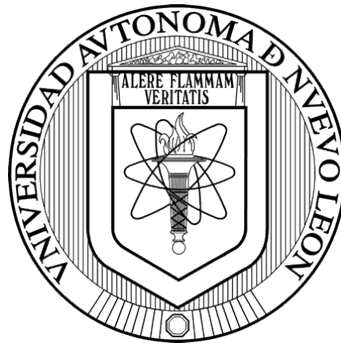


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y GENES DE RESPUESTA INMUNE INNATA DE
MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
Encephalitozoon cuniculi

POR

ALICIA HERRERA GUTIÉRREZ

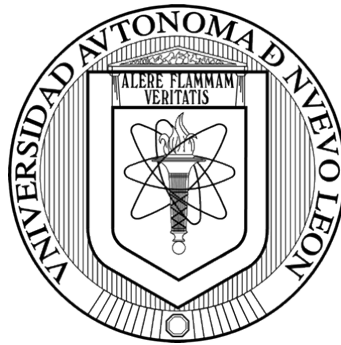
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL

JULIO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA



EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y GENES DE RESPUESTA INMUNE INNATA DE
MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
Encephalitozoon cuniculi

POR

ALICIA HERRERA GUTIÉRREZ

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

JULIO, 2019

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



EXPRESIÓN DE RECEPTORES Y GENES DE RESPUESTA INMUNE INNATA DE
MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON

Encephalitozoon cuniculi

Aprobación de tesis por el comité particular de

Alicia Herrera Gutiérrez

Dirección de Tesis

Dr. Uziel Castillo Velázquez

Director

PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Codirector

Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Director externo

Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director externo

Dra. Aracely García García
Director externo

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis: PhD Luis Edgar Rodríguez Tovar, Dr. Humberto Rodríguez Rocha, Dr. Adolfo Soto Domínguez y Aracely García García por su apoyo y observaciones para la realización de esta investigación.

A mi asesor: Dr. Uziel Castillo Velázquez, por resolver mis dudas, animarme a volver a intentar si algo sale mal, porque “el que no trabaja no se equivoca”, y por toda su confianza y apoyo en cada fase del proyecto.

A mis compañeros del laboratorio: Denisse, Fabiola, Laura, Amisadai, Kevin y Carolina; gracias por haber estado siempre dispuestos a brindarme su apoyo y ser de gran ayuda en diversas etapas de esta investigación.

A mis compañeros del laboratorio de Virología: especialmente a Lesly por su amabilidad y explicaciones del equipo de laboratorio.

Al personal del laboratorio de Genética: por siempre estar dispuestos a facilitar los equipos que fueron necesarios para la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Toxicología: Ramón e Ignacio; gracias por siempre haber tenido la mejor disposición en ayudar con consumibles, reactivos o equipo, pero sobre todo por los consejos brindados.

Al personal del laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina; especialmente a Iván, por siempre explicarme con paciencia y amabilidad los protocolos del laboratorio.

De la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Al PhD Luis Edgar Rodríguez Tovar por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Inmunología. También a la Dra. Alicia M. Nevárez Garza y al M.C. Cesar Dávila Martínez; a todos ellos por ser buenos profesores quienes me motivaron a seguir estudiando y saber el porqué de las cosas.

Al Dr. Rogelio Ledezma Torres por tener siempre la mejor disposición para permitirnos usar los equipos del laboratorio de Reproducción, además por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Alicia Marroquín Cardona por abrirme las puertas del laboratorio de Toxicología con entera confianza y disposición además del apoyo de reactivos.

Y especialmente al Dr. Jesús Jaime Hernández Escareño por sus buenos consejos y palabras de aliento, y por el apoyo de reactivos y equipo.

De la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Dr. Humberto Rodríguez Rocha, Dr. Adolfo Soto Domínguez y Aracely García García por abrirme las puertas del laboratorio de Histología, y por el apoyo de consumibles y reactivos.

De la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León: Al Dr. Víctor E. Aguirre Arzola, quien siempre tuvo una gran disponibilidad de apoyarnos con buenos consejos y consumibles para este proyecto.

Así mismo al Ph.D. Gerardo Méndez Zamora, por sus ideas y ayuda en la estadística de esta investigación, además de sus buenos consejos. Muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres:

Dora Alicia y Mario Alberto, por apoyarme en todas mis decisiones, y guiarme por medio del ejemplo.

