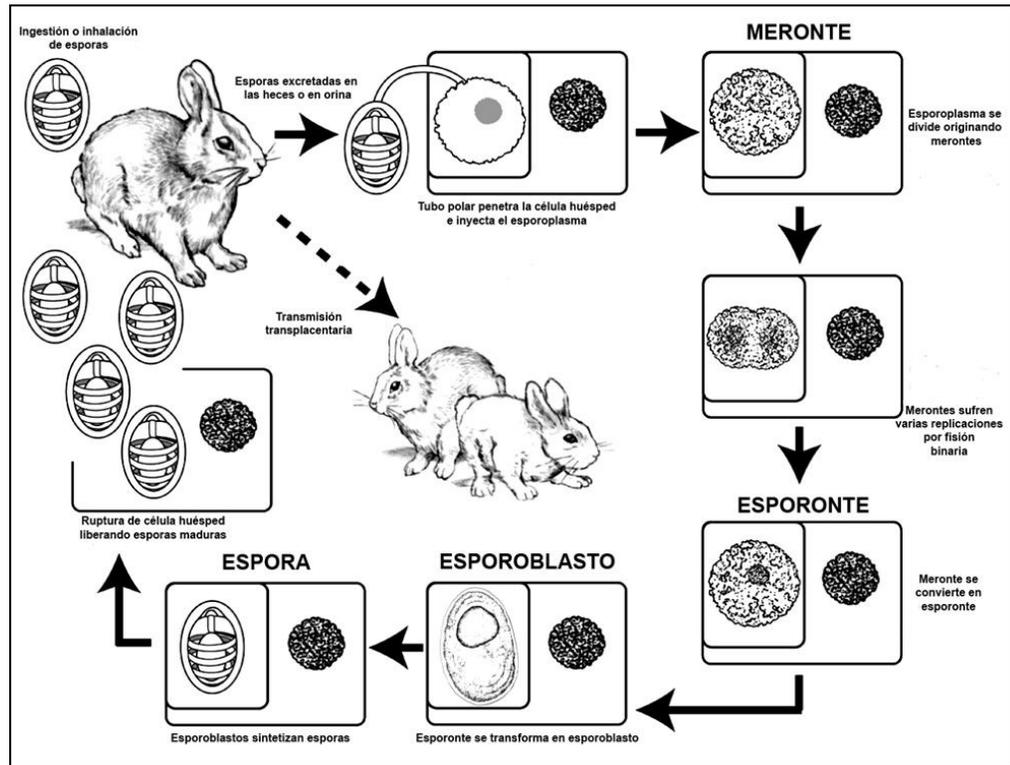


Figura 2 . Ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi*. (Modificado de: Franzen, C. 2005. How do microsporia invade cells?. *Folia Parasitógica*. (52:36-40).

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 pasar por extensión directa de las esporas a las células circundantes (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2003). Experimentalmente se ha observado que cuando conejos inmunocompetentes se infectan por vía oral con *Encephalitozoon cuniculi*, presentan simplemente las etapas tempranas de la infección intestinal, sin propagación a otros órganos, y las esporas pueden encontrarse en las heces a partir de la sexta semana después de la infección. Sin embargo, cuando se infectan animales inmunocomprometidos, el parásito puede propagarse al huésped por vía sanguínea y ocasionar lesiones en encéfalo, pulmón, hígado y riñones aproximadamente tres semanas después de la exposición experimental con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. Las esporas se han observado de manera excepcional 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, pero pueden permanecer viables hasta 2 meses a una temperatura de 22°C (Desportes-Livage, 2000).

La infección por microsporidia en la célula huésped culmina con la degeneración de la misma, así como necrosis del tejido infectado debido a una severa respuesta inflamatoria. Sin embargo, antes de que esto ocurra, es común observar en la mayoría de las microsporidiosis una hipertrofia de la célula huésped, que se convierte en sola una envoltura alrededor del parásito, y la cual finalmente

muere (Franzen, 2004). La gran proliferación de esporas reemplaza paulatinamente el contenido celular, resultando la formación de un quiste o xenoma, el cual podría llegar a ser visible en varias especies de microsporidia. Se ha reportado una reacción celular en el contorno del xenoma, el cual consiste en fibroblastos, células epiteliales e histiocitos (Bigliardi and Sacchi, 2001). El xenoma sería el resultado de la célula huésped y el parásito que se encuentran fisiológica y morfológicamente integrados para formar una entidad con su propio desarrollo en el huésped, creciendo a expensas del mismo, pero beneficiándose mutuamente (Lom and Dykova, 2005).

Las etapas de la respuesta del huésped han sido caracterizadas y agrupadas en dos tipos: 1). Una débil reacción hacia xenomas inmaduros y en desarrollo como los merontes y 2). Una reacción productiva, que ocurre en xenomas completamente maduros como los merontes y las esporas. Finalmente la respuesta inflamatoria proliferativa transforma a los xenomas en granulomas (Lom and Dykova, 2005). Por último, el granuloma involuciona y la masa final de esporas es liberada, muchas de las cuales son fagocitadas por macrófagos residentes y si no son destruidas son transportadas a otros sitios del huésped, donde inician focos secundarios de reacción (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2003).

2. 4. Signología y lesiones causadas por *Encephalitozoon cuniculi* en lepóridos

Las infecciones por *Encephalitozoon cuniculi* frecuentemente se presentan asintomáticas, pero las infecciones en conejos por *Encephalitozoon cuniculi* pueden ser de dos tipos: aguda y crónica. Los signos clínicos característicos son pérdida de peso, diarrea líquida sin presencia de sangre y de moco (Desportes-Livage, 2000).

En los casos agudos, menores o iguales a tres semanas, el microorganismo se puede replicar en los riñones, los pulmones y el hígado (Harcourt-Brown, 2004). Si la propagación del parásito progresa, la infección continúa en el riñón, el sistema nervioso central (SNC), el ojo y el corazón. Los signos que presenta son discretos, tales como diarrea, tortícolis, ataxia, opistótono, nistagmos, convulsiones, paresis posterior que puede ser unilateral o bilateral y rodamiento lateral y en los casos severos muerte súbita (Csokai and Kunzel, 2010).

En los casos crónicos, de cinco semanas en adelante, se presenta una severa carga parasitaria, aunque puede o no puede presentar signos clínicos. Las lesiones que se observan principalmente son en el riñón y en el SNC, mientras que las lesiones menos severas están presentes en los pulmones y en el hígado y en estos casos los parásitos son difíciles de observar (Leipig *et al.*, 2012). Los conejos con daño en riñón sufren de falla renal crónica, letargia, pérdida de peso, anorexia, poliuria, polidipsia y en algunos casos se presenta incontinencia urinaria y

escaldamiento de la piel. En los casos de lesión ocular se pueden observar cataratas y ceguera uni o bilateral (Kunzel *et al.*, 2008).

2. 4. 1. Lesiones en el Sistema Nervioso Central

Las lesiones en SNC por lo general ocurre entre las 3-4 semanas después de la infección. Se observa una infiltración linfocítica perivascular, pudiéndose presentarse como discretos cambios no supurativos hasta una severa meningoencefalitis o meningoencefalomielitis granulomatosa focal o multifocal con astrogliosis (Csokai *et al.*, 2008). Esto ocasiona la presencia de granulomas con centro necrótico, rodeado de macrófagos y/o células gigantes, linfocitos, células plasmáticas y células gliales. El área más afectada es el parénquima del cerebro; pero puede haber también lesión en el tallo cerebral, en el cordón espinal y en el cerebelo en menor grado. Las leptomeninges, cuando resultan afectadas ocasionalmente se puede observar radiculitis espinal focal, pudiendo mostrar signos neurológicos atípicos (Kunzel and Joachim, 2010).

2. 4. 2. Lesiones en Riñones

Se pueden llegar a observar lesiones desde nefritis intersticial no supurativa difusa o focal hasta una severa nefritis granulomatosa focal o multifocal. En algunos

casos de han detallado varios grados de nefritis intersticial crónica con la formación de tejido cicatrizal debido a la fibrosis y la presencia de múltiples granulomas multifocales (Erwingmann, 2012). En los casos agudos es posible observar esporas maduras en el epitelio de los túbulos distales, en focos inflamatorios o libres en el lumen de los túbulos colectores en donde se multiplican y de allí son excretadas en la orina. El epitelio también puede lucir desprendido o descamado y con presencia de infiltración por células mononucleares. Sin embargo, las lesiones pueden estar presentes en todos los niveles del túbulo renal y con una mínima afectación de los glomérulos (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2011). En los casos crónicos se puede observar fibrosis intersticial, colapso del parénquima renal e infiltración por células mononucleares; aunque la detección de las esporas en el epitelio tubular en este proceso inflamatorio se vuelve difícil (Habenbacher *et al.*, 2012).

2. 5 Granuloma

El granuloma es un complejo mecanismo de defensa del huésped constituido por un agregado de células inflamatorias mononucleares que ha evolucionado para limitar el crecimiento de agentes patógenos, así como el de proporcionar un nicho o microambiente donde muchos microorganismos son capaces de sobrevivir y diseminarse (Ehlers *et al.*, 2012). El mantenimiento de este proceso inflamatorio depende de un agente estimulante y de las interacciones dinámicas entre mediadores inflamatorios (citocinas) y anti-inflamatorios, diversas células del sistema inmune y células estructurales del tejido afectado (Ramakrishnan, 2012).

Los procesos inflamatorios mejor estudiados durante el desarrollo del granuloma son las respuestas inmunes innatas y adaptativas, las cuales se caracterizan por incluir poblaciones de células inmunes específicas que expresan cada una un fenotipo definido (Carson *et al.*, 2011). La respuesta del huésped a la infección involucra directamente a la respuesta inmune innata, la cual desencadena una rápida respuesta contra el patógeno e implica la liberación de citocinas pro-inflamatorias y eventualmente conduce a la activación de una respuesta inmune adaptativa (Kumar *et al.*, 2009). El desarrollo y regulación de una reacción granulomatosa requiere de varios factores: 1. Un agente estimulador, indigerible, pobremente degradable y persistente, 2. La respuesta inmune del huésped involucrando células Th (CD4⁺) y macrófagos, 3. Interacción entre varias citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios producidos dentro del granuloma (Ackermann, 2017). La primera línea de defensa inicia cuando los receptores de reconocimiento de patrones celulares (PRRs) localizados en las células presentadoras de antígeno (CPAs) reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Guillermo *et al.*, 2005). El reconocimiento de los PAMPs por PRRs desencadena rápidamente la respuesta inmune innata caracterizada por la producción de diversas citocinas inflamatorias y quimiocinas (Ito *et al.*, 2013). Varios miembros de la familia de PRRs, como los receptores similares a Toll (TLR), los receptores similares al gen inducible de ácido retinoico (RIG-I), receptores similares a unión de oligonucleótidos y los receptores de ADN (sensores citosólicos para el ADN). Todos ellos juegan un papel crucial en la defensa del huésped para el desencadenamiento de una inflamación granulomatosa (Petersen *et al.*, 2013). Las células dendríticas (DC) y los macrófagos son CPA profesionales capaces de

responder a patógenos a través de PRRs, actuando en el reconocimiento de agentes infecciosos y juegan un papel importante tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa (Akira *et al.*, 2006). Eventualmente, las CPAs pueden activar una respuesta inmune adaptativa hacia patógenos intracelulares al activar la diferenciación de células T y culminar con la formación del granuloma (Kumar *et al.*, 2011). Al inicio de la respuesta granulomatosa, las CPAs que se encuentran con un antígeno liberan citocinas proinflamatorias y quimioatrayentes. Esto ocasiona el reclutamiento de neutrófilos circulantes hacia el área infectada, los cuales liberan citocinas adicionales para atraer y activar células mononucleares (monocitos). En circunstancias normales, los neutrófilos reclutados eliminan el agente infeccioso a través del proceso de fagocitosis y digestión dentro del fagosoma (Segal *et al.*, 2009). Los macrófagos pueden engullir al agente patógeno, ya que es resistente a la eliminación por parte de los neutrófilos. Tras la internalización del antígeno, los macrófagos secretan mediadores pro-inflamatorios adicionales (TNF- α) mientras digieren el cuerpo extraño. Esto es con el fin de presentar péptidos y lípidos derivados de antígenos mediante las moléculas MHC clase II a las células Th, a las células T asesinas naturales (células NKT) y a las células asesinas naturales (células NK). El IFN- γ producido por las células NK, células NKT y células T, activa a las células dendríticas. Las células dendríticas a su vez liberan TNF- α para promover aún más la afluencia de células inmunes al área, creando un microambiente especializado para tratar el antígeno extraño (Holland, 2010). Tras la internalización del antígeno, los macrófagos secretan mediadores pro-inflamatorios adicionales y tratan de digerir el cuerpo extraño con el fin de presentar péptidos y lípidos derivados de antígenos a través de moléculas MHC clase II y CD1

a la célula Th. Las células dendríticas migran a los ganglios linfáticos locales para presentar el antígeno a células CD4⁺ inmaduras. En la secreción de IL-12 por parte de las células dendríticas, las células CD4⁺ inmaduras se diferencian en células Th1, las cuales producen IL-2 para promover su supervivencia y expandir su población. Las células Th1 activadas entran en la circulación sanguínea y son atraídas hacia el sitio de la infección o lesión a través de los elevados niveles de quimiocinas y moléculas de adhesión presentes en las células endoteliales. Las células mononucleares arriban y rodean al incipiente granuloma utilizando la comunicación bioquímica a través de los macrófagos (Egen *et al.*, 2008). El granuloma se asemeja más bien a una bolsa fluida con células inflamatorias que se mueven libremente dentro de la misma, en lugar de la típica estructura sólida y "amurallada" que se ha presentado hasta ahora en la literatura (Canal, 2017). La persistencia del antígeno más allá de este punto conduce a una mayor cronicidad del proceso inflamatorio y a la formación de un granuloma maduro. La compleja comunicación cruzada entre las células inflamatorias individuales y el epitelio circundante mediante la producción de altos niveles de TNF- α e IFN- γ conduce a una maduración de los macrófagos a células M1. Estos macrófagos se convierten en células gigantes multinucleadas, con mayor capacidad fagocítica y digestiva. Toda esta participación celular, tisular y bioquímica es con la intención de erradicar al antígeno. Después de varias semanas, estas células fagocíticas se diferencian finalmente en macrófagos epitelioides, los cuales contienen un gran número de lisosomas, mitocondrias, y se dedican a la actividad endocítica continua. La formación de pseudópodos en macrófagos epitelioides les permite una estrecha interdigitación y un empaquetamiento de estas células para dar lugar a células

gigantes multinucleadas. Finalmente se produce una fibrosis, la cual rodea la reacción inflamatoria (Ackermann, 2017).

2. 5. 1. Tipos de granuloma

2. 5. 1. 1. Granuloma Nodular o tuberculoide (Granuloma tipo Th1)

El ejemplo más típico de este tipo de respuesta inflamatoria es aquella causada por *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, o por algunas infecciones fungales sistémicas como coccidioidomicosis (Palmer *et al.*, 2007). Los granulomas tipo Th1 son frecuentemente blanquecinos o grisáceos, redondos u ovals, y firmes al tacto. El granuloma tuberculoide se desarrolla como un tipo de respuesta de tipo Th1 y ha sido estudiada extensivamente en humanos, ganado y macacos *Rhesus* (Helming *et al.*, 2008). En la mayoría de las veces el portal de entrada es aerógena, por lo que el pulmón esta mayormente involucrado con la participación secundaria de otros órganos. Microscópicamente estos granulomas pueden tener un centro necrótico y caseoso. Asimismo, está compuesto de numerosos macrófagos con un número variable de células epitelioides, células gigantes multinucleadas, con fibroblastos de manera periférica, linfocitos y células plasmáticas (Volkman *et al.*, 2010). La zona más externa del granuloma tuberculoide está compuesto por fibroblastos, los cuales depositan colágeno y proteínas de la matriz extracelular que crean una región densa, la cápsula. Por lo tanto, un granuloma tuberculoide tiene 3 diferentes zonas morfológicas: La zona 1, es la parte más interna que está compuesta de tejido necrótico formando necrosis

caseosa; la zona 2, es la parte central que está compuesta por células mononucleares como macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas, y la zona 3, es la parte más externa que consiste de células Th y células B, células plasmáticas, macrófagos y tejido fibroso (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2011). Siendo las etapas de la reacción granulomatosa tipo I o nodular las siguientes: 1). Los primeros 2 a 3 días: La lesión inflamatoria es infiltrada por PMN neutrófilos, células mononucleares (monocitos, macrófagos, células NK y células Th). Se comienza a formar las células epitelioides; 2). La primera semana: Abundan los macrófagos y las células gigantes de tipo epitelioides así como las células B y células Th α/β y γ/δ y se comienza a producir la capa de tejido conectivo de la cápsula exterior; 3). Los primeros dos meses: El área central de la lesión puede necrosarse, caseificarse en algunos casos y mineralizarse, las células involucradas son los linfocitos, las células plasmáticas, los fibroblastos y el tejido fibroso que rodean esta zona inflamatoria; 4). Presente de los 3 meses en adelante. La lesión se encuentra encapsulada por una densa capsula de tejido conectivo, la cápsula y su interior pueden llegar a degradarse completamente o romperse y liberar el agente patógeno al tejido sano adyacente (Palmer *et al.*, 2007).

2. 5. 1. 2. Granuloma difuso o lepromatoide (Granuloma tipo Th2)

El ejemplo típico de este tipo de granuloma es la enfermedad de Johne, causada por *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis. Se caracteriza por un agregado no caseificado en donde predominan los macrófagos (Helming *et al.*,

2008). Esta reacción granulomatosa esta dirigida por las citocinas de las células Th2, como IL-4 e IL-10, aunque tambien pueden participar la IL-5, IL-13 y TGF- β (Braithwaite-Wikman *et al.*, 2007). Estas citocinas producen una polarización de macrófagos hacia células M1. También se genera una respuesta de tipo humoral por estimulación de células B (Soehnlein *et al.*, 2010), así como el reclutamiento de eosinófilos y basófilos. La lesión esta mal definida y tiene una distribución más diseminada, con una notoria proliferación del agente causal, escasos linfocitos, numerosos macrófagos rodeando pobremente de la lesión y sin formación de una cápsula propiamente dicha, sin fibrosis. Microscópicamente se observan láminas difusas de macrófagos con escasas células B y T. Se requieren tinciones especiales, como ácido alcohol resistente o inmunohistoquímica para poder reconocer al agente patógeno causal (Manz *et al.*, 2014) .

2. 5. 1. 3. Granuloma Microsporidiano

El modelo de granuloma microsporidiano más comúnmente estudiado es el causado por *Encephalitozoon cuniculi*. La reacción inflamatoria se caracteriza por el desarrollo de granulomas tanto en el riñón como en el encéfalo, causando principalmente una nefritis granulomatosa multifocal y una severa encefalomiелitis granulomatosa multifocal no supurativa, respectivamente (Künzel *et al.*, 2010). Microscópicamente esta reacción granulomatosa está compuesta del centro hacia la periferia por esporas viables y vacías en estado de degradación. Asimismo, existe una zona central de necrosis, rodeada de macrófagos, células gigantes,

células T, células B, células plasmáticas y fibroblastos (Csokai *et al.*, 2010). Exteriormente existe una zona de escaso tejido conectivo que no llega a formar una cápsula propiamente dicha. En encéfalo los vasos sanguíneos y capilares adyacentes a la zona granulomatosa muestran infiltrado por células mononucleares o manguito perivascular (Csokai, *et al.*, 2009). Este tipo de granuloma corresponde morfológicamente al descrito para el tipo nodular o tuberculoide (Tipo Th1). En el tejido renal la respuesta inflamatoria es más difusa, localizada principalmente en la médula renal, en el área de los túbulos colectores, sin formación de células gigantes, ni formación de cápsula de tejido conectivo. Este tipo de respuesta inflamatoria es característico al descrito para el tipo difuso o lepromatoso (Tipo Th2) (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016).

2. 6. Diagnóstico de Laboratorio de la Microsporidiosis

Existe una serie de técnicas para el diagnóstico de esporas de microsporidios en animales domésticos y en el hombre (van Gool *et al.*, 2004). La mayoría de estos métodos se desarrollaron para detectar esporas en individuos inmunocomprometidos y debido a que los casos de microsporidiosis van en aumento en poblaciones inmunocompetentes, es necesario contar con métodos de diagnóstico más sensibles, efectivos y no depender de un solo método. Lo anterior obedece a que en muchos casos la microsporidiosis no están limitados a un tejido, sino que puede involucrar múltiples sistemas orgánicos y es necesario tomar muestras tanto de tejido como de fluidos corporales (Snowden *et al.*, 2014.).

2. 6. 1. Técnicas de tinción

2. 6. 1. 1. Cromotrópo-tinción. Azul de Tricromo Modificado

Es la técnica de tinción basada en un agente cromotrópico para el examen microscópico de muestras de heces, aspiración duodenal y otros fluidos corporales (Weber *et al.*, 1992). El resultado de esta tinción en la espora ocasiona que éstas se aprecien transparentes. Esta tinción se puede utilizar tanto en fluidos corporales, la orina, las heces fecales y en el tejido (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2017). Las muestras fluidas pueden utilizarse frescas o conservadas en formaldehído amortiguado en PBS pH 7.4. Esta tinción tiene una alta afinidad hacia la quitina, la cual es un componente importante de la pared interna de la cápsula de la espora. La visualización e identificación de la espora requiere de una buena iluminación y un aumento de 100X. Las esporas lucen rojas o rosa pálidas, mostrando el típico tubo polar en el plano ecuatorial o de manera oblicua de polo a polo de la espora. Se requiere experiencia para distinguir las esporas de levaduras, bacterias o artefactos. Es necesario emplear controles positivos para evaluar la eficacia de la tinción y discernir la morfología de la espora (Patil *et al.*, 2008).

2. 6. 1. 2. Histoquímica. Tinción de Giemsa

Puede ser utilizada en frotis fecales o de fluidos corporales para la identificación de esporas de ciertos microsporidios, las cuales se tiñen de color azul. Las esporas son difíciles de diferenciar de los artefactos del frotis fecal y pueden ser muy difíciles de diferenciar del contenido intestinal. Esta tinción es más

recomendable para preparaciones de cultivos de esporas que para muestras fluidas o tisulares. La tinción con Giemsa de muestras de heces o fluidos da como resultado una tinción azul claro de microsporidios y a veces el núcleo se tiñe de color negro (van Gool *et al.*, 1995). Esta tinción se recomienda para una tinción rápida de raspados o improntas oculares (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016)

2. 6. 1. 3. Agentes quimiofluorescentes. Calcoflúor white

Este agente quimiofluorescente tiene una extrema afinidad hacia la quitina y para detectarlo se requiere del microscopio con luz ultravioleta (Maestrini *et al.*, 2017). Se requiere de una longitud de onda de incidencia de 395 a 415 nm, con una absorbancia de 455 nm. Las paredes de las esporas aparecen como halos ovalados de color azulado o turquesa brillante. Es importante mencionar que esta tinción no es específica y otros hongos y artefactos presentes en la muestra fecal pueden fluorescer también. Sin embargo, cuando esta tinción se utiliza con otros especímenes como orina, tejido o esporas obtenidas de cultivo, los microsporidios son más fáciles de identificar (Didier, 1995). Otros agentes quimiofluorescentes que pueden utilizarse para detectar microsporidios son el Fungi-Fluor y Cellufluor (Polysciences Inc., Warrington, Pa.), Fungiqua A (Diagnostics Kandern, Alemania), y Uvitex 2B (Ciba Geigy, Basilea, Suiza).

2. 6. 2. Inmunofluorescencia (IFAT)

Se han utilizado anticuerpos policlonales o monoclonales (mAb) marcados con fluoresceína para la detección de microsporidios en muestras clínicas de seres humanos y animales (García, 2002). A diferencia de las técnicas histoquímicas que tiñen solamente la pared de los esporoblastos o de las esporas, la técnica de IFAT, particularmente aquellos que usan Ac policlonales, visualizan a las esporas en diferentes estadios de desarrollo y representan una característica patognomónica microscópica para todas las especies microsporidianas, tales como *Encephalitozoon cuniculi* (en esputo y en líquido cefalorraquídeo), *Encephalitozoon intestinalis* (en esputo y en orina) y *Encephalitozoon bieneusi* (en biopsias y en fluido intestinal) (Ghosh *et al.*, 2014). Los anticuerpos policlonales para *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon hellem* han permitido a los investigadores distinguir estas dos especies morfológicamente idénticas. Sin embargo, una reactividad cruzada de anticuerpos policlonales entre *Encephalitozoon* spp. y otras especies de microsporidios han sido reportadas (Giordano, 2005), y también se ha utilizado para detectar esporas de *Enterocytozoon* en muestras de heces. Los mAc utilizados en la detección de esporas de microsporidia mediante inmunofluorescencia no están comercialmente disponibles para todos los microsporidios y solamente están limitadas a las esporas especies de *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* (Habenbacher, 2012). Las esporas aparecen de color café o marrón perfectamente discernibles del tejido. Pueden emplearse con fines experimentales en tejido y en cultivo de células. Sin embargo, la tinción (ruido) de fondo y las reacciones cruzadas con otros microsporidios previene en los

laboratorios el uso de mAc en el diagnóstico rutinario de microsporidios (Leipig *et al.*, 2013).

2. 6. 3. Microscopía

2. 6. 3. 1. Histología de rutina

Existe una serie de técnicas disponibles para identificación de esporas de microsporidios en tejidos. Aunque las esporas han sido identificadas en preparaciones histológicas, no se tiñen con las tinciones de rutina y los resultados son impredecibles. Ocasionalmente, las esporas aparecen refráctiles en tejidos fijados con formaldehído, embebidos en parafina y teñidos con H&E (Rodríguez Tovar *et al.*, 2011). Solamente personal entrenado y experimentado es capaz de identificar las esporas de microsporidios de artefactos u otros microorganismos, como levaduras, bacterias y protozoos. Sin embargo, existe una variedad de métodos especiales de tinción, como Gram y azul de Tricromo que demuestran fácilmente las esporas. Existe una revisión sobre las diferentes tinciones histológicas rutinarias empleadas para detectar *Encephalitozoon cuniculi* (Rodríguez Tovar *et al.*, 2017).

2. 6. 3. 2. Secciones embebidas en resina.

Independientemente del fijador utilizado para preservar la muestra, existe evidencia que señala que las secciones semifinas y ultrafinas embebidas en plástico

y teñidas con azul de toluidina o azul de metileno-azur II fucsina básica puede facilitar la visualización de las esporas (Didier, 1995).

2. 6. 3. 3. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

El examen mediante MET sigue siendo el mejor enfoque para el diagnóstico definitivo de microsporidiosis. Sin embargo, esta opción no está disponible en todos los laboratorios, ya que requiere equipo costoso y personal altamente calificado (Vavra *et al.*, 2014). La fijación rutinaria de glutaraldehído y las técnicas de inclusión para TEM han sido útiles para estudiar la microsporidiosis. La fijación utilizando formalina con inclusión en parafina de biopsias o tejidos de necropsia no es un método óptimo para la conservación de especímenes para TEM; sin embargo, esto no impide el posterior examen ultraestructural (Zietek, 2014). La identificación de microsporidios y su taxonomía se han basado principalmente en características ultraestructurales. La sensibilidad de MET disminuye cuando se examina la orina o las heces; sin embargo, la identificación de microsporidios al nivel de género se ha basado en las características ultraestructurales (Cali *et al.*, 1999). La ultraestructura de estos patógenos es en muchos casos única y patognomónica para la determinación del fylum y es útil para la asignación de nuevos géneros (Cali *et al.*, 1999). A pesar de que la microscopía electrónica es considerada como la prueba de oro para la identificación de esporas, la clasificación completa requiere de la observación de todas las etapas del ciclo de vida, y para la mayoría de las especies, la morfología de la espora no es suficiente para permitir la clasificación definitiva a

nivel de especie para ello se requieren pruebas antigénicas o moleculares (Didier *et al.*, 1999). Las principales características ultraestructurales para la identificación de especies son la determinación de las fases de desarrollo del parásito y la interfaz entre el huésped-parásito, que se observan sólo en muestras de tejidos, así como la configuración nuclear y la morfología de las esporas, que no se observan en muestras aisladas de heces y otros fluidos corporales (Furuya *et al.*, 2009). La MET ha sido utilizada con éxito para la confirmación o identificación de microsporidios, sin embargo, tiene una baja sensibilidad porque sólo una pequeña cantidad de una muestra puede ser examinada (García, 2002). Es relativamente insensible como una técnica de diagnóstico en muestras de tejido debido al pequeño tamaño de la muestra que conduce a un error de muestreo significativo.

2. 6. 4. Métodos moleculares

Los estudios moleculares para la identificación de microsporidios en animales domésticos han sido limitados; sin embargo, se han reportado estudios de secuencias de ADN en algunos microsporidios patógenos tanto en animales como en seres humanos (Sokolova, 2004). Aunque se han desarrollado algunos métodos basados en ácidos nucleicos, algún producto comercial con fines diagnósticos todavía no está a la venta (Xiao, 2001). Se ha reportado la detección por PCR de *Encephalitozoon intestinalis* en biopsias intestinales de pacientes con VIH-SIDA así como la identificación microscópica y por PCR para la detección de esporas de *Encephalitozoon bienewisi* en heces de pacientes inmunosuprimidos. A la fecha no

se ha confirmado que las pruebas moleculares tengan una mayor sensibilidad para el diagnóstico de esporas de microsporidios (Zietek, 2014). Sin embargo, se ha indicado que el umbral de detección de esporas mediante PCR es 10^2 esporas, mientras que el de microscopia electrónica requería 10^4 y 10^6 esporas por ml de muestra (Xiao, 2001).

2. 6. 5. Pruebas serológicas

2. 6. 5. 1. Métodos basados en la detección de Ac

Existe una variedad de métodos serológicos para la detección de Ag (carbón inmunoensayo, Ac fluorescentes, ELISA, contra inmunoelectroforesis y Western Blot) que han sido utilizados para identificar IgG o IgM de microsporidios (*Encephalitozoon cuniculi*) en animales domésticos (Didier *et al.*, 2014). Los Ac contra *Encephalitozoon intestinalis* se han encontrado en individuos inmunocompetentes e inmunosuprimidos; sin embargo, aún no está claro si esto representa una infección verdadera o una reactividad cruzada contra otras especies (Khan *et al.*, 2004). Lamentablemente, debido a la falta de éxito en el método de cultivo de *Encephalitozoon bieneusi* no existen antígenos comerciales disponibles, y por lo tanto, no hay ensayos serológicos disponibles para este microorganismo. Por el momento, solo existen pruebas de diagnóstico comerciales para *Encephalitozoon cuniculi* y los datos serológicos obtenidos son interesantes y confiables (Khan *et al.*, 2001).

2. 6. 5. 2. Métodos basados en la detección de Ag

Entre estos métodos se cuentan a los ensayos de inmunofluorescencia (IFAT), ELISA y western blot utilizan anticuerpos de Ac de animales inmunizados experimentalmente para reconocer antígenos específicos patógenos característicos (Valencakova *et al.*, 2012). La IFAT puede utilizarse *in situ* o en tejidos fijados pero requiere examen por microscopía de fluorescencia. Las pruebas WB o de ELISA requieren de un homogeneizado de la muestra para ser examinados. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales (Omalu *et al.*, 2007). Existen varios anticuerpos monoclonales y policlonales contra microsporidios patogénicos humanos y animales entre los que se incluyen *Encephalitozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem* y *Encephalitozoon intestinalis* (Didier *et al.*, 2014). Preferentemente, estos Ac están dirigidos contra la pared de esporas o el tubo polar de los microsporidios. Algunos de estos Ac han demostrado reactividad cruzada entre varias especies de microsporidios mediante IFAT o inmunotransferencia. En cualquier caso, la especificidad y sensibilidad dependen en gran medida del Ac y el cuidado con el que se ejecutan las diversas etapas como por ejemplo, fijación, bloqueo y lavados (Didier *et al.*, 2014).

2. 7. Apoptosis y Microsporidiosis

El parasitismo representa un tipo de interacción biológica entre organismos de diferentes especies, en donde el parásito obtiene un beneficio a costa del

huésped. Es por ello que las células huésped han desarrollado mecanismos de defensas que les permitan resistir la invasión, infección y proliferación de los agentes patógenos. Entre dichos mecanismos se encuentran la fusión del fagolisosomas, la producción de radicales de oxígeno, intermediarios reactivos de nitrógeno, quelación de nutrientes y el suicidio celular (apoptosis) (Nelson *et al.*, 2008). La apoptosis es un mecanismo que el huésped utiliza para controlar la diseminación de patógenos, y es morfológicamente y bioquímicamente diferente de la muerte celular programada. La apoptosis juega un papel importante en la eliminación de células dañadas, en la homeostasis de los tejidos y en el envejecimiento de organismos multicelulares. A la apoptosis también se le reconoce como un mecanismo de defensa contra agentes patógenos virales, bacterianos y parasitarios durante la inmunidad innata y adaptativa (Luder *et al.*, 2001). Sin embargo, algunos parásitos intracelulares, como *Toxoplasma cruzi* y *Leishmania* spp. pueden modular la apoptosis induciendo o inhibiendo este proceso, permitiendo que el parásito se reproduzca intracelularmente con éxito (Bruchhaus *et al.*, 2007). Los microsporidios tienen una etapa intracelular en la cual mantienen un contacto directo con el citoplasma del huésped a lo largo de su ciclo de vida y hasta su egreso como espora madura. La célula huésped sufre cambios notables en su estructura, como aumento en el número de organelos, hipertrofia del núcleo y agrandamiento de la célula en general (Heussler *et al.* 2001). Esto muestra que la célula se acomoda a la proliferación del parásito, sugiriendo una interferencia del microsporidio en el metabolismo y ciclo celular (Scanlon, 1999). Es probable que los microsporidios inhiban la apoptosis de manera similar a otros parásitos intracelulares (Scanlon *et al.*, 2004); sin embargo, también pudieran activar la

apoptosis al terminar su etapa proliferativa, para librarse de la célula como esporas maduras (Luder *et al.*, 2001). Se ha sugerido que la p53, factor transcripcional supresor de tumores, está impedido durante la infección por *Encephalitozoon hellem in vitro* (del Águila, 2006). Sin embargo, aún faltan estudios que permitan elucidar el verdadero papel de regulación de la apoptosis durante una infección por *Encephalitozoon cuniculi* ya que los resultados son contradictorios (Martín-Hernández, 2017).

2. 8. Óxido Nítrico y Microsporidiosis

El óxido nítrico (ON) es una molécula gaseosa sintetizada a partir de la L-arginina, oxígeno molecular y NADPH por medio de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). En el tejido nervioso, el ON actúa como un neurotransmisor y es un componente esencial de las vías de señalización que operan entre los vasos sanguíneos cerebrales, las neuronas y las células gliales (Brunet, 2001). La NOS inducible (iNOS) se expresa en los macrófagos y en las células gliales en respuesta a citocinas pro-inflamatorias tales como IFN- γ o TNF- α . La iNOS puede producir una gran cantidad de ON (100-1000 veces mayor), en relación con las otras dos isoformas, la endotelial NOS (eNOS) y la neuronal NOS (nNOS) [Bogdan *et al.*, 2015]. Después de su inducción, iNOS produce continuamente ON hasta que la enzima se degrada. El ON producido por iNOS es un arma citotóxica clave para la destrucción de microorganismos intracelulares, pero también es un mediador

importante del daño tisular (Burgner *et al.*, 1999). La producción de ON por iNOS está regulada por las citocinas pro-inflamatorias IL-1, IL-2, TNF- α e IFN- γ , mientras que las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10 tienen un efecto regulador. El papel del ON en la eliminación de microorganismos intracelulares está bien establecido (Chakraborty, 1996); sin embargo, poco se sabe de su efecto en infecciones por microsporidios (Didier, E. S., 1995), y la mayoría de los estudios han sido realizados *in vitro* y en especies diferentes al huésped definitivo, el conejo (Leiro *et al.*, 2001). Al parecer, la producción de ON resultó inhibida por la infección de macrófagos humanos con esporas viables de *Encephalitozoon cuniculi* y esta inhibición en la producción de ON tuvo una correlación negativa entre el número de esporas y la cantidad de ON (Franzen *et al.*, 2005). Solamente se ha observado un incremento en los niveles de ON cuando macrófagos murinos fueron expuestos con esporas muertas *Encephalitozoon cuniculi* o cuando los macrófagos fueron estimulados previamente con LPS o IFN- γ (Didier *et al.*, 2000). Se han encontrado diferencias en la patogenicidad de las especies microsporidianas en relación al modelo experimental (*in vivo/in vitro*), y en la viabilidad de las esporas y especie animal utilizada; sin embargo, no está bien definido el papel que el ON juega durante la infección tanto natural como experimental por *Encephalitozoon cuniculi* en el conejo. Los mecanismos por los cuales ON o sus intermediarios (NO₂, NO₃) ejercen una actividad anti-microsporidia esta aun por ser definidos, pero pudiera incluir intermediarios de oxígeno (ROS), los cuales pudieran sinergizar para formar peroxinitritos, que son activos por más tiempo que el ON solamente (Beckman *et al.*, 1990 and Didier, 1995). Los datos a la fecha parecen indicar que las esporas de microsporidia pueden modular la respuesta del ON para garantizar la

sobrevivencia dentro de la célula huésped o dentro de la célula fagocítica por un mecanismo aún desconocido (Wink *et al.*, 2011).

2. 9. Citocinas y Microsporidiosis

Las citocinas son proteínas mediadoras solubles de bajo peso molecular (<80 kD), las cuales son liberadas por una célula para unirse específicamente a un receptor específico en la misma célula (autócrina), a una célula cercana (paracrina), o a un grupo de células a distancia (endócrina) (Valencakovaa *et al.*, 2012). Las citocinas son moléculas altamente potentes que al interactuar con su receptor establece señales que inducen a la célula blanco a realizar una acción específica. Son importantes en la señalización y comunicación entre las células del sistema inmune (CPA, células B y T, células NK), y otras células del huésped. Su clasificación es compleja, ya que se pueden clasificar en base a: 1. Su nomenclatura, como interleucinas (IL), familia de los interferones (IFN), familia del factor de necrosis tumoral (TNF), factores estimulantes de colonias (CSF), quimiocinas y RANTES. 2. Su función, como sinergismo, antagonismo, redundancia. 3. En base a la célula que lo secreta como macrófagos, Th1, Th2, células NK, células B, etc. (Tizard, 2016 y Day *et al.*, 2014), y 4. En base a su función inmunológica, como citocinas pro-inflamatorias, como TNF- α e IFN- γ , así como anti-inflamatorias, como IL-4 e IL-10 (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). La expresión de citocinas juega un papel importante en el huésped infectado con

Encephalitozoon cuniculi a través de la activación de macrófagos, células Th1, Th2 y células CD8⁺ (Lawlor *et al.*, 2010). El papel de las citocinas en la respuesta hacia infecciones microsporidianas ha sido examinada en varios modelos animales *in vitro* (Jelinek, *et al.*, 2007). La respuesta de IFN- γ por parte de las células Th1 juega un papel importante durante la infección microsporidiana en ratones inmunodeficientes (Salat *et al.*, 2004). Los ratones desprovistos de IFN- γ (knock out) no pueden eliminar las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (Khan *et al.*, 1999); sin embargo, la transferencia adoptiva de esplenocitos de ratones normales incrementa su tasa de sobrevivencia, sugiriendo que la producción de IFN- γ por parte de células NK es importante para la eliminación de *Encephalitozoon cuniculi* (Salat *et al.*, 2004). Estudios previos realizados *in vitro* demostraron que la adición exógena de IL-12 le permitió a ratones desprovistos de células CD8⁺ eliminar esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (Moretto *et al.*, 2010). La mayoría de los estudios sobre *Encephalitozoon cuniculi* realizados a la fecha han sido llevados a cabo en ratones inmunocompetentes o inmunosuprimidos, usando tanto modelos *in vivo* como *in vitro*. Solo unos cuantos estudios se han llevado a cabo en conejos (Rodríguez Tovar *et al.*, 2017); no obstante, aún faltan estudios tendientes a elucidar la respuesta inmune tanto innata como específica en infecciones tempranas y tardías de *Encephalitozoon cuniculi* en el conejo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales para el experimento

Se utilizaron conejos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) de las razas California y Nueva Zelanda, de 2 y 4 meses de edad, ambos sexos; y con un peso aproximado de 1/2 a un 1 kg al inicio del experimento. La procedencia de los animales fue del Centro de Especies Menores (CEM) ubicado en Ixtacuixtla, Tlaxcala, México y de forrajeras de diferentes municipios de Nuevo León.

3.2. Mantenimiento y alojamiento

Los conejos se alojaron en la Unidad de Experimentación Animal del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL bajo las condiciones y de acuerdo con lo recomendado por la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) sobre el uso y cuidado de animales de laboratorio. Se mantuvieron por un periodo de cuatro días de adaptación y preparación antes del inicio del experimento.

3.3. Modelo experimental

El diseño experimental fue basado en lo propuesto por Valencakova *et al.*, 2003, realizando algunos cambios en cuanto al modelo animal, dosis y tiempos de

aplicación. Los conejos se dividieron en cuatro grupos: Grupo A, animales con la infección natural, los del grupo B, presentaban infección natural y estuvieron inmunosuprimidos, los del grupo C solamente estuvieron inmunosuprimidos y los del grupo D, no presentaban ni infección, ni inmunosupresión y fueron considerados controles negativos.

Para el criterio de inclusión en la selección de los grupos se tomó en cuenta la procedencia de los animales. Los animales de los grupos A y B fueron adquiridos de forrajeras ubicadas en diferentes municipios del Estado de Nuevo León. Para los grupos C y D, los conejos fueron adquiridos en el CEM ubicado en Ixtacuixtla, Tlaxcala, México. (19°21'14.1"N 98°23'00.1"W).

A los animales que representaban el grupo A (Infección natural) fueron seleccionados los conejos que presentaban signos clínicos asociados con *Encephalitozoon cuniculi*; como los neurológicos (inclinación de la cabeza, ataxia, rodamientos sobre su eje, convulsiones, paresia, temblores de la cabeza, movimientos circulares alrededor de su eje, balanceo en reposo, cabeceo, nistagmos y cambios en el comportamiento), disfunción del riñón (azotemia, incontinencia urinaria, poliuria y polidipsia y uveítis facoclástica. Además, fueron positivos a *Encephalitozoon cuniculi* en el examen serológico (CIA) y en el examen coproparasitoscópico con tinciones de calcoflúor white y azul de tricromo. Para los animales del grupo B (Infección natural / inmunosuprimido) se seleccionaron los conejos que también presentaban signos compatibles con *Encephalitozoon cuniculi* y que fueron positivos a *Encephalitozoon cuniculi* en serología y examen

coproparasitoscópico. A éstos conejos para la condición de inmunosupresión se les administró dexametasona (Bursol, Laboratorios Brovel, México), 6.5 mg/kg, por vía IM. Para los conejos del grupo C se seleccionaron a los animales que no presentaron signos clínicos compatibles con los de *Encephalitozoon cuniculi* y que fueron negativos a *Encephalitozoon cuniculi* en serología y en el examen coproparasitoscópico. A estos animales también se les administró solamente dexametasona 6.5 mg/kg, por vía IM. A los conejos del grupo D fueron seleccionados en base a su ausencia de signos de *Encephalitozoon cuniculi* y se les aplicó SSF con una cantidad de 1 ml para cada animal. Las aplicaciones de la dexametasona y la SSF se hicieron a los días 0, 7, 14 y 21. (Figura 3).

El día 14 además se obtuvo sangre de la arteria media de la oreja izquierda. En el día 21 los conejos se eutanasiaron y se obtuvo sangre en un volumen de 4 ml por punción intracardiaca (IC), así mismo se tomaron muestras de excremento directamente del recto y se tomó orina por punción vesical. Posteriormente se realizó la necropsia de cada animal y se obtuvieron muestras de cerebro, riñón e hígado en dos secciones. Una de las secciones de los órganos se colocaron en formaldehído amortiguado al 4 % (Formaldehído 37% RA, CTR Scientific, Monterrey, N. L.) con PBS (Phosphate Buffer Saline Tablets, Sigma-Aldrich®, México) a un pH de 7.4 para la conservación y la posterior examinación histopatológica, con la finalidad de confirmar la presencia o ausencia del microorganismo. La otra sección de los órganos de estos mismos animales se conservaron en trizol (Tri Reagent, Molecular Research Center, Inc. USA) y se

homogenizaron, siendo almacenados en el repco de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente realizar los procedimientos moleculares (Tabla 1)

3.4. Tranquilización, anestesia y sacrificio

Para la sedación y/o anestesia a los conejos se les administró 0.4mg/kg de Clorhidrato de Zolazepam (Zoletil 100 Virbac®, México) vía intramuscular. Para el sacrificio de los mismos, primero se anestesiaron con Zoletil a la dosis antes mencionada y posteriormente se colocaron en un recipiente de plástico transparente de boca ancha conteniendo torundas impregnadas en éter (Jalmek Científica, México) hasta inducir el paro respiratorio.