A mi mejor amigo:

Esteban, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, además de escuchar cada una de mis dificultades e incertidumbres. Te quiero mucho.

A mis amigas:

Elida, Laura y Jéssica, por ayudarme a crecer tanto profesional como personalmente y por todo el apoyo brindado.

A mi asesor:

Dr. Uziel, por sus enseñanzas y motivarme a seguir adelante con esta investigación.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
2.- REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.- Agente etiológico	3
2.2.- Características filogenéticas del filo Microsporidia.....	3
2.3.- Morfología y fisiología	4
2.4.- Ciclo de replicación	4
2.5.- Mecanismos de infección	5
2.5.1.- Invasión pasiva	5
2.5.2.- Invasión activa.....	7
2.6.- Proteínas de superficie y receptores	8
2.7.- Mecanismos de evasión.....	10
2.8.- Respuesta inmune contra microsporidios.....	10
2.8.1.- Respuesta inmune innata contra microsporidios	10
2.9.- Interacciones con macrófagos	11
3.- JUSTIFICACIÓN.....	13
4.- HIPÓTESIS.....	13
5.- OBJETIVO.....	14
5.1.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
6.- MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1.- Líneas celulares	15
6.1.1.- Propagación de esporas	15
6.1.2.- Obtención de esporas de <i>E. cuniculi</i>	16
6.1.3.- Cuantificación de esporas de <i>E. cuniculi</i>	16
6.1.4.- Cultivo de macrófagos	17
6.2.- Infección de macrófagos	18
6.2.1.- Cuantificación de vacuolas parasitóforas y esporas internalizadas	19
6.3.- Infección de macrófagos para la extracción de ARN.....	20
6.3.1.- Extracción de ARN	20
6.3.2.- Cuantificación de ARN mensajero	21
6.3.3.- Síntesis de ADN complementario (ADNc)	21

6.3.4.- Cuantificación de ARNm de receptores y citocinas por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Q-PCR).....	22
6.3.5.- Método de cuantificación de la expresión génica mediante Q-PCR.....	23
6.4.- Análisis estadístico	24
7.- RESULTADOS	25
7.2.- Efecto de la citocalasina D sobre el índice de internalización de esporas bajo diferentes esquemas de activación o estimulación celular	27
7.3.- Evaluación del efecto del bloqueo de receptores asociados a la infección por <i>E. cuniculi</i>	29
7.4.- Efecto de la citocalasina D sobre el índice de internalización de esporas en macrófagos bloqueados con anticuerpos contra receptores	30
7.5.- Efecto de <i>E. cuniculi</i> sobre la expresión de receptores y citocinas de respuesta inmune innata	31
7.6.- Efecto de la estimulación del macrófago en presencia de <i>E. cuniculi</i>	32
7.7.- La activación con LPS promueve una mayor expresión de receptores y citocinas de respuesta inmune innata	34
8.- DISCUSIÓN	36
9.- CONCLUSIONES	47
10.- BIBLIOGRAFÍA	48
11.- SOLUCIONES	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos aplicados a los macrófagos J774A.1	18
Tabla 2. Concentración de ARN (DO 260/280).	21
Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos para las citocinas y receptores analizados	23
Tabla 4. Expresión de los genes evaluados bajo los tratamientos de activación celular	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación del modelo de invasión de la espora microsporidiana	9
Figura 2. Macrófagos J774A.1 infectados con <i>E. cuniculi</i>.....	26
Figura 3. Efecto de la estimulación y activación de macrófagos infectados con <i>E. cuniculi</i> durante la acción de la citocalasina D.....	27
Figura 4. Porcentaje de invasión intracelular de EI y VP de macrófagos incubados con citocalasina D.....	29
Figura 5. Bloqueo de receptores asociados a la infección por <i>E. cuniculi</i>	30
Figura 6. Comparación de tratamientos con y sin citocalasina D	31
Figura 7. Efecto de <i>E. cuniculi</i> en células J774A.1 sobre la expresión de las citocinas y receptores evaluados	32
Figura 8. Efecto de la estimulación del macrófago en presencia de <i>E. cuniculi</i> para los receptores de <i>Tfr-1</i>, <i>Tfr-2</i>, <i>TLR-2</i> y <i>TLR-4</i>	34
Figura 9. Efecto de la estimulación del macrófago en presencia de <i>E. cuniculi</i> para las citocinas <i>Mcp-1</i> y <i>Mip-1</i>.....	35

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	American type cell collection
<i>β-actina</i>	Beta actina
CO ₂	Dióxido de carbono
CCL-3	Quimiocina CC Ligando tres
CCL-4	Quimiocina CC Ligando cuatro
CD-14	Grupo de diferenciación catorce
cRPMI 1640	Medio de cultivo RPMI 1640 completo
CT	Ciclo de umbral
<i>Dec-1</i>	Receptor de dectina uno
dNTPs	Deoxinucleósidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
EI	Esporas internalizadas
<i>Gpd1</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa uno
H&E	Hematoxilina y eosina
IFN- γ	Interferón gamma
IL-8	Interleucina ocho
IL-12	Interleucina doce
J774A.1	Macrófagos peritoneales de ratón Balb/c
<i>Lox-1</i>	Receptor de lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LPS	Lipopolisacárido
MØ	Macrófagos
<i>Mcp-1</i>	Proteína quimiotáctica del macrófago uno
MD-2	Proteína accesoria MD-2
<i>Mhc-II</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos
<i>Mip-1</i>	Proteína inflamatoria del macrófago uno

MOI	Multiplicidad de infección
NK	Linfocitos asesinos naturales
NTC	Reacción control sin templete
P53	Proteína supresora de tumores
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Buffer fosfato salino
PI	Post - infección
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
PTP	Proteína del túbulo polar
Q-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SFB	Suero Fetal Bovino
<i>Sr-A</i>	Receptor scavenger A
<i>Tfr-1</i>	Receptor de transferrina uno
<i>Tfr-2</i>	Receptor de transferrina dos
<i>Tlr</i>	Receptor tipo Toll
<i>Tnf-α</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
URE	Unidades Relativas de Expresión
Vero E6	Células epiteliales de riñón de mono verde
VP	Vacuola parasitófora

RESUMEN

Este estudio evaluó diferentes receptores que pueden ser compañeros potenciales en la interacción de la célula huésped con el microsporidio *Encephalitozoon cuniculi*. Fueron considerados los receptores de transferrina 1 (*Tfr-1*), transferrina 2 (*Tfr-2*), receptor tipo Toll dos (*Tlr-2*) y el receptor tipo Toll 4 (*Tlr-4*). Así mismo se consideraron citocinas específicas del macrófago: la citocina quimiotáctica del macrófago uno (*Mcp-1*) y la citocina inflamatoria el macrófago uno (*Mip-1*) al ser mediadoras de la actividad inmune innata. Para ello se utilizaron macrófagos J774A.1 con una MOI de 10:1. Los macrófagos fueron expuestos a diferentes tratamientos de activación celular, con combinaciones de LPS y/o INF- γ y sin activador celular. El análisis de estos genes fue realizado mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Q-PCR), identificando al receptor de *Tfr-2* como un receptor que activa su expresión en presencia de *E. cuniculi*, por lo cual podría ser un importante receptor involucrado en el mecanismo de infección de la célula huésped utilizado por estos microorganismos.

En experimentos adicionales se evaluó la capacidad fagocítica del macrófago con el uso de Citocalasina D, se observó que agregar el anticuerpo anti-dectina 1 (*Dec-1*) al cultivo celular redujo las tasas de infección por microsporidios (MØ+ *E.c.* + *Dec-1*). Estos resultados indican que dectina puede ser un receptor importante involucrado en el mecanismo de infección de la célula huésped utilizada por estos patógenos.

Así mismo, la expresión del receptor de *Tfr-2* puede indicar que está involucrado en la interacción de células hospedadoras con *E. cuniculi*. Estos resultados revelan que *Tfr-2* y *Dec-1* pueden estar involucrados en el proceso de invasión de *E. cuniculi* a la célula hospedadora, por lo que podría ser el primer estudio donde la participación de estos genes es reportada, e interferir con estos receptores podría ser la clave para combatir las infecciones causadas por este microsporidio.