3.5. Extracción de sangre y obtención de suero

Durante la fase de tranquilización a cada conejo se le extrajo 4 ml de sangre, colocándose una parte de la muestra (2 ml) en un tubo de ensaye con anticoagulante EDTA (3 ml, 13 x 75 mm, BD Vacutainer® con EDTA K2, México). Posteriormente se realizó una biometría hemática y un diferencial leucocitario y subsiguientemente se analizó mediante biometría hemática y conteo leucocitario en un analizador automático (Hemograms analyzer BC Vet Kontrolab 2014-2015©,

	GRUPOS	N	TRATAMIENTOS
A	Infección natural	9	Solución Salina Fisiológica, IM
B	Infección natural/ inmunosuprimido	8	Dexametasona 6.5 mg/kg, IM
C	Inmunosuprimido	10	Dexametasona 6.5 mg/kg, IM
D	Control	10	Solución Salina Fisiológica, IM

Tabla 1. Diseño Experimental. Distribución de los grupos y las dosis utilizadas.

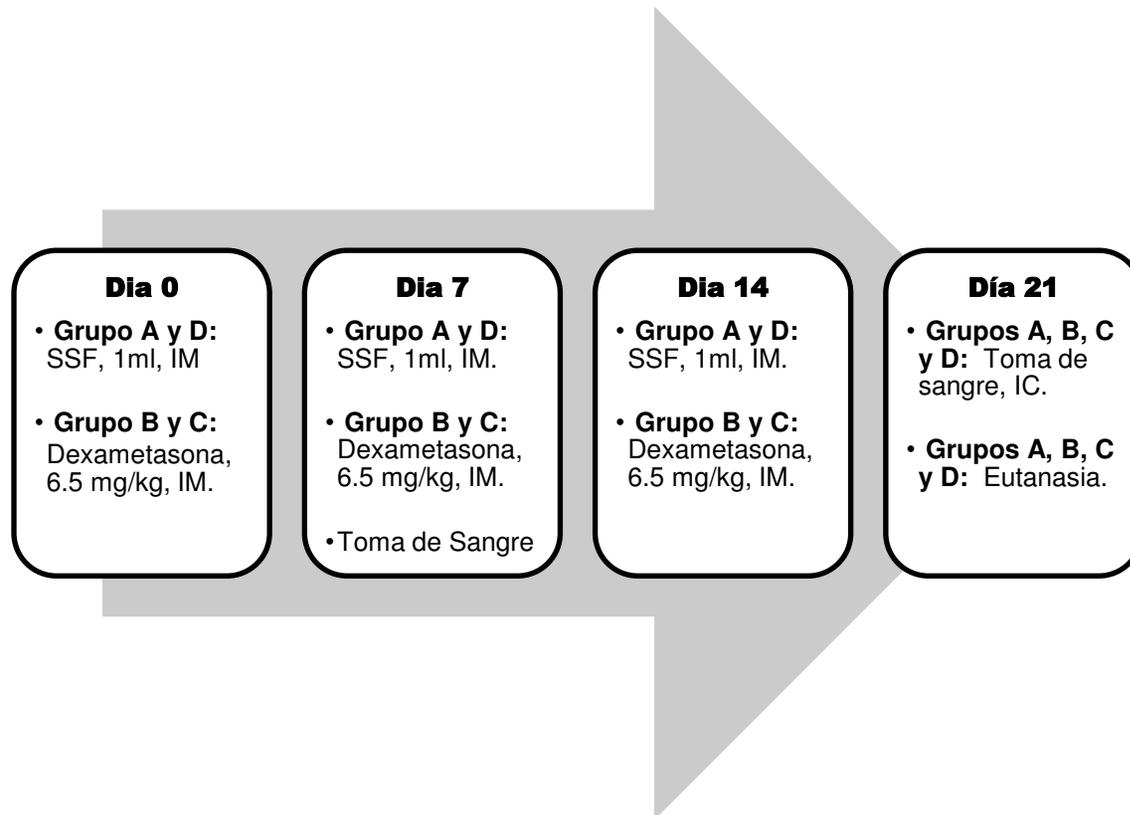


Figura 3. Diseño de los tratamientos. Días de aplicación a los tratamientos a los animales de los diferentes grupos A, B, C y D.

Italia), en el Departamento de Análisis Clínicos en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. La otra porción de la muestra de sangre (2 ml), se colocó en un tubo de ensaye sin anticoagulante (6 ml, 13 x 100 mm. BD Vacutainer®, México) y una vez que se constituyó el coágulo en los tubos con anticoagulante, el suero se separó utilizando una centrifuga (Zentrifugen Universal 320R Hettich, Estados Unidos) a 5000 rpm por 15 min a una temperatura de 4 °C. Luego los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su posterior uso.

3.6 Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón (CIA)

La técnica que se utilizó para la detección de Inmunoglobulina G (IgG) contra *Encephalitozoon cuniculi* fue la prueba de inmunoensayo en carbón (CIA-Medicado®, Medicago AB, Suecia), (Apéndice A. 1), la cual se contiene esporas completas de *Encephalitozoon cuniculi* muertas por calor y suspendidas en carbón coloidal. Esta prueba se llevó a cabo colocando una mezcla que contenía el suero del animal a examinar, el antígeno (esporas de *Encephalitozoon cuniculi*) y el carbón, a ésta se le colocó un cubreobjetos para evitar su deshidratación y facilitar la observación de la aglutinación directa en un microscopio de luz (Primo Star, Zeiss, Alemania) a un aumento de 40X ó 100X. Las animales positivos demostraron la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* aglutinadas y rodeadas de partículas de carbón, interpretándose esto como la presencia de IgG en el suero de

los conejos registrando antígenos en la superficie de las esporas. Dichas muestras fueron comparadas con los controles positivos y negativos de la misma prueba.

3. 7. Examen coproparasitoscópico y examen de orina

Al momento de la necropsia se realizó una revisión anatómica general del cadáver con el registro de los hallazgos correspondientes, realizándose la técnica de necropsia de rutina (Aluja *et al.*, 2002), posteriormente se colectaron 10 gms. de heces de intestino delgado y grueso y aproximadamente 5 ml de orina mediante punción vesical con jeringas plásticas estériles desechables de 5 ml (DL, México, D.F.). Dichas muestras se almacenaron por separado en frascos de polipropileno estériles de 60 ml (38 x 65 mm). Las heces se fijaron en formaldehído amortiguado al 10%. Posteriormente se tomaron frotis de las heces de cada conejo en un portaobjetos (25.4 x 76.2 mm), los cuales fueron teñidas con calcoflúor white (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich®, México), (Apéndice A. 2) y azul de tricromo (Trichome Blue Stain, Para-Pak® Stool System, USA), (Apéndice A. 3). Las heces teñidas se secaron a temperatura ambiente, después se les aplicó una gota de resina Entellan (Merck, Millipore, Alemania) y se les colocó un cubreobjetos (24 X 50 mm) para ser observados en el microscopio de fluorescencia (Axiostar Plus Epifluorescence, Zeiss) a 10X, 40X y 100X. Los controles positivos se utilizaron para confirmar que las estructuras encontradas en las muestras correspondían a las esporas de los animales infectados de los grupos A y B y descartar cualquier artefacto. Posteriormente los resultados se registrarán utilizando una cámara fotográfica digital (Canon®, PowerShot G10, USA).

En las muestras de orina también se realizó un frotis en un portaobjetos y posteriormente se siguió el mismo procedimiento de las tinciones que en las heces. La otra parte de la orina se almacenó a - 20°C para realizar posteriormente el análisis para óxido nítrico.

3.8. Examen histopatológico e histoquímica

Durante la necropsia se tomaron muestras de cerebro y riñón. Una parte de las muestras fueron fijadas en un frasco con formaldehído amortiguado al 10%, durante 48 horas (Bancroft *et al.*, 2004). Posteriormente, los tejidos fueron embebidos en parafina siguiendo la técnica histológica de rutina (Bacha *et al.*, 2015) y seccionándolas en el micrótopo a 5 µm. (Apéndice A. 4) a los especímenes montados se les realizó histoquímica siguiendo los protocolos establecidos de las siguientes tinciones: hematoxilina y eosina (HE) (Apéndice A. 5), azul de tricrómo (Apéndice A.6) y reacción de ácido peryódico de Shiff (PAS) (Apéndice A.7), después se aplicó una gota de resina entellan, para agregar los cubreobjetos, los cortes histológicos se observaron en el microscopio de luz y los resultados fueron registrados utilizando una cámara fotográfica (Canon®, PowerShot G10, USA).

3.9. Extracción de ARN

En el manejo de las muestras para los estudios moleculares, las muestras de órganos de encéfalo y riñón se seccionaron a aproximadamente 0.5mm³ de espesor, se conservaron en 1ml de Trizol Reagent (Tri Reagent TR 118 + MRC, Inc. Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH, USA.) y después las muestras y el trizol se homogenizaron (Tissue-Tearor. Model 985370. BioSpec Products, Inc.) y se almacenaron a - 80°C para utilizarse posteriormente.

Subsecuentemente, las muestras almacenadas se descongelaron paulatinamente para seguir con el procedimiento establecido en el protocolo de extracción de ARN por trizol reagent, realizando los siguientes pasos: se tomaron aproximadamente 100 mg de riñón y cerebro de cada conejo y luego se le agregó 1 ml de Trizol reagent, se homogenizaron en un vórtex (Vortex mixer Labnet. Labnet International, Inc.), por un mínimo de 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Después se le agregó 0.5 ml de cloroformo (Numero de Jalmek C4425-13. Numero de caso 67 – 66 – 3), se mezcló vigorosamente por 10 minutos y se incubó de 2 a 3 minutos a TA. Se centrifugó a 11000g durante 15 minutos a 4°C, obteniéndose la fase acuosa. El sobrenadante de cada muestra se cambió a otro tubo y se le agregaron 0.5 ml de isopropanol frío (Biotechnology Grade. Cas# 67 – 63 – 0. AMRESCO®) y se mezclaron 10 veces por inversión. Se incubaron 10 minutos a TA para después centrifugar a 11000g durante 10 minutos a 4°C descartando el sobrenadante. Posteriormente se le agregó 1 ml de la solución de etanol al 75%

(Etanol biology absolute proof for molecular. SIGMA Adrich. Cas# 64 - 17 - 5. Sherboygan Falls.WI) / DEPC (trated water. Store at RT nuclease free autoclaved, 0.2µm filtred 500 ml P/N: AM9920). Se pasaron por el vortex y después se centrifugaron a 7400g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó la mayor cantidad de sobrenadante posible. Inmediatamente se dejó secar el pellet de 5 a 10 minutos a TA, sin secar totalmente, y luego se disolvió en 7µl de agua DEPC durante 10 minutos a 55 - 60°C. Se agregó 3µl de una solución de 2µl de DNAsa por cada µl de 10x buffer y se incubó a 30 minutos a 37°C. Una vez terminada la incubación se agregó 1µl de DNAsa stop y se dejó incubar por 10 minutos a 65°C. Se le añadió 1 ml de Trizol Reagent y se puso en el vórtex y se dejó incubar por 10 minutos a 55°C para el análisis espectrofotométrico (ELx50™ Microplate Strip Washer. ELISA Biotek Intruments, Inc. Wisconsi Vermont. USA) se preparó 2µl de muestra y 198µl de TE y se leyó a una absorbancia de 260nm. (Apéndice A. 8).

3.10. Síntesis de ADN complementario

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó usando 4 U de enzima transcriptasa reversa (PROMEGA® GoScript™ Reversion Transcription Mixes) en un volumen final de 20 µl conteniendo Buffer RT (1x), mezcla de dNTPs (0.5 mM cada uno), iniciador oligo-dT (1µM), templete de ARN (1µg) y agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen necesario. La mezcla se incubó durante 60 minutos a 37°C y la enzima inactivada a 95°C durante 5 minutos. El producto obtenido se almacenó a - 80 °C hasta su uso posterior. (Apéndice A.9).

3.11. Cuantificación de ARNm de citocinas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La cuantificación de la citocina pro-inflamatoria TNF- α y las anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 se llevó a cabo mediante PCR tiempo real (7500 Real Time PCR. System Applied Biosystem) como sistema de detección. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ l los cuales contenían Sonda (.5 μ l), Mix (5 μ l), ROX (.5 μ l), y agua libre de nucleasas (1.5 μ l), ADNc (2.5 μ l). (GoTaq®Probe qPCR Master Mix. PROMEGA. 2800 Woods Hollow Road Madison, WI. USA).

El método de corrida que se empleó para el propósito, fue un ciclo inicial de activación a una temperatura de 50°C, en un tiempo de 2 minutos, la desnaturalización a 95°C con 10 minutos, la alineación de 95°C con 15 segundos y por último la extensión de 60°C a un tiempo de 1 hora.

La expresión del ARNm se evaluó por los valores en triplicado, los cuales se normalizaron con los niveles de expresión de los ARNm de los genes constitutivos G3PDH y β -actina los cuales fueron diseñados en el programa IDT's PrimerQuestSM y el nivel relativo de los ARNm de los genes analizados (Tabla 2) utilizando el método doble delta ($2^{-\Delta\Delta}$).

La cuantificación de la expresión génica por RT-PCR en tiempo real, se utilizó el método de cuantificación relativa que fundamenta el comparar los valores del ciclo umbral o threshold cycle (C_T), de la muestra desconocida con una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (grupo control). Todas las cuantificaciones, también fueron normalizadas con un control endógeno, en este caso G3PDH y β -actina, para tener en cuenta la variación en la concentración inicial, calidad de ARN y la eficiencia de reacción en la transcripción reversa. Primero, el C_T de la muestra (C_T) y del control interno β -actina ($C_T \beta$ -actina) son determinados para cada muestra. La diferencia que resulta de C_T de la muestra y C_T de la β -actina es llamada ΔC_T ; y se calcula para normalizar las diferencias en la extracción de ARN y en la eficiencia de la reacción de síntesis de ADNc. El ΔC_T de cada muestra es restado del ΔC_T del calibrador. Esta diferencia es llamada $\Delta\Delta C_T$. Por último, la expresión de la proteína en cuestión es normalizada con el control interno (G3PDH y β -actina) y relativa al calibrador, se calcula por $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

La ecuación que se utilizó para calcular $\Delta\Delta C_T$ para el método de cuantificación relativa fue:

$$C_T \text{ de la muestra} - C_T \beta\text{-actina} = \Delta C_T.$$

$$\Delta C_T \text{ de la muestra} - \Delta C_T \text{ del calibrador} = \Delta\Delta C_T.$$

$$\text{Cantidad relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}.$$

SENTIDO	ANTISENTIDO	SONDA
TNF - α		
5' - TAG TAG CAA ACC CGC AAG TG - 3'	3' - CTG AAG AGA ACC TGG GAG TAG A - 5'	/56-FAM/AT GAA GCT c/ZEN/A CGG ACA ACC AGC T/3IABkFQ/
IL - 4		
5' - CAA GAA CACA AC CGA GAG AGA G - 3'	3' - CTC CTT GAA GCA CCA AGA CA - 5'	/56-FAM/CG GCA GTT c/ZEN/T ACC TCC ACC ACA AG/3IABkFQ/
IL -10		
5' - AGA GTC TAG GAC ATC AGT TAG GG - 3'	3' - GGA GCT GAG GTA TCA GAG GTA A - 5'	/56-FAM/AG CAC CTT G/ZEN/G AAA GCT GTT GTA CCT /3IABkFQ/
G3PDH		
5' - GAC CAC TTT GTG AAG CTC ATT TC - 3'	3' - GTG GTT TGA GGG CTC TTA CTC - 5'	/56-FAM/AT TTG GCT A/ZEN/C AGC AAC AGG GTG GT/3IABkFQ/
β- ACTINA		
5' - ATG GCC TCC AAG GAG TAA GA - 3'	3' - CTG GGA TGG AAA CTG TGA AGA G - 5'	/56-FAM/CA GTC CCA C/ZEN/C ACG CTG AGA ATC TG/3IABkFQ/

Tabla 2. Secuencia y sonda de iniciadores de citocinas pro – inflamatorias, anti - inflamatorias y genes constitutivos.
Pro - inflamatorias TNF - α y anti - inflamatorias IL - 4 e IL - 10 y los genes constitutivos G3PDH y β -actina

3.12. Inmunohistoquímica para la detección de células apoptóticas con la técnica de TUNEL

La detección de células apoptóticas en los órganos de cerebro y riñón de los grupos A, B, C, D y los controles utilizados para la técnica: el intestino como control negativo y el timo como control positivo fueron fijadas en solución de formalina al 4 %, después se incluyeron estas muestras en un bloque de parafina para realizar cortes histológicos a 6 μ m. Luego se desparafinaron e hidrataron las muestras y se colocaron los cortes en la estufa a 57°C por 5 minutos. Se sumergieron los cortes de los tejidos en dos recipientes de xilol, por 5 minutos cada uno y se hidrataron en alcoholes graduales de 100%, de 95 % y de 70% por 5 minutos cada uno y por último se pusieron en PBS 1X en 2 cambios de 5 minutos cada uno. Después se siguió el procedimiento con las instrucciones sugeridas por el fabricante del kit de la técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP Nick End Labeling) (TACS®TdT-DAB. *In situ* Apoptosis Detection Kit. Catalog # 4810-30k. Helgerman Ct. Gaithersburg). Una vez terminados los pasos de la técnica, las muestras se sometieron a contratinción realizando el siguiente procedimiento: se sumergieron éstas en agua desionizada por 2 minutos, en verde de metilo por 5 minutos y 10 veces en cada una de las siguientes soluciones: agua desionizada, etanol al 70 %, al 95 %, al 100% y el xilol en 2 cambios en cada una de las soluciones. Por último, las laminillas con las muestras se limpiaron del exceso de xilol, se montaron y almacenaron en una caja para evitar directamente la luz. (Apéndice A. 9). Posteriormente las laminillas fueron observadas en el microscopio, con la luz apagada del laboratorio. En el microscopio a 10X se detectaron células

con apoptosis que se determinaron mediante la condensación de la cromatina visualizada con diaminobencidina (DAB) y la fragmentación de cadenas de ADN nuclear, efectuada por las enzimas ADNasas activadas durante la apoptosis, los campos fueron analizados por el Programa Image J. (Image Processing and Analysis in Java). El análisis estadístico que se realizó fue un diseño completamente al azar del Programa Estadístico SPSS, (IBM, SPSS Statistics *versión 22.0*).

3.13. Determinación de Óxido Nítrico (ON)

Las muestras que se utilizaron para cuantificar la acumulación de nitritos a nivel del granuloma en el cerebro y riñones, en el suero y la orina de los animales de los grupos A, B, C y D. Esto se realizó a través de la reacción de Griess (Griess Reagent System. PROMEGA®). El procedimiento para medir la concentración de ON se realizó de la siguiente manera: con una pipeta multicanal se tomó una cantidad de 50 µl de cada muestra experimental y se mezcló con 50 µl de la solución de sulfanilamida. Se dejó incubar de 5 a 10 minutos a TA y finalmente se tomaron 50 µl de la solución de N-1 naphylethylenediamine dihydrochloride (NED) para todas las muestras. También se incubaron a TA de 5 a 10 minutos, protegiendo todas las reacciones de la luz. Se formó inmediatamente un color de púrpura a magenta y se midió en un espectrofotómetro (ELx50™ Microplate Strip Washer. ELISA Biotek Instruments, Inc. Wisconsin Vermont. USA). La coloración de la reacción se midió a una longitud de onda de 540 nm de absorbancia (Apéndice A.10). Para establecer la concentración de NO₂ en las muestras se utilizó una curva de

concentración de nitrato de sodio (NaNO_2) que también se sometió a la misma reacción. El análisis estadístico para cada experimento se realizó por triplicado y de forma independiente. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar. Se utilizó la prueba de análisis de varianza de 2 colas y después la prueba estadística de Bonferroni para la comparación de las medias. Se consideró una $p \leq 0.05$ como significativa.

4. RESULTADOS

4. 1. Extracción de sangre

4. 1. 1. Comparación del hematocrito

El porcentaje del hematocrito del grupo A fue de 32.7%, en el grupo B se mostró el 39.6%, los conejos del grupo C presentaron un 35.5% y el grupo D resultó con un 39.4%.

Al realizar la comparación entre los grupos no inmunosuprimidos, el grupo infectado naturalmente (grupo A) y el control (grupo D) presentaron una diferencia significativa ($p \leq 0.005$), mientras que la comparación entre los grupos inmunosuprimidos, el B (infectado) y el C (no infectado) presentaron una diferencia significativa de $p \leq 0.075$.

Con respecto a la comparación de los resultados del hematocrito obtenidos entre los grupos no inmunosuprimidos (A y D) y los grupos inmunosuprimidos (B y C), la diferencia significativa fue de $p \leq 0.587$. (Tabla 3).

GRUPOS	PORCENTAJES
A	32.7% ^{a, c}
B	39.6% ^{b, d}
C	35.5% ^{b, d}
D	39.4% ^{a, c}

Tabla 3. Resultados del porcentaje del hematocrito en los grupos experimentales. En donde los grupos representados con la ^a (grupos A y D) presentan una probabilidad entre estos grupos de $p \leq 0.005$, y en ^b la probabilidad de estos grupos (C y D) presentan una probabilidad de $p \leq 0.075$ y la ^c representa los grupos no inmunosuprimidos (A y D) y la letra ^d representa los grupos inmunosuprimidos (C y D) presentaron una probabilidad de $p \leq 0.587$.

4. 1. 2. Comparación de linfocitos y monocitos

Los resultados obtenidos en el grupo A fue de 26.5%, el grupo B obtuvo un 28.3%, en el grupo C alcanzó el 27.5% y el grupo D presentó un 41.0%. El porcentaje de linfocitos y monocitos obtenidos en los animales no inmunosuprimidos (A y D), tomando en cuenta que los conejos del grupo A están infectados con *E. cuniculi* y los del grupo D son considerados los animales controles, presentando una diferencia significativa de $p \leq 0.033$. Por otro lado los animales inmunosuprimidos (grupo B y C), el grupo B, son animales considerados inmunosuprimidos e infectados con *E. cuniculi*, en comparación con el grupo C que solo es considerado inmunosuprimido; presentaron una diferencia significativa de $p \leq 0.068$.

Mientras que la comparación entre los grupos no inmunosuprimidos (A y D) los animales de los grupos no inmunosuprimidos (B y C) presentan una diferencia altamente significativa de $p \leq 0.019$. (Tabla 4).

GRUPOS	PORCENTAJES
A	26.5 % ^{a, c}
B	28.3 % ^{b, d}
C	27.5 % ^{b, d}
D	41.0 % ^{a, c}

Tabla 4. Resultados del porcentaje de linfocitos y monocitos de los grupos experimentales. La diferencia entre grupos A y D representados con la ^a tienen una probabilidad de $p \leq 0.033$, y los grupos B y C con la ^b la diferencia es de $p \leq 0.068$. La ^c indica los grupos no inmunosuprimidos (A y D) y la ^d los grupos inmunosuprimidos (B y C) con $p \leq 0.019$.

4. 1. 3. Comparación de granulocitos

Los valores de los granulocitos del grupo A fueron de 73.5 %, el grupo B presentó un 59.5 %, mientras que el grupo C el 57.9 % y el grupo D un 47.0 %.