ABSTRACT

This study evaluated different receptors that may be potential partners in the interaction of the host cell with the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. Transferrin 1 (*Tfr-1*), transferrin 2 (*Tfr-2*), Toll two (*Tlr-2*) and Toll 4 (*Tlr-4*) type receptors were considered. Likewise, macrophage-specific cytokines were considered: the chemotactic cytokine of macrophage one (*Mcp-1*) and inflammatory cytokine the macrophage one (*Mip-1*) as mediators of innate immune activity. J774A.1 macrophages with an MOI of 10:1 were used for this. The macrophages were exposed to different cell activation treatments, with combinations of LPS and / or INF- γ and without cell activator. The analysis of these genes was performed by quantitative Polymerase Chain Reaction (Q-PCR), identifying the *Tfr-2* receptor as a receptor that activates its expression in the presence of *E. cuniculi*, so it could be an important receptor involved in the mechanism of cell infection host used by these microorganisms.

In additional experiments the phagocytic capacity of the macrophage was evaluated with the use of Cytochalasin D, it was observed that adding the anti-dectin 1 antibody (*Dec-1*) to the cell culture reduced the rates of microsporidium infection (MØ + *E.c.* + *Dec-1*). These results indicate that dectin may be an important receptor involved in the mechanism of infection of the host cell used by these pathogens.

Likewise, expression of the *Tfr-2* receptor may indicate that it is involved in the interaction of host cells with *E. cuniculi*. These results reveal that *Tfr-2* and *Dec-1* may be involved in the process of invasion of *E. cuniculi* to the host cell, so it could be the first study where the participation of these genes is reported, and interfere with these receptors It could be the key to fighting infections caused by this microsporidium.

1.- INTRODUCCIÓN

Encephalitozoon cuniculi pertenece al filo Microsporidia con 100 géneros de microsporidios y más de 1200 especies, aproximadamente. Sin embargo, las especies más diagnosticadas en humanos son *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* y *Encephalitozoon cuniculi* (Hofmannová et al., 2014; Van Gool & Dankert, 1995). Es importante señalar que muchos factores intervienen en el tipo de infección, entre los cuales están el genotipo de los microsporidios, la especie hospedadora, la edad, el estado inmune del hospedador, así como el modo de infección (Hofmannová et al., 2014). En la actualidad se ha demostrado que *E. cuniculi* puede infectar a una amplia gama de hospedadores como a caninos, felinos, roedores, primates y humanos (Berger et al., 2015); y recientemente aislada de aves (Lallo et al., 2016). Esto hace que sea considerada como una enfermedad zoonótica de riesgo para la salud humana (Texier et al., 2010), inocuidad alimentaria y economía (Xu & Weiss, 2005).

La transmisión más común de es mediante de la ingesta de agua o alimento contaminado con esporas que fueron excretadas a través de la orina, heces o secreciones del aparato respiratorio de animales infectados (Neumayerová et al., 2014). Específicamente, las esporas infectan a la célula hospedadora a través de un túbulo polar (Han et al., 2017; Franzen, 2005), organelo único en la naturaleza, por lo que ha llamado la atención en el ámbito científico. Está compuesto por proteínas, por ejemplo la proteína del túbulo polar (PTP) 1, PTP 2 y PTP 3 (Delbac et al., 2001; Vávra & Lukeš, 2013), además de la PTP 4 y PTP 5 (Han et al., 2017).

Una vez producida la infección del microsporidio al hospedador, el curso clínico depende del estado inmunológico del huésped (Stentiford et al., 2016). Generalmente se presentan infecciones crónicas sin sintomatología cuando los hospederos no están inmunológicamente comprometidos (Didier et al., 2004). Así mismo, en humanos clínicamente sanos se han reportado casos que presentan diarreas que pueden llegar a durar de dos a tres semanas (Okhuysen, 2001).

En el caso de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos, el desarrollo de la enfermedad puede presentarse en forma ocular, renal y neurológica (Maestrini et al., 2017). Hasta la fecha se

sabe que en las infecciones por microsporidios en hospederos inmunocomprometidos pueden llegar a generar infecciones secundarias que posteriormente pueden agravar la situación del hospedador y generar lesiones graves e incluso la muerte (Didier et al., 2000).