Los grupos no inmunosuprimidos presentaron una diferencia altamente significativa de $p \leq 0.005$ en granulocitos entre el grupo A (infectado) y el grupo D (control). Mientras que los grupos inmunosuprimidos presentaron una diferencia significativa de $p \leq 0.404$ de granulocitos entre el grupo con infección por *E. cuniculi* (grupo B) y el solamente el inmunosuprimido (grupo C).

La diferencia de los granulocitos entre los grupos no inmunosuprimidos (A y D) y los inmunosuprimidos (B y C) tuvieron una diferencia de $p \leq 0.402$. (Tabla 5).

GRUPOS	PORCENTAJES
A	73.5 % ^{a, c}
B	59.5 % ^{b, d}
C	57.9 % ^{b, d}
D	47.0 % ^{a, c}

Tabla 5. Resultados del porcentaje de granulocitos entre los grupos experimentales. Diferencias ente los grupos no inmunosuprimidos (grupo A y D) representados con la ^a con $p \leq 0.005$, y la diferencia de los grupos inmunosuprimidos (B y C) indicados con ^b con $p \leq 0.404$. La diferencia entre los grupos no inmunosuprimidos e inmunosuprimidos indicados con ^c y ^d con una $p \leq 0.402$.

4. 2. Obtención de suero

4. 2. 1. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón (CIA)

Todos los animales de los grupos A (n=9) y B (n=8) resultaron estar seropositivos a la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* observándose aglutinadas y rodeadas de partículas de carbón, lo cual se interpretó como la presencia de IgG en el suero de estos conejos (Figura 4). Mientras que todos los sueros de los animales de los grupos C (n=10) y D (n=10) resultaron ser seronegativos a la presencia de esporas aglutinadas de *Encephalitozoon cuniculi* (Figura 5).

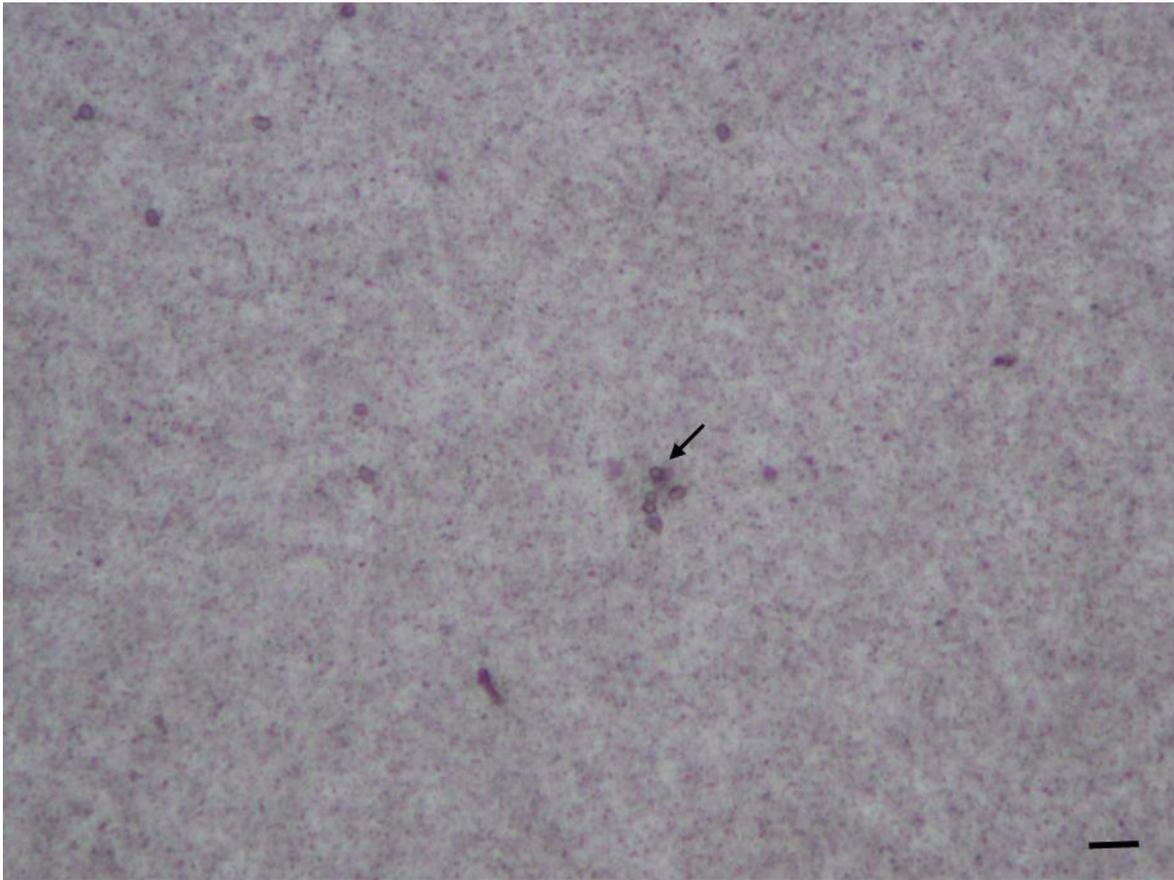


Figura 4. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón positiva. La presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* aglutinadas (flecha) y rodeadas de partículas de carbón, con el suero de los animales de los grupos A y B. Barra = 10 μ m.



Figura 5. Prueba de Inmuno Ensayo en Carbón negativa. Se aprecia que la muestra de suero es negativa a las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en los grupos C y D. Barra = 10 μ m.

4. 3. Examen coproparasitoscópico y examen de orina

En todos los animales infectados de los grupos A y B se pudieron observar muestras positivas para cada animal ya sea provenientes de las heces o de la orina cuando se llevaron a cabo las técnicas de calcofluor white o la tinción de tricrómico modificada. En las muestras de heces se obtuvieron mayor cantidad de animales positivos.

4. 3. 1. Técnica de calcofluor white en heces y en orina

La reacción de contraste característica de esta técnica fue posible observarla fácilmente para la identificación de las esporas en los grupos (A y B), considerados naturalmente infectados con *Encephalitozoon cuniculi*. Los animales del grupo A (9/9) en donde se observó la presencia de esporas en las heces de los conejos (Figura 6), mientras que en la orina se presentaron conejos positivos a *Encephalitozoon cuniculi* (Figura 7), del total del grupo (3/9). Para los animales de los grupos C (0/10) y D (0/10) la presencia de las esporas fue negativo tanto para heces como para orina (Tabla 6).

4. 3. 2. Tinción de Tricromo modificada o técnica de Weber para heces y orina

El resultado de las esporas en heces de animales infectados naturalmente en donde se confirma la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* con la presencia del tubo polar de tono acidófilo con esta tinción, se pudieron observar 8/9 conejos positivos (Figura 8). Mientras que en la orina las esporas se aprecian de color azulado y se pudieron observar 2/9 animales positivos (Figura 9). En los conejos de los grupos C (0/10) o D (0/10) no se observaron esporas, considerándose animales no infectados. (Tabla 6).

GRUPOS	CALCOFLUOR WHITE		AZUL DE TRICROMO MODIFICADA	
	HECES	ORINA	HECES	ORINA
A	9/9	3/9	8/9	2/9
B	8/8	2/8	4/8	2/8
C	0/10	0/10	0/10	0/10
D	0/10	0/10	0/10	0/10

Tabla 6. Resultados de las técnicas diagnósticas de calcoflúor white y azul de tricromo modificada en heces y orina.

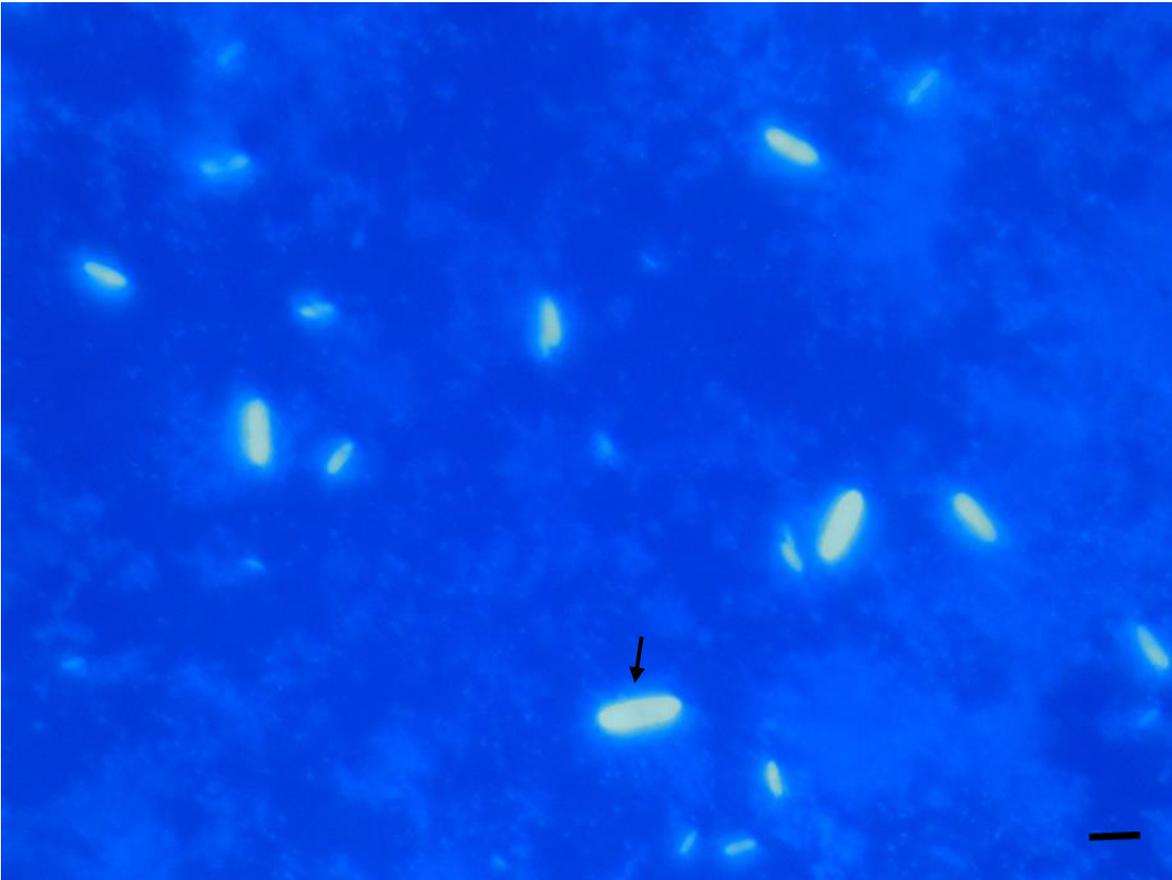


Figura 6. Espora de *Encephalitozoon cuniculi* (flecha) en muestra de heces teñida con la técnica calcoflúor white en los animales del grupo A. 100X. Barra = 5 μ m.



Figura 7. Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (flecha) en la muestra de orina teñida con calcoflúor white del grupo A. 100X. Barra = 5 μ m.

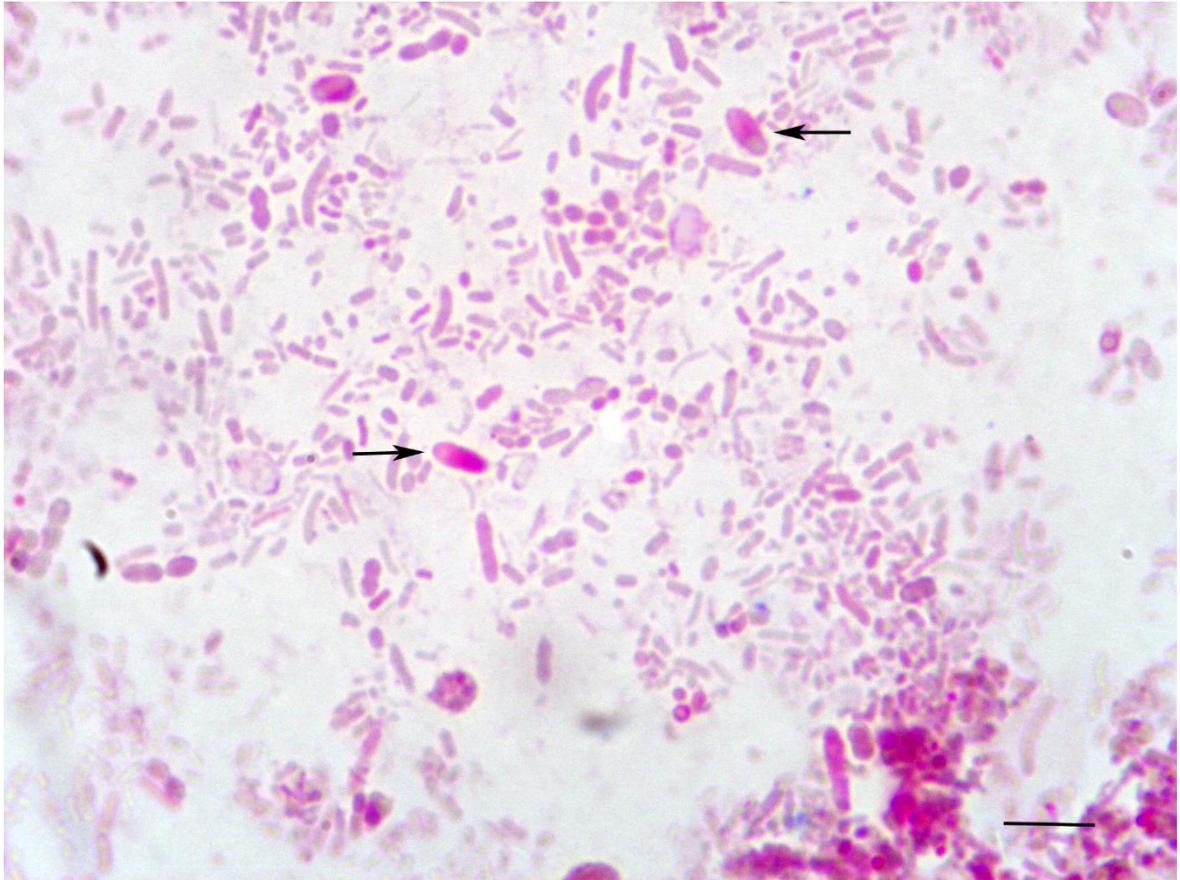


Figura 8. Espora de *Encephalitozoon cuniculi* (flechas) en muestra de heces teñidas con la técnica de azul de tricromo modificada en conejos del grupo A. 100X. Barra = 10µm.



Figura 9. Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (flecha) en la muestra de orina teñida con azul de tricromo en conejos del grupo A. 100X. Barra = 5 μ m.

4. 4. Histoquímica

4. 4. 1. Tinción Hematoxilina y Eosina (HE)

Esta tinción es considerada de rutina para reconocer lesiones en órganos incluidos en parafina. Las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* podrían confundir el diagnóstico con quistes parasitarios u otros microorganismos. Esta tinción se pudiera sugerir una vez que al animal sospechoso se le hubiera confirmado el diagnóstico de la presencia de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en heces u orina con las tinciones anteriormente recomendadas de calcoflúor white o azul de tricromo modificada con la finalidad de observar la respuesta inflamatoria granulomatosa y fibrosa. La morfología de las esporas se observó sutilmente basófilas y transparentes (Figura 10).

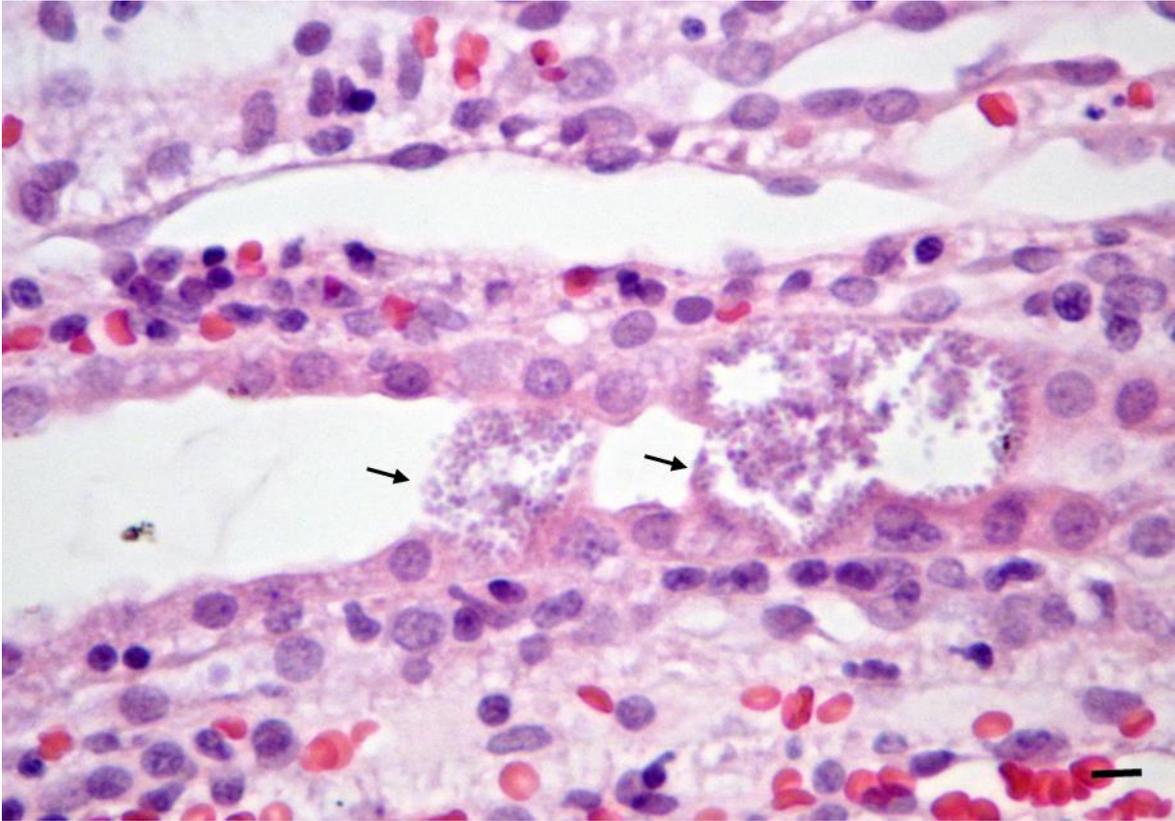


Figura 10. Riñón. Grupo A. Las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* se observaron ligeramente basófilos, transparentes y con mala definición (flechas). HE. 40X. Barra = 20 μ m.

4. 4. 2 Tinción de Azul de Tricromo

En esta tinción la morfología de las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* se observaron de forma ovoide o redondas de color acidófilo. En la parte interna de las esporas se alcanzó a apreciar la porción oscura (polaroplasto) y la porción clara (vacuola posterior) y el típico cinturón (tubo polar) en el plano ecuatorial de la espora. En el fondo del tejido no se tiñó uniformemente (Figura 11).

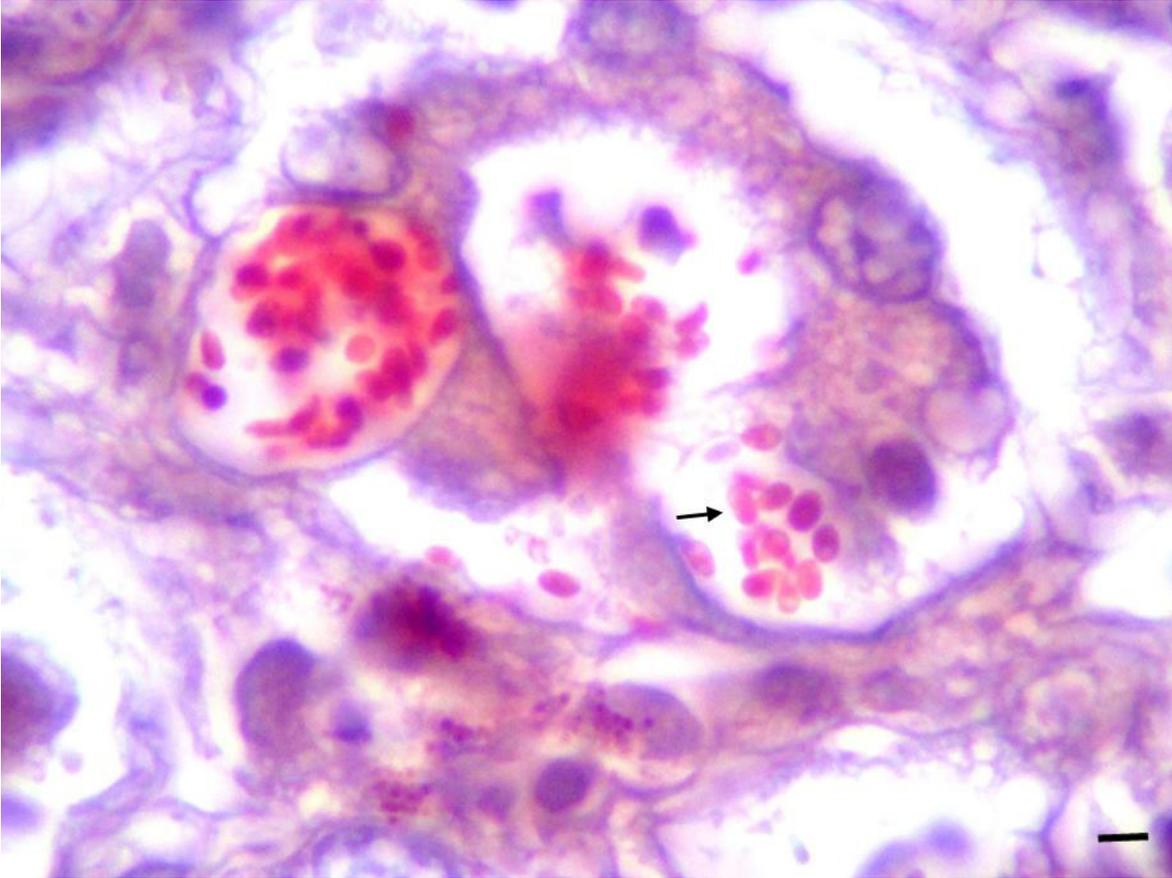


Figura 11. Riñon. Grupo A. Las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* se aprecian como estructuras ovoides eosinofílicas y el típico cinturón en el plano ecuatorial de la espora (flecha). Azul de tricromo. 100X. Barra = 10 μ m.

4. 4. 3. Tinción de Reacción de Ácido Peryódico de Schiff (PAS)

Esta tinción tiñe a los núcleos de color rojo y a las membranas basales de color rojo a púrpura. Aquí las esporas se apreciaron con escasa definición, ligeramente basófilos y transparentes, no se observaron las estructuras de la morfología interna de la espora. El fondo del tejido se observó de tono eosinófilo y se apreció fácilmente la lámina basal de los túbulos renales. Aunque, las esporas se pudieran confundir con otros artificios. Esta técnica no se considera adecuada para el diagnóstico de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (Figura 12).

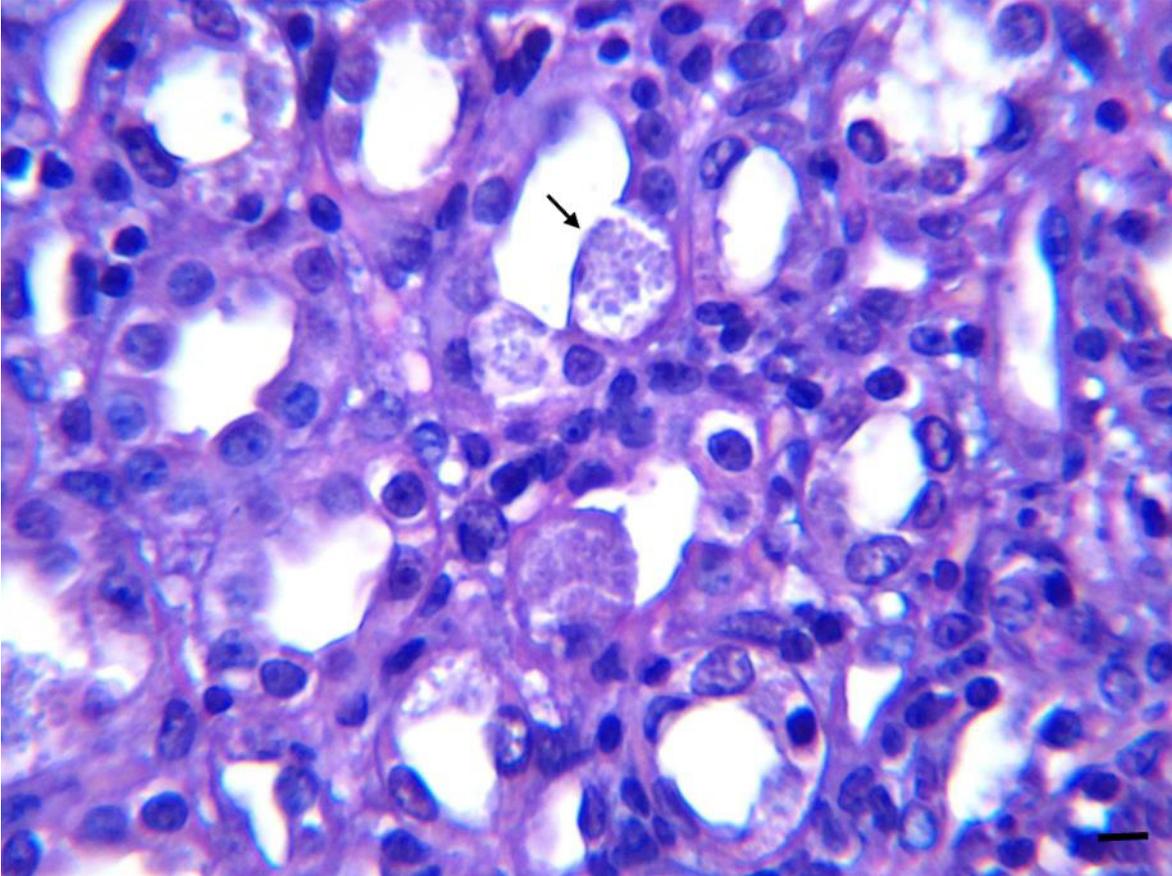


Figura 12. Riñón. Grupo A. Las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* se observan como estructuras redondas, basófilas, con mala definición y transparentes (flecha). La lámina basal de los túbulos renales se aprecian claramente. PAS. 40X. Barra = 10 μm .

4. 5. Cuantificación de ARN mensajero

4. 5. 1. Expresión diferencial de las interleucinas pro-inflamatorias en riñón y en cerebro

4. 5. 1. 1. Factor de Necrosis Tumoral - alfa

Los resultados obtenidos en la expresión de la citocina pro-inflamatoria TNF- α , manifestó diferencia en la expresión en los grupos A, B y C en el riñón en comparación con el grupo D. En donde el grupo A (infectado naturalmente), el TNF- α se expresó 2.9 más veces. En el grupo B (inmunosuprimido e infectado naturalmente con *Encephalitozoon cuniculi*), se expresó 6.1 más veces y en el grupo C (inmunosuprimido) se presentó 1.8 más veces en comparación con el grupo D, normalizador. Sin embargo, el tejido renal de animales inmunosuprimidos e infectados (Grupo B) se observa una diferencia significativa ($p \leq 0.001$) con el grupo control.

Mientras que en el cerebro no existen diferencia significativa ($P > 0.05$) de la expresión de TNF- α entre los grupos tratados (A y B) y los controles (C and D) (Figura 13).

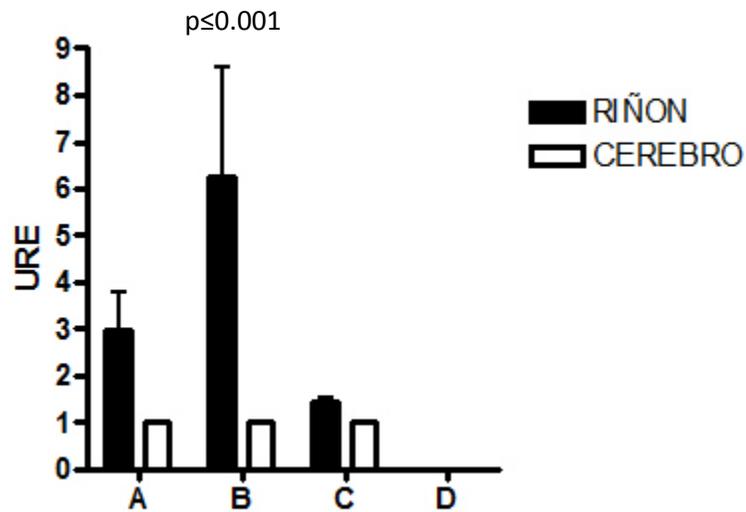


Figura 13. La expresión del TNF- α en los grupos experimentales. En el riñón se observa una diferencia significativa $p \leq 0.001$ del grupo B en comparación con el resto de los grupos (A, C y D). En el cerebro no existe diferencias $p \geq 0.05$ entre los grupos.

4. 5. 2. Expresión diferencial de las interleucinas anti-inflamatorias en riñón y en cerebro

4. 5. 2. 1. Interleucina - 4

Se cuantificó la expresión de ARNm de la IL - 4, involucrada en procesos anti-inflamatorios expresándose en los riñones de los grupos experimentales de la siguiente manera: para el grupo A, se expresó 3.1 más veces que el grupo B se presentó 6.0 más veces, en el grupo C y la expresión fue de 4.4 más veces en comparación con el grupo D, normalizador.

La expresión la IL-4 en el cerebro fue de 5.5 más veces del grupo A y 5.0 más veces para el grupo B y 5.1 más veces para el grupo C en relación al grupo D, control. Tanto en el riñón como en el cerebro no existen diferencia significativa ($P \geq 0.05$) la expresión de IL-4 entre los grupos tratados (A y B) y los controles (C and D) (Figura 14).

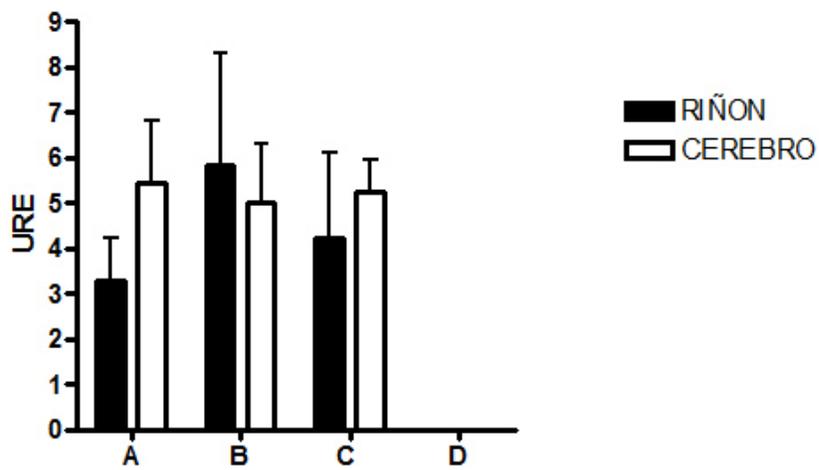


Figura 14. Expresión de IL-4. No existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en la expresión en riñón y cerebro de los grupos experimentales.

4. 5. 2. 2. Interleucina - 10

Se ponderó la expresión del ARNm de la IL-10 involucrada en los procesos anti-inflamatorios del riñón y no presentaron diferencia significativa $p \geq 0.05$ entre los grupos experimentales. Mientras tanto en el cerebro, el grupo A presentó 2.5 veces más de cticina, el grupo B se expresó 4.3 más veces, mientras que en el grupo C la se manifestó 2.9 más veces comparados con el grupo control.

El grupo B inmunosuprimido con infección natural con *Encephalitozoon cuniculi* presentó una diferencia significativa de $p \leq 0.01$ comparado con el grupo A infectado y los grupos C y D no infectados (Figura 15).

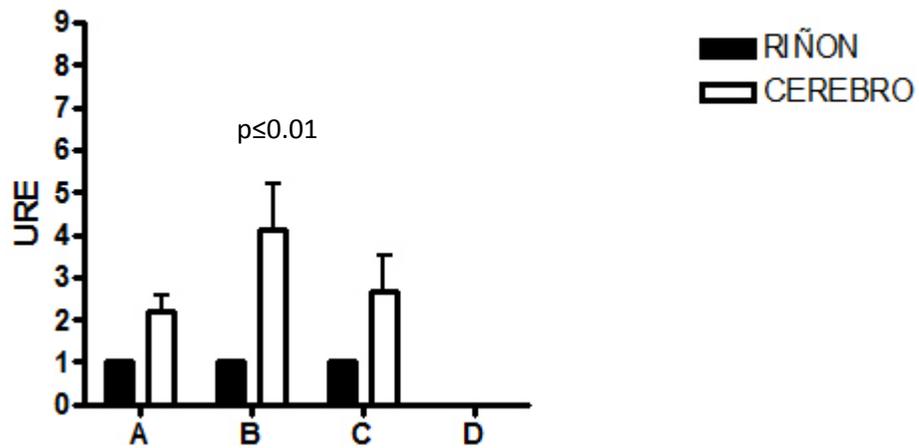


Figura 15. Expresión de IL - 10. No existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) de la expresión en el riñón entre los grupos experimentales. En el cerebro, el grupo B presenta una diferencia significativa de $p \leq 0.01$ en comparación con los otros grupos experimentales (A, C y D).

4 .6. Inmunohistoquímica para el análisis del conteo de células apoptóticas con la técnica de TUNEL

Al aplicar la técnica de TUNEL en los órganos de riñón y de cerebro de los grupos A y B se detectaron fragmentos de ADN nuclear resultando positiva la observación de células apoptóticas, mientras que en los grupos C y D tanto en el riñón como en el cerebro la observación de dichas células fue negativo. La validación de la técnica se realizó con el control negativo del intestino y el control positivo del timo (Figura 16).

Los animales infectados naturalmente con *Encephalitozoon cuniculi* presentaron células apoptóticas tanto en el grupo A como el B de riñón y de cerebro, siendo el grupo B el que mostró un mayor número de células de apoptóticas en el tejido nervioso (Figuras 17 y 18). En el grupo C se presentó una escasa presencia de células apoptóticas tanto en riñón como en cerebro (Figura 19) y en el grupo D no se presentaron células apoptóticas (Figura 20).

El número de células apoptóticas en el riñón de los grupos experimentales no presentaron diferencia significativa ($p \geq 0.05$). Mientras que en el cerebro el grupo B presentó una diferencia significativa de ($p \leq 0.001$) en comparación con el resto de los grupos (A, C y D) (Figura 21).

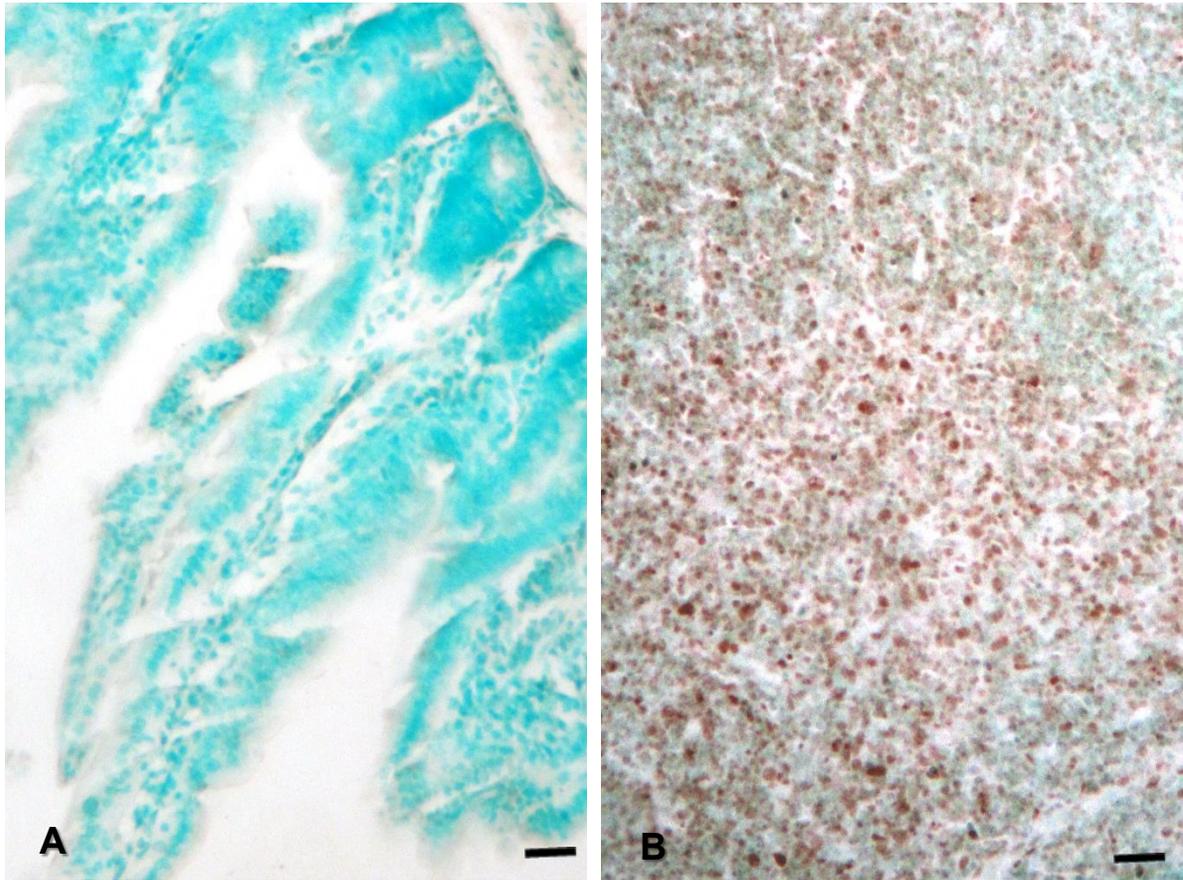


Figura 16. Controles. A. Intestino. Control negativo. **B. Timo.** Control positivo. Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μ m.

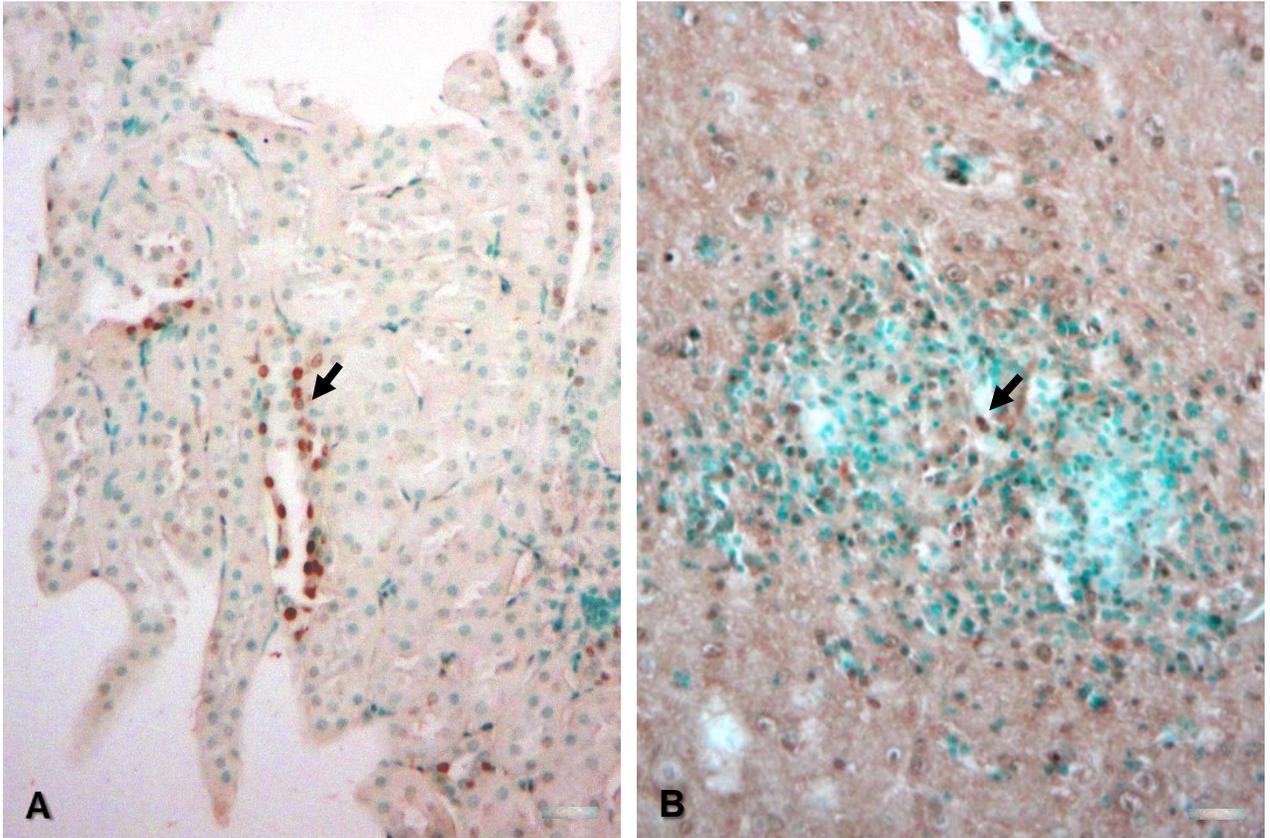


Figura 17. Grupo A. A. Riñón. Se aprecian células positivas a la fragmentación de la cromatina (flecha). **B. Cerebro.** Se reconocen células TUNEL positivas (flecha). Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μ m.

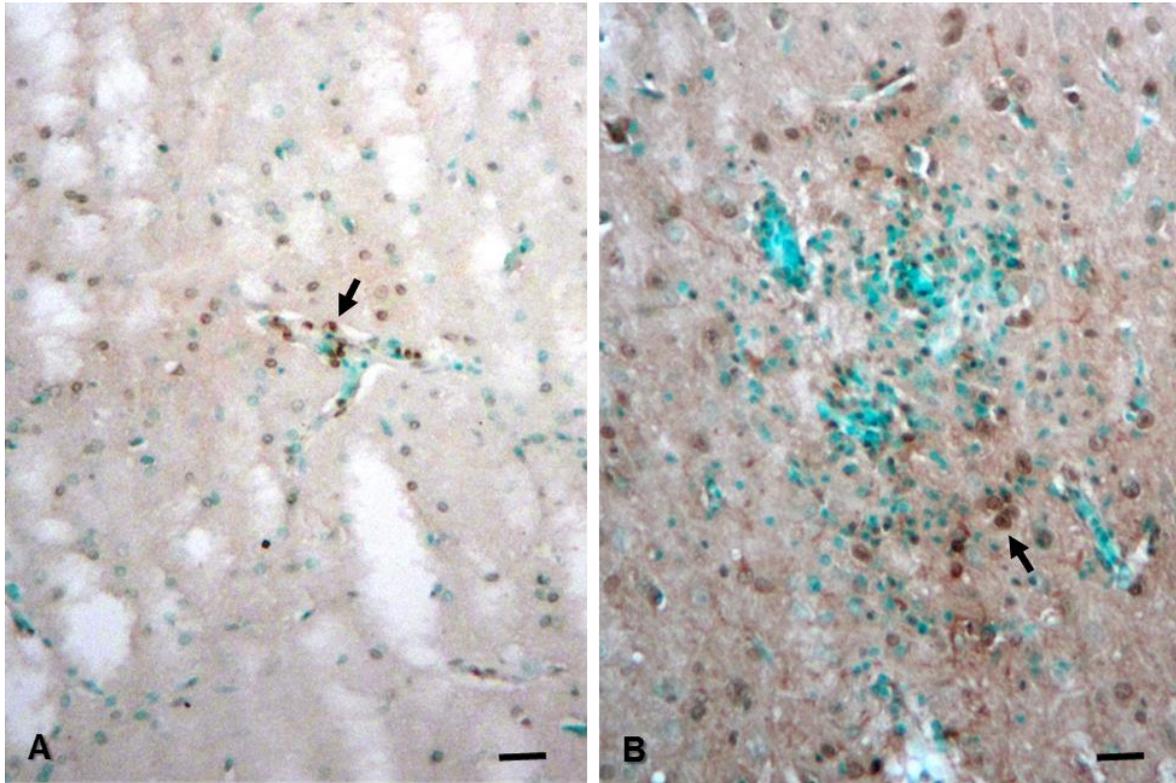


Figura 18. Grupo B. A. Riñón. Presencia de células positivas a la fragmentación de la cromatina (flecha). **B. Cerebro.** Células TUNEL positivas (flecha). Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μm .