Existen reportes donde una población sana fue evaluada, y la mayoría de las personas tenía infecciones microsporidiales subclínicas y eliminaban esporas infecciosas (Valencakova & Halanova, 2012). Para combatir las infecciones por microsporidios, los macrófagos modulan la respuesta inmune al reconocer patógenos por varias clases de receptores de superficie, lo que desencadena en la producción de mediadores de defensa del huésped a través de la secreción de citocinas y quimiocinas. Sin embargo, los microsporidios son capaces de evadir las respuestas del sistema inmune, y la diseminación de estos microorganismos a otras partes del cuerpo ocurre por la capacidad de estas especies para infectar a estos macrófagos (Mathews et al., 2009).

Han y sus colaboradores (2017) identificaron mediante el análisis proteómico de PTP4 unido a membranas de células hospedadoras que el receptor de transferrina 1 (*Tfr-1*), una proteína de la membrana de la célula huésped, y seguramente el receptor de manosa interactúan con PTP4 durante el proceso de infección de *E. hellem*. Los datos obtenidos fueron confirmados por inmunoprecipitación, pull-down e inmunolocalización. Así mismo, mencionan que el bloqueo del receptor de *Tfr-1* en células CHO disminuye significativamente la infección de microsporidios. Está claro que la presencia de *Tfr-1* es importante en el mecanismo de infección y que la unión de PTP4 está implicada en el mecanismo de infección de esporas de *E. hellem*, por lo que concluyen que interferir con la interacción de PTP4 y estos receptores disminuye significativamente la infección por microsporidios en las células hospedadoras.

2.- REVISIÓN DE LITERATURA

2.1.- Agente etiológico

Encephalitozoon cuniculi es un organismo unicelular, clasificado como parásito intracelular obligado, por lo que depende de una célula hospedadora para completar su ciclo de vida (Cali & Takvorian, 1999; Weiss & Vossbrinck, 1999). Pertenece al filo Microsporidia, y están relacionados filogenéticamente con los zigomicetos. Anteriormente, estos microorganismos y otros “eucariotas primitivos” evolucionaron antes de la endosimbiosis y desarrollaron mitosomas, que son vestigios mitocondriales (Burri et al., 2006).

E. cuniculi ha sido dividido en los genotipos I, II, III y IV. El genotipo I fue aislado de conejos, el genotipo II de roedores, el genotipo III de perros y el genotipo IV de humanos, aunque también ha sido aislado de perros y gatos (Selman et al., 2013). Sin embargo, la incidencia en cada hospedador no es estricta, ya que todos los genotipos han sido aislados de seres humanos, por lo que las infecciones con este microsporidio son consideradas zoonóticas (Maestrini et al., 2017).

2.2.- Características filogenéticas del filo Microsporidia

Los microsporidios son parte de células eucariotas que han perdido genes, posiblemente en su adaptación al parasitismo celular (Ghosh et al., 2012). Esta adaptación los ha llevado a eliminar varios rasgos clave de la biología eucariota; poseen mitosomas que son vestigios mitocondriales, el aparato de Golgi es del tipo no apilado, los ribosomas no son del tipo eucariótico típico, si no que tienen similitud con los ribosomas de organismos procariotas, además carecen de peroxisomas. El género *Encephalitozoon* no posee rutas metabólicas básicas como el ciclo de Krebs, lo que sugiere que este organismo depende del hospedador incluso para procesos metabólicos básicos (Madigan et al., 2009).

2.3.- Morfología y fisiología

Las esporas de *E. cuniculi* generalmente miden de 2.5 a 3 μm de largo por 1.5 a 2 μm de ancho (Koudela et al., 1999). Están compuestas por una doble capa: a) la capa externa, denominada exospora, la cual es electrodensa y está compuesta por proteínas; mientras que la b) endospora, está compuesta por α -quitina, subyaciéndole la membrana plasmática interna, que ayuda a delimitar el esporoplasma. En ella se alojan diversos organelos como el núcleo y los ribosomas, los cuales se introduce en la célula hospedadora a través del túbulo polar, para que la espora pueda llevar a cabo su ciclo celular y replicarse. El túbulo polar se encuentra enrollado en forma de espiral dentro de la espora unido al disco de anclaje. Sin embargo, este es extruido al momento de la infección (Vávra & Lukeš, 2013; Stentiford et al., 2016).