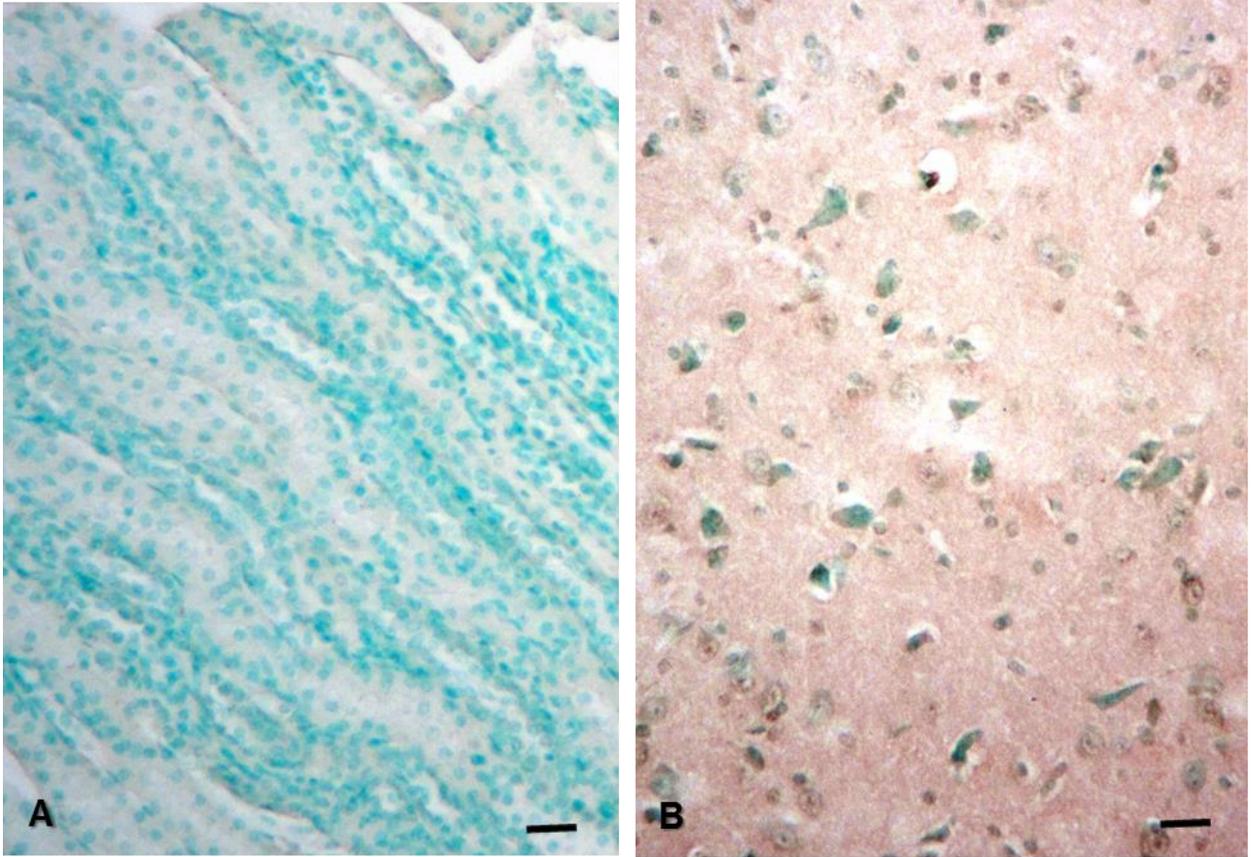


Figura 19. Grupo C. A. Riñón y B. Cerebro. Se observan células TUNEL negativas. Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μ m.

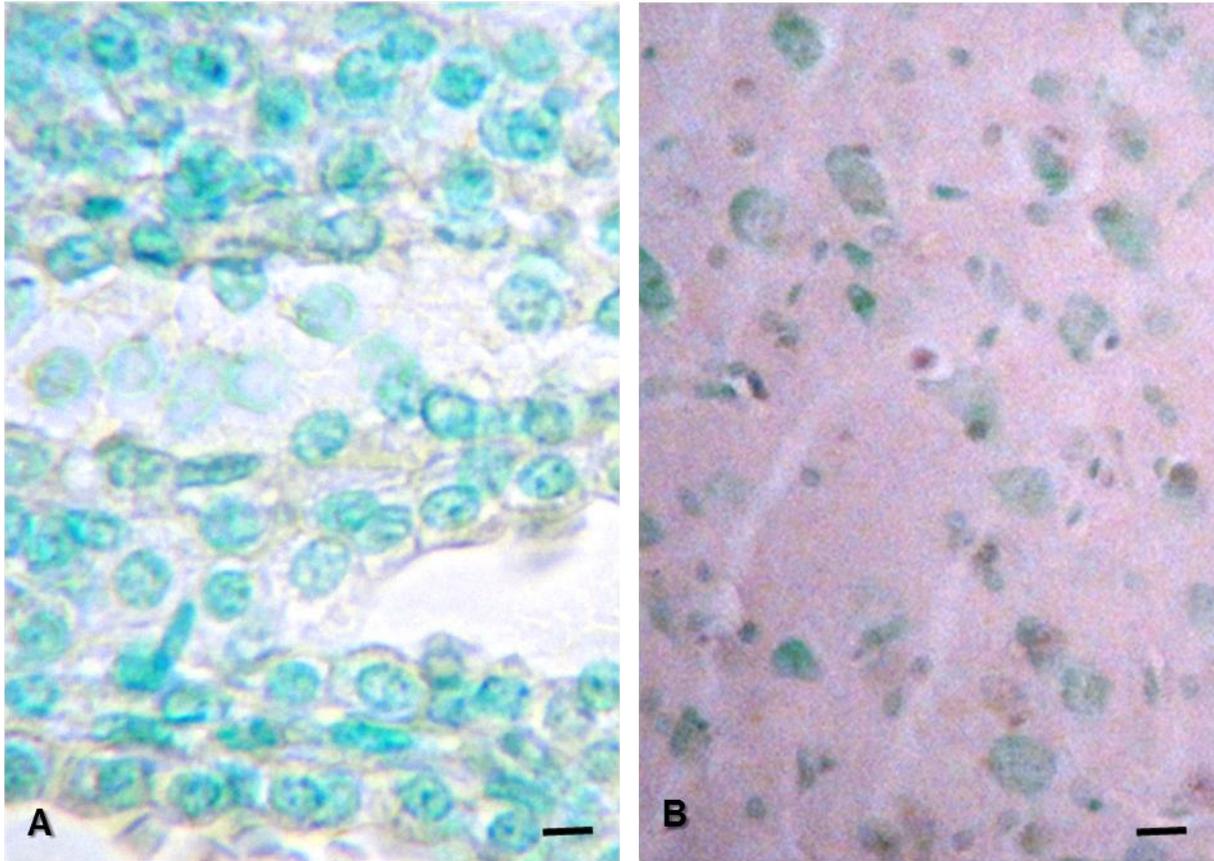


Figura 20. Grupo D. A. Riñón y B. Cerebro. Se aprecian células TUNEL negativas. Técnica de TUNEL. 10X. Barra = 20 μ m.

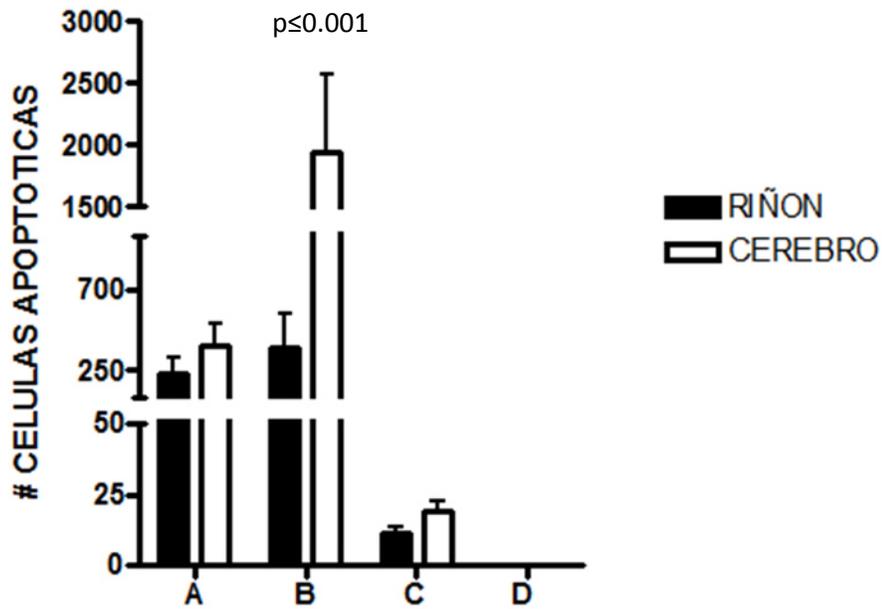


Figura 21. Células apoptóticas en los grupos experimentales. En el riñón no presentó diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre los grupos. En el cerebro, el grupo B presentó diferencia significativa ($p \leq 0.001$) en comparación con el resto de los grupos.

4. 7. Producción de Óxido Nítrico (ON)

La concentración de nitritos para el cerebro fue de $30.00 \pm 1 \mu\text{M}$ para el grupo A, de $15.00 \pm 3 \mu\text{M}$ para el grupo B y de $1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ para los grupos C y D. En el caso del riñón la concentración fue de $68 \pm 10 \mu\text{M}$ para los grupos A y B y de $1 \pm 0.2 \mu\text{M}$ para los grupos C y D.

En el riñón el grupo A muestra una diferencia estadística de $p \leq 0.05$, comparado con los grupos, mientras que en el cerebro el grupo B muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$), comparándolo con el resto de los grupos (A, C y D) (Figura 22).

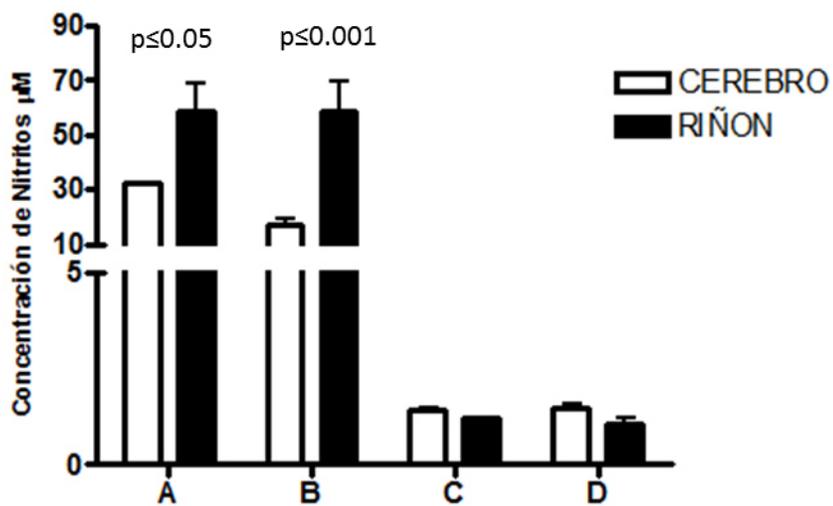


Figura 22. Producción de óxido nítrico en riñón y cerebro de los grupos experimentales. Los datos representan la media \pm SD de las determinaciones por triplicado. El grupo A en cerebro muestra una diferencia estadística de $p \leq 0.05$; y el grupo B, en riñón se observa una diferencia estadística de $p \leq 0.01$ en comparación con el resto de los grupos.

5. DISCUSIÓN

El *Encephalitozoon cuniculi* provoca en conejos una infección persistente, que suele ir acompañada de una inflamación granulomatosa grave, fibrosis en el cerebro y los riñones (Csokai *et al.*, 2010). Se considera como una enfermedad zoonótica y emergente que puede afectar tanto a individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos (Ghosh *et al.*, 2011). Aunque los lagomorfos son los huéspedes naturales de este microsporidio, la mayoría de los estudios sobre la expresión de citocinas, la apoptosis y el estallido respiratorio causado por la infección de *Encephalitozoon cuniculi* se ha enfocado generalmente tanto en modelos de roedores *in vivo* como *in vitro* (Didier E. S, 2014). Actualmente, se sabe poco sobre la inmunobiología de conejos con encefalitozoonosis y los estudios que implican el estado inmunológico de conejos infectados con este microsporidio son escasos. En este estudio, se determinó la expresión génica de TNF- α , IL-4 e IL-10, así como la apoptosis y la respuesta de óxido nítrico en conejos inmunocompetentes e inmunosuprimidos naturalmente infectados con *Encephalitozoon cuniculi*, lo cual proporciona una indicación de la importancia del papel de la respuesta inmune del huésped en la prevención o eliminación de la encefalitozoonosis. En esta investigación se propusieron cuatro grupos para el diseño experimental: el grupo A, conejos con la infección de *Encephalitozoon cuniculi* adquirida naturalmente, en el grupo B los animales inmunosuprimidos representaban una infección microsporidiana oportunista, el grupo C con animales inmunosuprimidos y los animales controles representaban al grupo D. El TNF- α es una citocina dependiente de Th1 que mejora la actividad de las citocinas pro-inflamatorias

mediadas por células inmunitarias (Broere *et al.*, 2011). Se produce principalmente por los macrófagos en respuesta a patógenos intracelulares, incluyendo *Encephalitozoon cuniculi* (Valencakova *et al.*, 2012), aunque las células centinelas, como los mastocitos y las células dendríticas también producen esta citocina pro-inflamatoria (Kallioliias *et al.*, 2016). TNF- α también estimula la producción de otros mediadores inflamatorios, como el óxido nítrico. La investigación sobre la producción de TNF- α en infecciones microsporidias es escasa (Valencakova *et al.*, 2012), y su papel durante encefalitozoonosis en conejos es desconocido. La mayoría de los estudios sobre la producción de TNF- α en infecciones microsporidias se han realizado principalmente utilizando modelos *in vitro*. Por ejemplo, se informó un aumento en los niveles de esta citocina en sobrenadantes de monocitos derivados de macrófagos humanos desafiados con esporas de *Encephalitozoon* (Franzen *et al.*, 2005). En el presente estudio, esto podría indicar que las esporas infectivas activaron los macrófagos para generar la producción de cantidades significativas de TNF- α en los riñones de conejos infectados de los grupos A y B, en comparación con el TNF- α producido en el cerebro de los mismos grupos. La razón de esto es desconocida, pero se sugiere que durante la infección del cerebro de *Encephalitozoon cuniculi*, se podrían generar citocinas anti-inflamatorias, como IL-4 e IL-10, para controlar la respuesta inmunitaria celular bloqueando la citocina pro-inflamatoria TNF- α , tal como se informó por Braunfuchsova *et al.* (Braunfuchsova *et al.*, 1999). Sin embargo, estos autores realizaron su investigación en ratones inmunocompetentes, y en nuestro estudio se informó un aumento de TNF- α en la expresión de ARNm en conejos

inmunosuprimidos e infectados. Probablemente el ambiente inmunológico del cerebro produjo un estado inmunosupresor por citocinas reguladoras como IL-4 e IL-10, con el fin de protegerlo de la severa reacción inflamatoria causada por este microsporidio. Además, puede plantearse la hipótesis de que este patógeno podría modular la respuesta inmune en el cerebro al impedir su depuración por los macrófagos, promoviendo su persistencia en el cerebro, como ocurre en las infecciones por *Leishmania spp.* y *Toxoplasma gondii* (Bogdan *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2002). Contrariamente a lo que se informa en la literatura (Jeklova *et al.*, 2008), los niveles de TNF- α en los riñones de animales inmunosuprimidos e infectados del grupo B, fueron significativamente mayores en comparación con los conejos inmunocompetentes infectados del grupo A. Esto es interesante, ya que los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides se han demostrado tanto *in vivo* como *in vitro* en modelos murinos desafiados con esporas de microsporidio (Lallo *et al.*, 2002). El efecto inhibitor de dexametasona en conejos se demostró por la proporción reducida de conteos de linfocitos / monocitos en los grupos B y C. Sin embargo, los conteos de granulocitos permanecieron sin ningún cambio en los mismos grupos. Se conocen los efectos inhibitorios sobre la actividad de las células T cuando los glucocorticoides se administran en roedores (Al Sadi *et al.*, 2014); sin embargo, un efecto opuesto de los corticosteroides en conejos fue sugerido previamente (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). Dado que la susceptibilidad a dexametasona varía considerablemente según el modelo estudiado, las especies animales se clasifican como resistentes o sensibles a corticosteroides (Jeklova *et al.*, 2008), y los conejos parecen pertenecer al primer modelo. Por lo tanto, las

variables experimentales, como la dosis y las vías de administración, deben tenerse en cuenta al utilizar corticosteroides en el futuro. La IL-4 e IL-10 son citocinas provenientes de Th2 que promueven respuestas inmunes inmediatas no inflamatorias y están implicadas en la regulación de citocinas Th1 durante las enfermedades infecciosas (Khan *et al.*, 2004). En nuestro estudio, el ARNm para IL-4 fue detectable tanto en el cerebro y tejido renal de conejos infectados en los grupos A y B; aunque era significativamente más alta en los riñones de los animales del grupo B. Esto contrasta con la literatura, donde se ha informado una mínima respuesta de citocinas Th2 en sueros de ratones infectados con *Encephalitozoon cuniculi* (Khan *et al.*, 1999). El perfil de IL-4 en el tejido cerebral del conejo se mantuvo sin variación en los grupos A, B y C. El aumento de la expresión de IL-4 en los riñones podría sugerir un perfil de citocinas Th2 en conejos infectados, Sin embargo, fue mayor cuando dexametasona estuvo presente. Contrariamente a lo que se espera (Salat *et al.*, 2001), dexametasona parece inducir la expresión de IL-4 en conejos, ya que los animales del grupo C tratados con dexametasona, también expresó un mayor perfil de IL-4 en ausencia de infección. Esto confirmó que los conejos inmunosuprimidos con dexametasona, en presencia de *Encephalitozoon cuniculi*, generaron un mayor perfil de Th2. Esta es la primera vez que los perfiles de IL-4 se informan directamente de tejidos cerebrales y renales que contienen granulomas y esporas de conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi*. Parece que la IL-4 tiene un importante papel inmunorregulador durante la infección y modulación en la producción de TNF- α , y en el caso de la IL-4 modula la respuesta inmune inactivando a los macrófagos y evitando que éstos eliminen a las esporas

(Khan *et al.*, 2004). Esto se confirmó observando esporas intactas de *Encephalitozoon cuniculi* dentro de macrófagos en granulomas del cerebro y de los riñones. La IL-10 es producida por células Th2, pero también a partir de células NK, células dendríticas y células M2 / microgliales (Broere *et al.*, 2011), las cuales también podrían estar participando en la respuesta granulomatosa de *Encephalitozoon cuniculi* (Didier *et al.*, 2014). La importancia de esta citocina durante la infección microsporidiana no está bien entendida (Koudela *et al.*, 1993). En este estudio, la expresión de IL-10 se demostró principalmente en el cerebro de los conejos tanto en los grupos A, como en los del grupo B. La expresión aumentada de IL-10, como citocina inmunoreguladora, en el tejido cerebral explicaría la baja expresión de TNF- α en estos mismos grupos en comparación con la expresión de IL-10 en los riñones, que permaneció casi sin ser detectada. Esto coincide con una investigación previa, donde en un ambiente permisivo, la IL-10 expresada por Th2, y posiblemente M2 (Martínez *et al.*, 2014), se incrementa y se correlaciona con la infección de microsporidia (Mathews *et al.*, 2009). Quizás las células microgliales son polarizadas para convertirse en células M2 bajo la influencia de la IL-4 (Cherry *et al.*, 2014). Por lo tanto, las células M2 junto con las células Th2 probablemente secretan niveles altos de IL-10 observados en el cerebro de conejos infectados. Algunos autores sugieren que las células M2 / microgliales parecen ser más protectoras que las células M1 / microgliales, lo que podría favorecer un entorno hostil para la reparación cerebral (X. Hu *et al.*, 2015). Con respecto a los riñones, sugerimos que la baja expresión de IL-10 en este órgano se debió a la alta expresión de TNF- α observada en los conejos de los grupos A y B. Es probable que las células

mesangiales segregaran esta citocina ya que se ha informado que estas células están implicadas en infestaciones parasitarias, como *Taenia crassiceps* y *Toxoplasma gondii* (Liu, *et al.*, 2014). Para explicar el papel de la IL-4 y la IL-10 durante la infección por *Encephalitozoon cuniculi*, se propusieron tres posibles hipótesis: 1). El papel regulador de la IL-4 e IL-10 protege el cerebro, como ambiente permisivo de infección, de una reacción inflamatoria perjudicial (X. Hu *et al.*, 2015). En los riñones, los macrófagos experimentan un cambio de un fenotipo trófico, propenso a la curación renal a un fenotipo pro-inflamatorio, que apoyan la formación del granuloma (Lee *et al.*, 2011), 2). Las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* modulan el estado inmunológico, favoreciendo las células Th2 que producen IL-4 y a las células Th2 / M2 que producen IL-10 en el tejido cerebral para evitar su eliminación del huésped, y 3). Aparentemente, tanto la IL-4 como IL-10 controlan la respuesta inmune celular en el cerebro, mediante el bloqueo de TNF- α . Por lo tanto, las citocinas IL-4 e IL-10 pueden prevenir la diseminación inicial de *Encephalitozoon cuniculi* en el cerebro por la microglia, como ocurre con otros parásitos intracelulares, como *Leishmania* y *Toxoplasma* (Dupont *et al.*, 2012; Buxbaum *et al.*, 2015). La razón por la que la expresión de IL-10 permanece baja en los riñones podría explicarse por la alta expresión de su antagonista TNF- α producido por los macrófagos en el mismo tejido. Tal vez, el tratamiento con glucocorticoides podría haber alterado el equilibrio entre las subpoblaciones de células de Th1 / Th2 (Martínez *et al.*, 2014). Si esto ocurriera, una respuesta Th1 probablemente prevalecería en los riñones (Rodríguez-Tovar, *et al.*, 2016). Además, las células Th1 presentes en la reacción granulomatosa renal podrían

generar la expresión de TNF- α , promoviendo y potenciando el papel regulador de la IL-10. Es necesaria una investigación adicional para elucidar los fenotipos de macrófagos que participan en los granulomas del cerebro y riñones de conejos infectados experimentalmente y naturalmente con *Encephalitozoon cuniculi*. La apoptosis es un importante mecanismo de defensa que las células infectadas emplean para controlar y limitar la proliferación de patógenos intracelulares en la inmunidad innata y específica (del Águila *et al.*, 2006). Sin embargo, los parásitos también pueden inducir la apoptosis inhibiendo o induciendo este proceso, permitiéndoles crecer y propagarse a través del huésped (Martin-Hernández *et al.*, 2017). En este estudio, se empleó la técnica TUNEL, ya que se ha sugerido como un enfoque recomendado para evaluar tanto la apoptosis temprana y tardía en las células individuales (Powell *et al.*, 2014). El conocimiento sobre microsporidios induciendo la apoptosis en vertebrados es muy limitado y la mayor parte de la información sobre la apoptosis proviene de estudios *in vitro* e *in vivo* en artrópodos y peces (Martínez-Hernández *et al.*, 2017; Lovy *et al.*, 2007). Estudios *in vitro* han demostrado que la microsporidia puede inhibir el mecanismo de apoptosis e incluso puede interrumpir el ciclo de la célula huésped normal, mediante la introducción de G0 (Scanlon *et al.*, 2000). Resulta en la activación de una compleja cascada de caspasas que finalmente termina con la muerte de la célula (Elmore *et al.*, 2007; Bhadra *et al.*, 2014). En este estudio, la causa de la apoptosis no fue discernible y se desconoce que haya sido causada por la respuesta inmune del huésped o por el agente infeccioso de *Encephalitozoon cuniculi*, que pudiera estar participando directamente en la activación de la apoptosis. Sin embargo, se puede sugerir que