2.4.- Ciclo de replicación

La espora infecta a la célula eucariota huésped mediante el túbulo polar introduciendo el esporoplasma, la parte infecciosa de la espora, dentro de la célula para poder multiplicarse. La multiplicación se realiza mediante fisión múltiple (esquizogonia) y mediante fisión binaria (merogonia), dando origen a las células hijas, llamadas merozoitos (Cali & Takvorian, 1999). En el citoplasma o en el interior de la vacuola parasitófora (VP), los microsporidios se desarrollan de esporogonia a esporas maduras, que es la segunda fase reproductiva. En la esporogonia se forma una pared gruesa que cubre a la espora, que le da capacidad de resistir a condiciones ambientales, y una vez madura, la espora es la única etapa infecciosa y capaz de sobrevivir fuera del hospedero (Koudela et al., 1999; Brooks et al., 1985).

Cuando las esporas aumentan en número y el citoplasma queda lleno de éstas, la membrana celular se rompe y las esporas son liberadas. Estas esporas maduras infectan nuevas células (Katinka et al., 2001), diseminándose de una célula a otra, provocando el aumento de radicales libres (inflamación local), daño al ADN celular y la muerte de estas, consecuentemente provoca que el riesgo de mutagénesis aumente en la célula huésped.

Durante la infección, la replicación del microorganismo en el epitelio de las vellosidades del intestino delgado contribuye a la mala absorción del intestino. Después de la esporulación, las esporas maduras que tienen el esporoplasma infeccioso, son arrojadas al exterior del huésped, pudiendo así infectar otros individuos (Didier & Weiss, 2006).

2.5.- Mecanismos de infección

La activación de esporas y la descarga del túbulo polar dura alrededor de dos segundos; y cuando la espora se activa rompe el esporoplasma, lo que produce un aumento en la presión osmótica dentro de la espora. Así mismo, la vacuola posterior se expande, causando que el túbulo polar se extruya introduciendo el esporoplasma en la célula huésped causando la infección con la replicación de la espora. El proceso de germinación de las esporas no ha sido claramente descrito, pero se ha observado que los estímulos que activan a las esporas dependen de la especie del microsporidio (Franzen et al., 2005; Weiss & Becnel, 2014).

E. cuniculi puede llevar a cabo la infección mediante dos mecanismos de internalización: a) mediante la invasión activa, donde a través del túbulo polar inocula su material infectante en la célula huésped para una posterior germinación de esporas, o b) mediante una invasión pasiva a través de la fagocitosis de las esporas (Couzinet et al., 2000; Franzen, 2004).

2.5.1.- Invasión pasiva

Diversos estudios afirman que las esporas del microsporidio también tienen acceso a nuevas células hospedadoras mediante endocitosis, y se ha demostrado que la internalización de esporas es bloqueada por la citocalasina D al causar un efecto inhibitor en la captación de esporas, suprimiendo la polimerización de los filamentos de actina e impidiendo a la célula fagocitar la espora, lo que sugiere que la entrada de esporas en la célula huésped es dependiente de la actina (Franzen, 2004).

En el caso de *Encephalitozoon*, estos microsporidios están rodeados por una membrana adherida, indicando que la vacuola parasitófora se origina a partir de la membrana celular de la célula hospedadora cuando el túbulo polar es invaginado al momento de descargar el esporoplasma (Franzen, 2005).

Una vez que el esporoplasma es inoculado en la célula hospedadora, se replica dentro de la vacuola parasitófora que impide la fusión endolisosomal (Khan et al., 2001) y así consigue infectar a otras células circundantes, y una vez que la carga de microsporidios sea alta, dichas células mueren por lisis celular.

Adicionalmente, las células infectadas pueden entrar en un proceso de muerte, formando cuerpos apoptóticos para ser fagocitadas fácilmente por otras células fagocíticas especializadas (Yalçinkaya et al., 2016), lo que evita la liberación de los microorganismos al espacio extracelular (Burri et al., 2006).

Cabe señalar que algunos protozoarios como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania spp.*, y el microsporidio *Nosema algerae* pueden inhibir el proceso apoptótico interfiriendo con la señalización intracelular normal de las células (Yalçinkaya et al., 2016). Por ejemplo, en células Vero E6 infectadas con *E. cuniculi*, una proteína involucrada en el proceso de apoptosis se encuentra ausente la caspasa-3. Esto ha sugerido que la replicación de este microorganismo no activa la vía de apoptosis. Además, es capaz de bloquear señalizaciones en estas células, ya que la p53 (proteína supresora de tumores) actúa como un factor transcripcional, clave en el proceso de apoptosis, no se encuentra fosforilado ni translocado al núcleo cuando ocurre la infección. Estos estudios son corroborados cuando en cultivos previamente infectados se les aplicó estaurosporina, un agente que induce la apoptosis, observándose una inhibición parcial en la translocación de p53, y en consecuencia la inhibición de la muerte celular programada (Del Aguila et al., 2006). Esto sugiere que algunos microsporidios como *E. cuniculi* y *N. algerae* (Franzen et al., 2005) sean capaces de replicarse dentro de las células

inhibiendo la señalización apoptótica en las células infectadas, como en los macrófagos peritoneales, lo que impide la destrucción del microorganismo y permite su replicación.

2.5.2.- Invasión activa

La invasión activa ocurre cuando la pared de la espora sobresale su parte anterior, la eversión comienza en el ápice, en donde el túbulo polar de descarga se rompe a través de la región más delgada de la espora. La longitud del túbulo polar varía de 50 a 500 μm , siendo 100 veces más grande que la longitud de la espora. La punta del túbulo polar de descarga puede moverse en el medio de cultivo a velocidades superiores a 100 milisegundos. A través de observaciones *in vitro*, se ha determinado que una vez que el túbulo polar se extruye para transferir el esporoplasma en la célula hospedadora, es realizado de 15 a 500 milisegundos, la espora se queda vacía con la membrana del esporoplasma, desarrollando una nueva membrana plasmática (Vávra, 1976; Weiss & Becnel, 2014).

Anteriormente se pensaba que el túbulo polar transfería el esporoplasma perforando la membrana plasmática de la célula hospedadora, pero ahora se sabe que el túbulo polar se invagina en las células mediante la fagocitosis. Después de la invasión celular, las esporas se replican mediante fisión binaria y quedan contenidas dentro de una vacuola parasitófora (Han et al., 2017; Franzen, 2004).

Así mismo, se han propuesto otros métodos para la internalización de microsporidios en las células, que implican una interacción específica entre el polo posterior de la espora del microsporidio y la membrana de la célula hospedadora, donde la vacuola parasitófora se forma a partir de la membrana de la célula huésped, una vez fagocitado el esporoplasma (Foucault & Drancourt, 2000). Diversos estudios corroboran esta teoría, la mayoría de las especies de microsporidios se desarrollan dentro del citoplasma de la célula hospedadora, y no dentro de una vacuola. Microsporidios como *E. cuniculi*, en una etapa temprana de infección, las esporas inducen a la formación de vacuolas parasitóforas, cuyo origen es de la célula huésped (Franzen, 2004; Yalçinkaya et al., 2016).

Otros estudios sugieren que el proceso de fagocitosis ocurre cuando el ápice de la espora hace contacto con la membrana de la célula huésped, y ésta fagocita el túbulo polar. Hasta el momento no hay evidencia de un reconocimiento específico. También hay estudios que proponen la extensión del túbulo polar como una adaptación de una espora inmóvil que interactúa con células huésped (Han et al., 2017).

2.6.- Proteínas de superficie y receptores

En el caso específico de los microsporidios se han identificado cinco proteínas del túbulo polar (PTP); sin embargo, las funciones e interacciones de la mayoría de éstas se desconocen. El análisis de las secciones transversales de los túbulos polares ha revelado que poseen de 20 a 30 capas, el cual varía antes, durante y después de la extrusión que lleva a cabo para infectar a la célula hospedadora (Delbac et al., 2001; Franzen, 2005).

Han et al. (2017) plantearon un modelo de infección para el microsporidio *Encephalitozoon hellem*; donde proponen que cuando el túbulo polar es extruido, la PTP1 interactúa e induce la unión con proteínas de unión a manosa en la superficie de la célula huésped. Así mismo, estos autores señalan que la PTP4 funciona como una importante proteína de *E. hellem* durante la infección, ya que interactúa con algunos de los receptores transmembranales de la célula huésped, como transferrina 1 (*Tfr-1*), formando una especie de sinapsis entre la PTP4 y el receptor de la membrana de la célula hospedadora, asegurando así una infección exitosa (Figura 1).