podría relacionarse con TNF- α , como se sugiere para otros patógenos (Navarre *et al.*, 2000) ya que el aumento de la expresión de TNF- α y el alto número de TUNEL positivas que se observaron dentro y cerca de granulomas en el cerebro y los riñones. Las implicaciones de esto no son claras, pero sugiere el inicio de procesos apoptóticos de tejido celular dentro de los granulomas. El fenotipo de las células mononucleares que expresan reactividad a TUNEL no se pudieron distinguir y debe estudiarse más. Sin embargo, en un estudio se informó que en ratones oralmente desafiados con esporas viables de *Encephalitozoon cuniculi*, la apoptosis se reconoció en células CD8+ (Bhadra *et al.*, 2014). Nuestros resultados sugieren un aumento en la tasa de apoptosis y coinciden con otro estudio en el que células apoptóticas positivas se observaron dentro de los xenomas (Powell *et al.*, 2014). Se necesitan más estudios *in vivo* para obtener información sobre los mecanismos que activan la apoptosis en conejos infectados por *Encephalitozoon cuniculi*. Sin embargo, se puede sugerir que el TNF- α expresado en los tejidos activó el mecanismo apoptótico en conejos infectados. Este es considerado el primer estudio que informa la activación de la apoptosis en un modelo animal naturalmente infectado usando la técnica TUNEL. Se sabe que el óxido nítrico (ON) es citotóxico para algunas bacterias intracelulares, hongos y parásitos protozoarios (He *et al.*, 1996). Es enzimáticamente generado por la ON sintasa dentro de las células fagocíticas por la transformación de la L-arginina, oxígeno molecular y NADPH en ON y L-citrulina (Gaston *et al.*, 2002). Los productos estables finales son los nitritos (NO₂) y los nitratos (NO₃). La reacción de Griess cuantifica los NO₂ como una medida de la producción de ON en la susceptibilidad de los macrófagos a la

apoptosis se demostró que mediante el uso de un método de apoptosis basada en fluorescencia en fibroblastos pulmonares en humanos infectados con *Nosema algerae* (Scanlon *et al.*, 1999). Además, se observó una supresión de la apoptosis en macrófagos THP-1 cuando se infectaron con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi* (Didier *et al.*, 2016). Sin embargo, se observó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en el número de células apoptóticas en conejos infectados con *Encephalitozoon cuniculi* del grupo A tanto en riñón como en cerebro en los granulomas de animales. En el grupo B (conejos inmunosuprimidos e infectados naturalmente) tanto riñón como el cerebro presentaron una diferencia estadística de $p \leq 0.01$. Nuestro estudio contrasta con estudios *in vitro* sobre la activación de la apoptosis en células Vero-E6 infectadas con *Encephalitozoon cuniculi* y *Encephalitozoon intestinalis*, donde se demostró que la vía apoptótica p53 estaba alterada (del Águila *et al.*, 2006), lo que sugiere que en regulación de la apoptosis por estos microsporidios, varios mecanismos pueden iniciar la apoptosis, tales como el estrés oxidativo celular, la irradiación, la quimioterapia contra el cáncer, las vías dependientes de p53, la unión a los ligandos de muerte (Fas, TNF α R, DR3, DR4 y DR5) (Bryan *et al.*, 2007). Los presentes resultados sugieren que la producción de ON se genera en los grupos A y B, pero son significativamente mayores en el grupo B en riñón y cerebro que en el grupo A, también en ambos órganos, comparándolos con el resto de los grupos. Este aumento en los niveles de ON en los conejos infectados contrasta con estudios *in vitro* en donde las esporas de microsporidios viables no indujeron una respuesta de óxido nítrico en los macrófagos humanos derivados de monocitos desafiados con *Encephalitozoon cuniculi* (Franzen *et al.*, 2005). Sin embargo, nuestros resultados coincidieron con

una investigación *in vitro* en donde los niveles de NO₂ fueron estadísticamente significativos en los sobrenadantes de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c expuestos a esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi* (Didier, *et al.*, 2010). La inducción de ON en los macrófagos requiere TNF- α y otras citocinas, como INF- γ , ya que ambas citocinas pro-inflamatorias son importantes en la defensa contra los patógenos intracelulares, favoreciendo su fagocitosis y la depuración intracelular (Hibbs *et al.*, 2002). En este sentido, se informó de un aumento de los niveles de TNF- α principalmente en los riñones, lo que corresponde con el aumento de la producción de ON en los mismos órganos. Esto indica un papel importante de los macrófagos en la fagocitosis y muerte de esporas viables de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos. Es probable que también INF- γ está contribuyendo a la producción de ON, ya que se informó previamente en los sueros de conejos naturalmente infectados con *Encephalitozoon cuniculi* (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). Interesante, los niveles de IL-4 se incrementaron considerablemente en los grupos A y B, tanto en tejidos cerebrales como renales, lo que sugiere un mecanismo por el cual las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* podrían inducir una respuesta inmunomoduladora ON, permitiendo su supervivencia dentro de las células fagocíticas. Sin embargo, la modulación precisa de la respuesta de ON por *Encephalitozoon cuniculi*, así como el papel regulador de la IL-4 y la IL-10 con respecto al TNF- α en conejos infectados sigue siendo poco claro. Actualmente, el conocimiento sobre la regulación de la producción de ON es todavía incompleto y contradictorio. En algunos experimentos, las esporas microsporidianas indujeron una respuesta de ON en cultivos celulares (Choudhry *et al.*, 2009), mientras que en otros estudios demostraron que la eliminación de las esporas de *Encephalitozoon*

cuniculi no depende de la inducción de ON (Jelínek *et al.*, 2007). La mayoría de los estudios de ON se derivan de modelos *in vitro* y en algunas especies como ratas, sigue siendo desconocido. Podría ser que diferentes fenotipos de macrófagos (M1 y M2) participan en el daño renal y la curación, mediante la secreción de diferentes citocinas (Lee *et al.*, 2011). Del mismo modo, un mecanismo de síntesis de ON propuesto en el cerebro de conejos es que los niveles más bajos de TNF- α en este tejido podrían indicar una actividad baja de macrófagos debido a los efectos reguladores de IL-4 e IL-10. Como se explica en la producción de TNF- α mecanismo anterior, esto podría resultar en la polarización de M1 a M2 microglia, lo que resultaría en una baja generación de ON y la producción de IL-10 en los grupos infectados (Hu *et al.*, 2015).

6. CONCLUSIONES

Una regulación de la respuesta inmune se describe por primera vez en conejos naturalmente infectados con *Encephalitozoon cuniculi*. La infección por *Encephalitozoon cuniculi* promueve la expresión de diferentes perfiles de citocinas de acuerdo con el estado inmunológico de los animales. El TNF- α se expresa principalmente en los riñones de conejos infectados, con mayores niveles de esta citocina en el grupo que recibió tratamiento con corticosteroides (grupo B). Esto puede ser paralelo a la respuesta del óxido nítrico en el mismo órgano del mismo grupo de animales, lo que sugiere que la eliminación de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en los riñones es inducida por TNF- α . La evidencia estadística presentada sugiere que al menos en conejos naturalmente infectados, la IL-4 se expresa sin diferencias estadísticas tanto en el cerebro como en los riñones, independientemente del estado inmunológico. Sin embargo, la expresión aumentada de ARNm de IL-10 en el cerebro de conejos infectados indica un control equilibrado de la expresión génica del TNF- α por la respuesta inmune del huésped o por *Encephalitozoon cuniculi*, permitiendo su supervivencia durante la reacción granulomatosa cerebral. Por el contrario, la expresión del TNF- α parece regular la expresión de IL-10 en los riñones. Es plausible sugerir que la inducción de una reacción inflamatoria en el epitelio renal contribuye a aumentar la liberación de las esporas infecciosas de *Encephalitozoon cuniculi* a través de tubos colectores y orina. La encefalitozoonosis indujo células positivas a la técnica de TUNEL en conejos infectados, pero fue más pronunciada en animales inmunosuprimidos e infectados (Grupo B). Esto indica que bajo un efecto inmunosupresor, la infección

por *Encephalitozoon cuniculi* modula la respuesta inmune estimulando la muerte de células mononucleares y/o del parénquima del cerebro, haciéndolas incapaces de controlar la infección por parásitos, y permitiendo que las esporas sobrevivan en éste organo. Asimismo, los niveles de ON se incrementaron en animales infectados con *Encephalitozoon cuniculi*. Sin embargo, los riñones mostraron una mayor concentración. Es posible proponer que el aumento de la modulación de la respuesta de ON por *Encephalitozoon cuniculi* contribuye a la supervivencia del parásito dentro de las células fagocíticas en granulomas por un mecanismo desconocido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann, M. R. Inflammation and Healing. Chapter 3. In: James F. Zachary. (2017). Pathologic Basis of Veterinary Disease. St Louis Missouri: *ELSEIVER*.

Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* .124:783–801.

Al Sadi, H. I. and Al Mahmood, S. S. (2014). Pathology of experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunocompetent and Immunosuppressed Mice in Iraq. *Patholog. Res. Int.* 857036.

Aluja A. S. y Constantino F. C. (2002). Técnicas de necropsia en animales domésticos. Segunda Edición. *Manual Moderno*. ISBN: 9789684269385.

Bacha, W. J. and Bacha, L. M. (2012). Color Atlas of Veterinary Histology. 3rd edition. *Wiley-Blackwell*.

Bancroft, J. D. and Gamble, M. (2004). Theory and Practice of Histological Techniques. Fifth Edition. *Churchill Livingstone*.

Baneux, P. J. and Pognan, F. (2003). *In utero* transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Lab Anim.* 37(2):132-138.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(4):1620-1624.

Bhadra, R. Moretto, M.M. Castillo, J.C., Petrovas, C. Ferrando-Martinez, S. Shokal, U., Leal, M., Koup, R.A. Eleftherianos, I. and Khan, I.A. (2014). Intrinsic TGF-beta signaling promotes age-dependent CD8+ T cell polyfunctionality attrition. *J. Clin. Invest.* 124:2441-2455.

Bogdan, C. and Rollinghoff, M. (1999). How do protozoan parasites survive inside macrophages?. *Parasitol Today.* 15:22-28.

Bogdan, C. (2015). Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* 36: 161–178.

Bohne, W., Bottcher, K. and Gross, U. (2011). The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *Int. J. Med. Microbiol.* 301(5):395-399.

Braiman-Wiksman, L., Solomonik, I., and Spira, R. (2007). Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.* 35:767-779.

Braunfuchsova, P. Kopecky, J., Ditrich, O. and Koudela, B. (1999). Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol.* 46:91-95.

Broere, F., Apasov, F., Sitkovsky, M. V. and van Eden, W. (2011). T cell subsets and T cell-mediated immunity, in: Principles of Immunopharmacology, *Springer Basel.* 15-25.

Bruchhaus, I., Roeder, T., Rennenberg, A. and Heussler, V. T. (2007). Protozoa parasites: programmed cell death as mechanism of parasitism. *Trends Parasitol.* 23: 376 - 383.

Brunet, L. R. (2001). Nitric oxide in parasitic infections. *International Immunopharmacology.* 1:1457–1467.

Bryan, N.S. and Grisham, M.B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43: 645-657

Burgner, D. (1999). Kirk Rockett, Dominic Kwiatkowski Nitric oxide and infectious diseases, *Arch Dis Child.* 81:185 - 188.

Buxbaum, L.U. (2015). Interleukin-10 from T cells, but not macrophages and granulocytes, is required for chronic disease in *Leishmania mexicana* infection. *Infect Immun.* 83:1366-1371.

Cali, A., Takvorian, P. M. (1999). Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: Wittner, M., Weiss, and L. M. Eds. *The Microsporidia and Microsporidiosis.* 1st ed. Washington, D. C. *ASM Press.* 85–128.

Carson, W. F., Ito, T., Schaller, M., Cavassani, K. A., Chensue SW, Kunkel SL. (2011). Dysregulated cytokine expression by CD4+ T cells from post-septic mice modulates both Th1 and Th2-mediated granulomatous lung inflammation. *PLoS One.* 6:5.

Chakraborty, R., Mukherjee, S. and Basu, M.K., (1996). Oxygen-dependent leishmanicidal activity of stimulated macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 154:23 – 27.

Cherry, J.D., Olschowka, J.A. and O'Banion, M.K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed, *J. Neuroinflammation.* 11:98.

Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 15(3), 532.

Choudhry, N., Korbil, N., Zaalouk, T. K., Blanshard, C., Bajaj-Elliott, M. and McDonald, V. (2009). Interferon-g-mediated activation of enterocytes in immunological control of *Encephalitozoon intestinalis* infection. *Parasite Immunol.* 31: 2-9.

Csokai J., Gruber A., Kunzel F., Tichy A., and Joachim A. (2008). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitol Res.* 54: 679- 704.

Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A. and Joachim, A. (2009). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) : pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology Research.* 104(3): 629–635.

Csokai J. and Kunzel, F. (2010) *Encephalitozoon cuniculi* Infektion bei Kaninchen. *Der Praktische Tierarzt.* 91:854–868.

Del Águila C., Moura H., Fenoy S., Navajas R., Lopez-Velez R., and Li L. (2001). *In vitro* culture, ultrastructure, antigenic, and molecular characterization of *Encephalitozoon cuniculi* isolated from urine and sputum samples from a Spanish patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 39(3):1105-1108.

Del Águila, C., Izquierdo, F. Granja, A. G., Hurtado, C. Fenoy, S., Fresno, M. and Revilla, Y. (2006). Encephalitozoon microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int. J. Parasitol.* 36: 869-876.

Didier, E. S., (1995). Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol.* 33:3138–3145.

Didier, E. S., (1995). Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunology.* 17:405 - 412.

Didier, E. S. and Bessinger, G. T. (1999). Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology. In: Wittner M, Weiss, L. M., eds. *The Microsporidia and Microsporidiosis.* 1st ed. Washington, D. C. *ASM Press.* 225–257.

Didier, E.S. (2000). Immunology of microsporidiosis. *Contributions to Microbiology.* 6:193 - 208.

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

Didier, E. S. and Khan, I. A. (2004). Insights into the immune responses to Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia. In: D.S. Lindsay, L.M. Weiss D.S. *Microsporidia.* *Kluwer Academic Publishers,* New York. 135 – 157.

Didier E. S. (2005). Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 94(1):61-76.

Didier, E. S. Bowers, L. C. Martin, A. D. Kuroda, M. J. Khan, I. A. and Didier, P. J. (2010). Reactive nitrogen and oxygen species, and iron sequestration contribute to macrophage-mediated control of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum Microsporidia) infection *in vitro* and *in vivo*. *Microbes. Infect.* 12:1244-1251.

Didier, E. S. (2014). Mammalian Animal Models of Human Microsporidiosis, in: Weiss, L.M. and Becnel J. J. Microsporidia, *John Wiley & Sons, Inc.* 327-339.

Didier, J. J. Becnel, M. L. Kent, J. L. Sanders, L .M. (2014). The Mycota, Microsporidia. In: D. McLaughlin, D., and Lemke, P.A. Microsporidia. *Springer-Verlag*. New York, N. Y. 115–140.

Didier, E. S. and Khan, I. A. (2014). The Immunology of microsporidiosis in mammals. In: Louis, M., Weiss, J. J. and Becnel, M. Microsporidia, *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, N. Y. 307–325.

Didier, E. S., Sokolova, Y. Y. Álvarez, X. and Bowers, L. C. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) suppresses apoptosis in human macrophages. *J. Immunol.* 182:133.

Dupont, C. D., Christian, D. A. and Hunter, C. A. (2012). Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. *Semin. Immunopathol.* 34:793-813.

Egen, J. G., Rothfuchs, A. G., Feng, C. G., Winter, N., Sher, A., Germain, R. N. (2008). Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity.* 28:271–284.

Ehlers, S. (2012). The Granuloma in Tuberculosis: Dynamics of a Host–Pathogen Collusion. *Frontiers in Immunology.* 3: 411.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 35:495-516.

Franzen, C., Hartmann, P. and Salzberger. B. (2005). Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Exp. Parasitol.* 109: 1-6.

Furuya, K. (2009). Spore-forming microsporidian encephalitozoon: current understanding of infection and prevention in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 62:413 – 422.

Garcia, L. S. (2002). Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol.* 40(6):1892-1901.

Gaston, B. and Stamler, J. S. (2002). Biochemistry of Nitric Oxide. In: Fang, F. C. Nitric Oxide and Infection. *Kluwer Academic Publishers*, New York. 37-55.

Ghosh, K. and Weiss, L.M. (2011). T cell response and persistence of the microsporidia FEMS. *Microbiol. Rev.* 36: 748-760.

Ghosh, K. (2014). Laboratory diagnosis of microsporidia. In: Weiss LM, Becnel JJ, eds. *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. 1st ed. Ames, IA: Wiley, 421–456.

Giordano, C., (2005). Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Vet Ophthalmol*. 8:271–275.

Habenbacher, B., (2012). Comparative evaluation of specific methods for labeling of *Encephalitozoon cuniculi* in paraffin wax-embedded tissue samples. *J Vet Diagn Invest*. 24:370–375.

He, Q., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S. and Wallace, S. (1996) .Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 40:179-185

Helming, L., and Gordon, G. (2008). The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology*. 212:785-793.

Heussler, V. T., Kuenxi, P. and Rottenberg, S. (2001). Inhibition of apoptosis by intracellular porotzoan parasites. *Int J Parasitol*. 31:1166-1176.

Hibbs, Jr. J. B. (2002). Infection and nitric oxide. *J. Infect. Dis*. 185(1): 9-17.

Holland S. M. 2010. Chronic granulomatous disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol*. 38(3)1010 – 1007.

Hu, V., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, J., Zheng, P. and Chen, J. (2015). Microglial and macrophage polarization-new prospects for brain repair. *Nat. Rev. Neurol*. 11:56-64.

Ian R. Tizard. (2013). *Veterinary Immunology* . St Louis Missouri. **ELSEVIER SAUNDERS**.

Ito, T., Connett, J. M., Kunkel, S. L., & Matsukawa, A. (2013). The linkage of innate and adaptive immune response during granulomatous development. *Frontiers in Immunology*. 4: 10.

Jeklova, E. Leva, L. Aglic, Z.J. and Faldyna, M. (2008). Dexamethasone-induced immunosuppression: a rabbit model. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 122: 231-240.

Jelínek, J., Salát, J., Sak, B. and Kopecký, J. (2007). Effects of interferon gamma and specific polyclonal antibody on the infection of murine peritoneal macrophages and murine macrophage cell line PMJ2-R with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitologica*. 54:172-176.

- Kallioliias, G. D. and Ivashkiv, L. B. (2016). TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12: 49-62.
- Khan, I. A. and Moretto, M. (1999). Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun.* 67:1887-1893.
- Khan, I. A., Moretto, M. and Weiss, L. M. (2001), Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 3:401–405.
- Khan, I. A. and Didier, E. S. (2004). Insights into the Immune Responses to Microsporidia In: D. S. Lindsay, L. M. Weiss (Eds.), *Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia. Kluwer Academic Publishers.* 135-157.
- Koudela, B., Vitovec, J., Kucerova, Z., Ditrich, O. and Travnicek, Z. (1993). The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. *Folia Parasitol.* . 40: 279-286.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30:16–34.
- Künzel, F. and Joachim, A. (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research.* 106(2):299–309.
- Lallo, M.A., Santos, M.J.D. and Bondan, E.F. (2002). Experimental *Encephalitozoon cuniculi* infection in dexamethasone-immunosuppressed mice. *Rev. Saúde Pública* 36(5): 621-626.
- Lawlor, E.M., Moretto, M. (2010). Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. *Infect. Immun.* 78, 3097-3102.
- Lee, S. Huen, S. Nishio, H. Nishio, S. Lee, H.K. Choi, B.S. Ruhrberg, C. Cantley. L.G. (2011). Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair, *J Am. Soc. Nephrol.* 22: 317-326.
- Leipig, M., (2005). Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *J Vet Diagn Invest.* 25:16–26.
- Leiro, J., Iglesias, R., Parama, A., Sanmartin, M. L., and Ubeira, F. M. (2001). Respiratory burst responses of rat macrophages to microsporidian spores. *Experimental Parasitology* 98:1–9.
- Liu, Y.C. Zou, X.B., Chai, Y.F. and Yao, Y.M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int. J. Biol. Sci.* 10:520-529.

Lovy, J., Wright, G.M. and Speare, D.J. (2007). Ultrastructural examination of the host inflammatory response within gills of netpen reared chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with Microsporidial Gill Disease. *Fish. Shellfish. Immunol.* 22;131-149.

Luder, C. G. K., Gross, U. W. E., and Lopes, M. F. (2001). Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends Parasitol.* 17: 480-486.

Maestrini, G., Ricci, E., Cantile, C., Mannella, R., Mancianti, F., Paci, G., D'Ascenzi, C., Perrucci, S. (2017). *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: Serological screening and histopathological findings. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 50:54-57.

Manz, M. G. and Boettcher, S. (2014). Emergency granulopoiesis. *Nat Revs Immunol.* 14:302-314.

Martinez, F. O. and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, F1000. *Prime. Rep.*, 6:13.

Martin-Hernandez, R., Higes, M. Sagastume, S., Juarranz, A., Dias-Almeida, J. Budge, G.E., Meana, A. and Boonham, N. (2017). Microsporidia infection impacts the host cell's cycle and reduces host cell apoptosis, *PLoS ONE.* 12:e0170183.

Mathews, A. Hotard, A. and Hale-Donze, H. (2009). Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes. Infect.* 11:905-911.

Mathis, A., Weber, R. and Deplazes, P. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18(3):423-445.

Mc Manus, J. F. A. (1948). Histological and histochemical uses of peryodic acid. *Stain Technol.* 23:99.

Michael J. Day. (2014). *Veterinary Immunology Principles and Practice.* Boca Raton. Fl. *Taylor and Francis Group, LLC.*

Moretto, M.M., Lawlor, E.M. and Khan, I.A. (2010). Lack of interleukin-12 in p40-deficient mice leads to poor CD8 β T-cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect. Immun.* 78: 2: 505-2511.

Navarre, W. W. and Zychlinsky, A. (2000). Pathogen-induced apoptosis of macrophages: a common end for different pathogenic strategies. *Cellular Microbiology.* 2: 265-273.

Nelson, M. M., Jones, A. R., Carmen, J. C., Sinai, A. P., Burchmore, R., Wastling, J. M. (2008). Modulation of the Host Cell Proteome by the Intracellular Apicomplexan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 76: 828-844.

Omalu, I. C. J., Duhlińska, D. D. and Anyanwu, P. U. (2007). Inyama Immune responsiveness associated with experimental *Encephalitozoon intestinalis* infection in immunocompetent rats Indian. *J. Med. Microbiol.* 25:209–213

Palmer, M. V., Waters, W. R., and Thacker, T. C. (2007). Lesion development and immunohistochemical changes in granulomas from cattle experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Vet Pathol.* 44:863-874.

Patil, K., De, A., Mathur, M. (2008). Comparison of Weber Green and Ryan Blue modified trichrome staining for the diagnosis of microsporidial spores from stool samples of HIV-positive patients with diarrhoea. *Indian J Med Microbiol.* 26(4):407.

Petersen, H. J., & Smith, A. M. (2013). The Role of the Innate Immune System in Granulomatous Disorders. *Frontiers in Immunology.* 4:120.

Powell, M.D., Yousaf, M.N., Rasmussen, K.J., Kollner, B., Zou, J. Secombes, C. and Speare, D.J. (2014). Immunohistochemical localization of inflammatory cells and cell cycle proteins in the gills of *Loma salmonae* infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Fish. Shellfish. Immunol.* 40: 91-98.

Ramakrishnan L. (2012). Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 20:12(5):352-66.

Rodríguez Tovar, L. E. (2011). Using a quick dye for the diagnosis of microsporidiosis. *Vet Mex.* 42:179–185.

Rodríguez-Tovar, L.E., Castillo-Velázquez, U. Arce-Mendoza, A.Y. Nevárez-Garza, A.M., Zarate-Ramos, J.J., Hernández-Vidal, G. Rodríguez-Ramírez, H.G. and Trejo-Chavez, A. (2016). Interferon gamma and interleukin 10 responses in immunocompetent and immunosuppressed New Zealand White rabbits naturally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Dev. Comp. Immunol.* 62:82-88.

Rodríguez-Tovar, L. E., Nevárez-Garza, A. M., Trejo-Chávez A., Hernández-Martínez, C. A., Hernández-Vidal, G., Zarate-Ramos, J. J., Castillo-Velázquez, U. J. (2016). *Encephalitozoon cuniculi* : Grading the Histological Lesions in Brain, Kidney and Liver during Primo-infection Outbreak in Rabbits. *Pathog.* 5768428.

Rodríguez-Tovar, L. E, Villarreal-Marroquín, A., Nevárez-Garza, A. M., Castillo-Velázquez, U., Rodríguez-Ramírez, H. G., Navarro-Soto, M. C., Zárate-Ramos, J. J., Hernández-Vidal, G., Trejo-Chávez, A. (2017). *J Vet Diagn Invest.* 29(3):269-277.

Salat, J., Braunfuchsova, P., and Kopecky, J. (2001). Experimental infection of immunocompetent and immunodeficient mice with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitologica.* 48(4):249-254.

- Salat, J., Sak, B., Le, T. and Kopecky, J. (2004). Susceptibility of IFN- γ or IL-12 knock-out and SCID mice to infection with two microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis*. *Folia Parasitol.* 51:275-282.
- Scanlon, M., Leitch, G.J., Shaw, A.P., Moura, H. and Visvesvara, G. S. (1999). Susceptibility to apoptosis is reduced in the microsporidia-infected host cell. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 34S-35S.
- Scanlon, M., Shaw, A. P., Zhou, C. J., Visvesvara, G. S. and Leitch, G. J. (2000). Infection by microsporidia disrupts the host cell cycle. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47:525-531.
- Scanlon, M., Leitch, G. J., Visvesvara, G. S. and Shaw, A.P. (2004). Relationship between the host cell mitochondria and the parasitophorous vacuole in cells infected with *Encephalitozoon* microsporidia. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51:81 - 87.
- Segal, B. H., Romani, L. and Puccetti, P. (2009). Chronic granulomatous disease. *Cell Mol Life Sci.* 66(4):553-8.
- Snowden, K. F., Weiss, L. M. and Becnel, J. J. (2014). Microsporidia in higher vertebrates. In: *Microsporidia Pathogens of Opportunity*, L. Eds., *John Wiley & Sons*. Ames, Iowa, USA.
- Soehnlein, O., and Lindom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 10:427-439.
- Sokolova, Y. Y. (2004). Identification of microsporidia infections in nature: light microscopy or PCR?. *Protistology.*3:273 - 281.
- Suzuki, Y. (2002). Host resistance in the brain against *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 185(1):58-65.
- Valencakova, A., Revajova, V., Balent, P., Lesnik, F., and Levkut, M. (2003) Immunosuppressive effect of *Encephalitozoon cuniculi*. *Bull Vet. Inst. Pulawy* 47:113-120.
- Valencakova, A. and Halanova, M. (2012). Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35:1-7.
- van Gool, T., and Dankert, J. (1995). Human microsporidiosis: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection. *Clin Microbiol Infect.* 1(2):75-85.
- van Gool, T., Biderre, C., Delbac, F., Wentink-Bonnema, E., Peek, R. and Vivarès, C. P. (2004). Serodiagnostic studies in an immunocompetent individual infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Infectious Diseases.* 189(12): 2243 - 2249.

Vavra, J., and Larsson, J. I. R. (2014). Structure of microsporidia. In: Weiss, L. M., Becnel, J. J., *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. 1st ed. Ames, IA *Wiley*, 1 - 70.

Volkman, H. E., Pozos, T. C. and Zheng, J. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. 327:446-469.

Wasson, K. and Peper, R. L., (2000). Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol*. 37(2):113-128.

Weber, R., Bryan, R. T., Owen, R. L., Wilcox, C. M., Gorelkin, L., Visvesvara, G. S. (1992). Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med*. 326(3):161-6.

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

Wink, D., Hines, H., Cheng, R., Switzer, Ch., Flores-Santana, W., Vitek, M., Ridnour, L. and Colton, C. (2011). Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J Leukoc Biol* . 89:873-89.

Xiao, L. (2001). Genotyping *Encephalitozoon cuniculi* by multilocus analyses of genes with repetitive sequences. *J Clin Microbiol*. 39:2248 - 2253.

Zietek, J., (2014). Diagnosis of the *Encephalitozoon cuniculi* infections in pet rabbits with neurological symptoms. *Pol J Vet Sci*.17:361–363.

APÉNDICE

A. Técnicas y tinciones

A. 1 Prueba de Inmunoensayo en Carbón (CIA)

*Prueba para la detección y verificación contra *Encephalitozoon cuniculi* en el suero de conejos, usando antígeno de *Encephalitozoon cuniculi* completo y suspensión de carbón.*

Procedimiento:

1. Los reactivos deben estar a TA antes de su uso.
2. Mezclar los reactivos (PBS y la suspensión de carbón) gentilmente en remolino.
3. Diluir las muestras del suero 1:40 con PBS.
4. Mezclar en cantidades iguales (5µl) de la muestra de suero diluido y la suspensión de antígeno en el portaobjetos.
5. Tomar 5 µl de la suspensión de suero/antígeno y adicionar a esta mezcla con igual cantidad de la suspensión de carbón (5 µl) en un portaobjetos y mezclar ambas suspensiones cuidadosamente. Posteriormente colocarle un cubreobjetos.
6. Observar el resultado a un aumento 200x o 400x en un microscopio de luz.
7. Para confirmar el ensayo, se repite el procedimiento con ambos *Encephalitozoon cuniculi*, control negativo y control positivo y se comparan los resultados con las muestras problema.

Resultado e Interpretación:

Si el suero probado contiene anticuerpos IgG contra *Encephalitozoon cuniculi*, los organismos de *Encephalitozoon cuniculi* deberán ser teñidos negros, muy fáciles de observar.

A. 2 Tinción con Calcoflúor White

Esta tinción se utiliza para las heces y la orina.

Pasos precedentes:

Para el manejo de muestras sospechosas con *Encephalitozoon cuniculi* se recomienda utilizar guantes y cubre boca.

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con el frotis de heces y orina en la canastilla porta laminillas para pasar por el tren de tinción.
2. Sumergir para fijar en metanol por 5 minutos.
3. Dejar secar mientras se realiza el siguiente paso.
4. Colocar una charola cubierta con aluminio e instalar un soporte para las laminillas (para evitar el contacto de las laminillas con el aluminio) y mantenerlas en posición horizontal con el tejido hacia arriba y acomodar las laminillas en el soporte.
6. Apagar el foco del laboratorio y cubrir las laminillas de cualquier fuente de luz.

Nota: Continuar con esta condición por el resto procedimiento.

7. Colocar con una pipeta el fluorocromo sobre el tejido por 5 minutos a TA.
8. Retirar la tintura con agua destilada utilizando una pipeta Pasteur sin bañar directamente el área de la muestra.
9. Secar completamente al aire libre.
10. Colocar el cubreobjeto y aplicar una gota de resina sintética, dejar secarlas y guardarlas en un recipiente cerrado, protegerlas de la luz.
11. Observar en un microscopio de epifluorescencia para identificar las esporas. **Nota:** No exponer estas laminillas a la luz.

A. 3 Tinción de Tricromo modificada (Técnica de Weber)

Esta tinción se utiliza para las heces y la orina.

Pasos precedentes:

Para el manejo de muestras sospechosas con *Encephalitozoon cuniculi* se recomienda utilizar guantes y cubre boca.

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con el frotis de las heces u orina en la canastilla porta laminillas para pasar por el tren de tinción.
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 y escurrir el exceso.
5. Sumergir dentro del alcohol ácido por 10 segundos y escurrir.
6. Pasar por el alcohol a 95%, por 5 minutos cada uno y escurrir.
7. Introducir en alcohol al 100% por 10 minutos y escurrir.
8. Aclarar en xileno (xilol) por 10 minutos.
9. Escurrir la canastilla y dejar secar sobre una toalla de papel a temperatura ambiente (TA).
10. Colocar el cubreobjetos y aplicar una gota de resina sintética.
11. Etiquetarlas y dejarlas secar toda la noche.

A. 4 Técnica de inclusión en parafina

Esta técnica se utiliza para los tejidos.

Procedimiento:

1. Obtener las muestras.
2. Fijar en formaldehído amortiguado al 4% por 48 horas.
3. Enjuagar las muestras con agua corriente.
4. Deshidratar en alcoholes de diferentes grados 70%, 80%, 96%, con dos cambios y 100% con dos cambios.
5. Aclarar en xilol.
6. Pre-incluir en parafina.
7. Incluir en parafina los tejidos para formar bloques.
8. Obtener los cortes histológicos cortando con el micrótopo.
9. Pegar los tejidos en el portaobjetos en el baño María de flotación.
10. Desparafinar los tejidos e hidratarlos.
11. Teñir las muestras.
12. Deshidratar y aclarar con xilol.
13. Colocar el cubreobjetos y añadir resina sintética.

A. 5 Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE)

Esta tinción es para teñir los tejidos.

Procedimiento:

1. Desparafinar los cortes en xilol por 5 minutos.
2. Hidratar en etanol - xilol por 2 minutos.
3. Hidratar en etanol absoluto y alcohol etílico al 96% por 2 minutos cada uno.
4. Enjuagar en agua destilada por 2 minutos.
5. Sumergir en hematoxilina de Harris por 2 minutos.
6. Colocar en agua corriente por 1 minuto.
7. Sumergir rápidamente en alcohol ácido, solo una pasada.
8. Sumergir en agua destilada por 2 minutos.
9. Realizar una inmersión rápida en agua amoniacal.
10. Introducir en agua destilada por 2 minutos.
11. Sumergir en eosina por 30 segundos.
12. Deshidratar en alcohol etílico de 96% en 2 inmersiones cada uno.
13. Deshidratar en etanol absoluto en 2 inmersiones.
14. Sumergir en etanol-xilol por 2 minutos.
15. Aclarar en xilol dos cambios por 2 minutos cada uno.
16. Colocar el cubreobjetos y una gota de resina sintética.

A. 6 Tinción de Azul de Tricromo modificada (Técnica de Weber)

Esta tinción es para teñir los tejidos.

Procedimiento:

- 1.- Las laminillas con secciones del tejido se colocan en una canastilla todas orientadas y debidamente identificadas.
2. Sumergir las laminillas en metanol por 5 minutos, después se retiran de éste y se dejan secar a TA por 3 a 5 minutos.
3. Sumergir en azul de tricromo por 90 minutos, sacar y escurrir el exceso rápidamente.
4. Sumergir dentro de alcohol ácido por 10 segundos, se retira de éste rápidamente y se deja escurrir.
5. Se pasa en alcohol al 95%, dos pasadas por 5 minutos cada una y se dejan escurrir.
6. Sumergir en alcohol al 100% por 10 minutos y escurrir.
7. Sumergir en xileno por 10 minutos.
8. La canastilla con laminillas se retira de esta última solución para dejarla escurrir y secar a TA sobre una hoja de papel.
9. Colocar un cubreobjetos y una gota de resina sintética a la laminilla.
10. Etiquetar las laminillas y se dejan secar una noche.

A. 7 Tinción del Ácido Peryódico de Shiff (PAS)

Pasos precedentes:

Fijar con formalina amortiguada al 10% y secciones en parafina, 6 micrones.

Preparación de Soluciones:

1. Ácido peyódico: acido periódico 0.5g, agua destilada 100.0 ml.
2. Ácido clorhídrico 1 N: Ácido clorhídrico, g. esp. 1.19 83.5 ml, agua destilada, calentar a 60°C 200.0 ml. Lavarlo a punto de ebullición, dejarlo enfriar y luego agregar metabisulfito de potasio 2.0 g, ácido clorhídrico 1N 10.0 ml, dejarlo aclarar durante 24 horas y luego agregar carbón activado 0.5 g. Agitar durante 1 minuto, luego filtrarlo a través del papel de filtro grueso. Repetir la filtración hasta que la solución aparezca incolora. Mantener en el refrigerador.
3. Hematoxilina de Mayer.
4. Hematoxilina de Harris.

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar hasta llegar al agua destilada.
1. Enjuagar con agua destilada.
2. Colocar en el reactivo de Shiff de Coleman durante 15 minutos.
3. Lavar con agua corriente tibia durante 10 minutos.
4. Contrastar con la solución de hematoxilina de Mayer durante 15 minutos, o la solución de hematoxinlina de Harris durante 6 minutos.
5. Lavar con agua corriente durante 15 minutos.
6. Deshidratar y aclarar a través de alcohol etílico al 955, alcohol etílico absoluto y xileno, 2 cambios, 2 minutos cada uno.
7. Montar con un medio resinoso.

Resultados:

Tiñe a los núcleos de color rojo y glucógeno, mucina, algunas membranas basales y hongos de color rojo a color púrpura.

A. 8 Extracción del ARN por medio de Trizol reagent

1. Colocar 100 mg de tejido en un volumen de 1ml de Trizol Reagent, esto se homogeniza en vórtex por un mínimo 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Agregar 0.2 ml de cloroformo y mezclar vigorosamente 10 minutos. Se incuba de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifuga a 11000 g 15 minutos a 4°C.
3. Una vez obtenida la fase acuosa, ésta se pasa a otro tubo.
4. Agregar 0.5 ml de isopropanol frío y mezclar 10 veces por inversión. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga a 11000g durante 10 minutos a 4°C.
5. Descartar sobrenadante.
6. Agregar 1 ml de etanol al 75%/DEPC-H₂O y agitar en el vórtex
7. Centrifugar a 7400 g durante 5 minutos a 4°C.
8. Descartar sobrenadante lo más posible.
9. Secar el pellet de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, sin que se seque totalmente.
10. Disolver en 7 µL de agua DEPC durante 10 minutos a una temperatura de 55°-60°C.
11. Agregar 3 µL de una solución de 2 µL de DNAsa por cada µL de 10x buffer. Incubar 30 minutos a 37°C.
12. Después de incubar se agrega 1 µL de DNase stop. Incubar 10 minutos a 65°C.
13. Agregar 1 ml de Trizol Reagent y se disuelve en el vórtex.
14. Repetir los pasos de 2 a 10 e incubar a 10 minutos a 55°C.
16. Para el análisis espectrofotométrico se prepara 2 µL de muestra + 198 µL de TE.
17. Se lee la absorbancia en el espectrofotómetro a 260 nm.

A. 9 Técnica de TUNEL

Pasos precedentes:

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %.

Incluir los tejidos en el bloque de parafina.

Realizar cortes histológicos de 6 μm .

Procedimientos:

I. Desparafinar e hidratar:

1. Colocar los cortes en la estufa a 57°C por 5 minutos.
2. Sumergir los cortes en dos recipientes de xilol, por 5 minutos cada uno.
3. Hidratar en alcoholes graduales de 100%, 95 % y 70% por 5 minutos cada uno.
4. Sumergir en PBS 1X, 2 cambios de 5 minutos cada uno.

Nota: No permitir que los cortes se sequen.

II.- Instrucciones del kit

1. Sumergir las muestras en PBS 1X por 10 minutos a TA.

Nota: Secar cuidadosamente alrededor de la muestra.

2. Cubrir con 50 μL de solución de **proteinasasa K** la muestra e incubar de 15 a 30 minutos a una temperatura de 37°C.
3. Lavar 2 veces en agua desionizada por 2 minutos.
4. Sumergir las muestras en **solución bloqueadora** por solo 5 minutos a TA.
5. Lavar las muestras en PBS 1X por 1 minuto.
6. Sumergir en **buffer TDT** 1X por 5 minutos.
7. Cubrir la muestra con 50 μL de mezcla de reacción de marcaje e incubar de 30 a 60 minutos a 37°C en una cámara húmeda.
8. Sumergir en buffer stop TDT 1X por 5 minutos a TA.
9. Lavar 2 veces en PBS 1X por 2 minutos cada una TA.
10. Cubrir la muestra con 50 μL de solución **Strep-HRP** e incubar 10 minutos 37 °C

11. Lavar 2 veces en PBS 1X por 2 minutos cada una.
12. Sumergir en solución de **DAB** de 2 a 7 minutos.
13. Lavar en varios cambios de agua desionizada 2 minutos cada una.

III. Contratación:

1. Sumergir las muestras en agua desionizada por 2 minutos.
2. Sumergir las muestras de 5 segundos a 5 minutos en verde de metilo.
3. Sumergir las muestras 10 veces en cada una de las siguientes soluciones:
 - Agua desionizada.
 - Etanol 70 % en 2 cambios.
 - Etanol 95 % en 2 cambios.
 - Etanol 100 % en 2 cambios.
 - Xilol en 2 cambios.
4. Limpiar el exceso de xilol.
5. Montar y almacenar las laminilla cuidando este fuera de la luz.

A.10 Protocolo de la Reacción de Griess

Protocolo para determinar la concentración del óxido nítrico.

1. Permitir a las soluciones de Sulfanilamida y *N*-1 naphylethylenediamine dihydrochloride (NED) bajo las condiciones ácidas del ácido fosfórico, equilibrarlas a TA de 15 a 30 minutos.
2. Adicionar 50 μl de cada muestra experimental, se recomienda hacer las muestras por duplicado o triplicado.
3. Usar pipeta multicanal, para obtener 50 μl de la solución de sulfanilamida para todas las muestras experimentales y contener las series de diluciones para la curva de referencia estándar de nitritos.
4. Incubar de 5 a 10 minutos a TA, protegerse la luz.
5. Usar pipeta multicanal, tomar 50 μl de la solución de NED para todas las muestras.
6. Incubar a TA de 5 a 10 minutos, protegerse de la luz. Un color de morado a magenta deberá formarse inmediatamente.
7. Medir la absorbancia ($A_{\lambda} = 540 \text{ nm}$) dentro de los 30 minutos. El color puede decolorarse después de ese tiempo.

B. Preparación de soluciones y reactivos

B.1. Azul de Tricromo modificada (Técnica de Weber)

B. 1. 1. Alcohol ácido

Preparación de 100 ml:

- 99.5 ml de alcohol al 90% con agua destilada.
- 0.5 ml de ácido acético.

B. 2. Técnica de TUNEL. Se utilizó el kit TACS™ 2 TdT *In situ* Apoptosis Detección de Trevigen®

*Las soluciones marcadas con * se deben preparar menos de 30 minutos antes de usarse.*

* B. 2. 1. Solución de proteinasa K.

Soluciones	Concentraciones		
	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Numero de muestras			
Agua desionizada	100 µL	200 µL	500 µL
Proteinasa K	2 µL	4µl	10 µL

* B. 2. 2. Solución bloqueadora:

Metanol 45 mL

Peróxido de hidrógeno 30% 5 mL

B. 2. 3. Solución de buffer de marcaje TDT 1 X

- Diluir el buffer TDT 10 X utilizando agua destilada.
- Usar 50 mL de Buffer TDT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras
- Separar una alícuota de 50 µL/muestra para preparar la mezcla de reacción de marcaje (paso 7), y almacenar en hielo.

*** B. 2. 4. Mezcla de reacción de marcaje**

- Descongelar la mezcla de TDT y dNTP a TA, mantener en hielo, (Para mantener la actividad óptima de la enzima saque del refrigerador el tubo de la enzima solo el tiempo necesario para tomar el volumen).
- Mantener la mezcla de reacción de marcaje en hielo.
- Preparar 50 µL/muestra de la siguiente manera:

Soluciones/ Numero de muestras	2 muestras	4 muestras	10 muestras
Mezcla de TDT/ dNTP	2 µL	4 µL	10 µL
Stock catiónica 50X	2 µL	4 µL	10 µL
Enzima TDT	2 µL	4 µL	10 µL
Buffer de marcaje TDT 1X	100µL	200µL	500 µL

B. 2. 5. Buffer stop TDT 1X

- Diluir el buffer stop TDT 10 X utilizando agua destilada, almacenar a TA.
- Usar 50 mL de buffer stop TDT 1 X para procesar de 1 a 10 muestras.

Buffer stop TDT 1X 5 mL

Agua desionizada 45 mL

*** B. 2. 6. Solución Strep-HRP**

- Usar 50 µL Solución Strep-HRP por muestra
- Almacenar la solución a TA.
- Para preparar añadir:

Soluciones/Número de muestras	2 muestras	4 muestras	10 muestras
PBS 1X	100 µL	200 µL	500 µL
Strep-HRP	2 µL	4µL	10 µL

*** B. 2. 7. Solución de DAB**

- Descongelar la solución de DAB a 37 0C. Almacenar a TA, NO en hielo ya que precipita la solución DAB.
- Preparar la solución no más de 30 minutos antes de usarla.
- Usar 50 mL de solución DAB para procesar de 1 a 10 muestras.
- Añadir para preparar:

PBS 1X 50 mL

DAB 250 µL

H₂O₂ 30% 50 µL

DAB enhancer 25 µL

B. 2. 8. Verde de metilo 1 %

- Listo para usar, puede ser reutilizado, almacenar en recipiente cerrado, si se precipita se filtra.

B. 2. 9. CONTROL POSITIVO:

TACS-Nucleasa y Buffer

Buffer de marcaje TDT 1X 50 µL

Mezcla de TDT dNTP 1 µL

Stock Catiónica 50 X 1 µL

Enzima TDT 2 µL

TACS-Nucleasa 1 μ L

B. 2. 10. CONTROL NEGATIVO:

- Sustituir la enzima TDT de la mezcla por agua milliq.

La solución se preparó en una totalidad de 50 ml; en donde 35ml era de agua DEPC y 15 ml de etanol