Esta interacción de las PTP con el receptor de transferrina 1, u otras proteínas de la célula huésped activan eventos de señalización como la endocitosis mediada por clatrina, además que la actina está involucrada en la formación de la vacuola parasitófora (Han et al., 2017) donde la espora se replica para terminar su ciclo de vida.

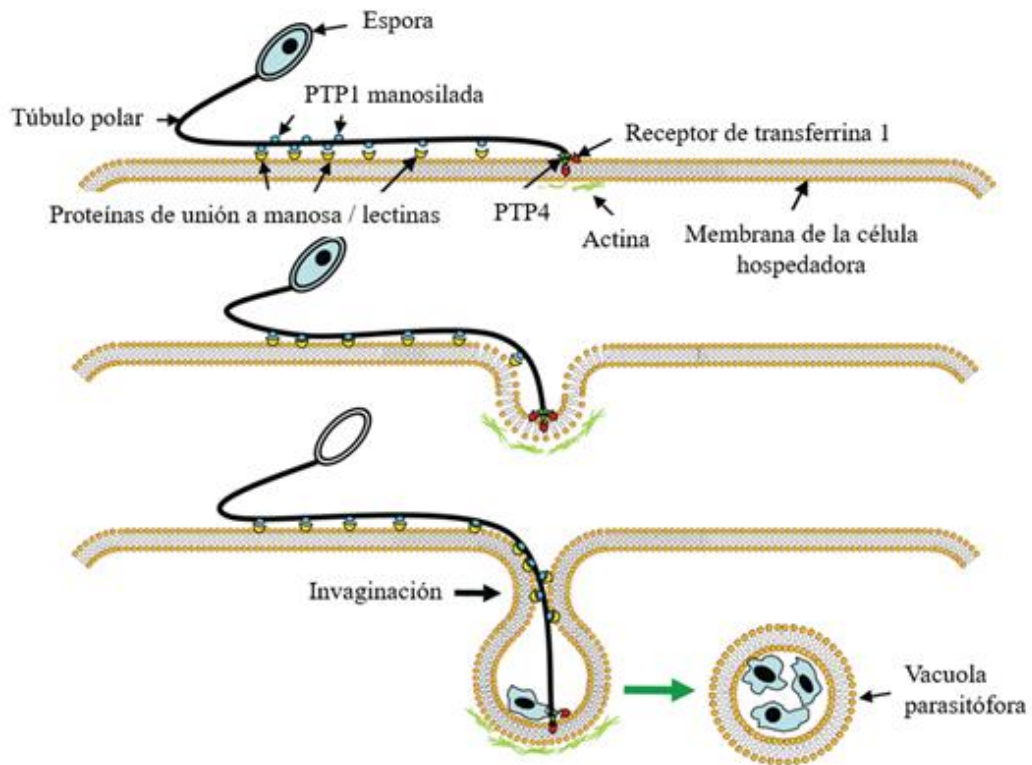


Figura 1. Representación del modelo de invasión de la espora microsporidiana.

La PTP1 interactúa con proteínas de unión a manosa, adhiriendo el tubo polar a la superficie del huésped con el *Tfr-1* u otras proteínas, permitiendo que el tubo polar forme una sinapsis de invasión dentro de la membrana de la célula huésped. La interacción entre las PTP con la membrana de la célula hospedadora forma una sinapsis que protege del entorno externo al esporoplasma extruido. Finalmente pueden activarse eventos de señalización como la endocitosis mediada por clatrina y la participación de actina celular para la formación de una VP. (PTP: proteína del túbulo polar, *Tfr-1*: receptor de transferrina 1, VP: vacuola parasitófora). Modificado de Han et al. (2017).

2.7.- Mecanismos de evasión

En diversos estudios se ha reportado que los microsporidios son capaces de sobrevivir fuera del hospedero por largos periodos de tiempo debido a su doble capa que le otorga la capacidad de resistir al medio ambiente (Sokolova et al., 2011; Didier et al., 2004). Así mismo se ha reportado que esporas de *E. cuniculi* conservan su capacidad infectiva después de 16 días de haber sido incubadas a 22 y 4 °C durante 8 días (Waller, 1979). También se ha observado que la incubación con agua destilada y la congelación no eliminan a las esporas de *E. cuniculi* completamente (Koudela et al., 1999); recientemente, Li et al. (2010) en un estudio que realizaron fueron capaces de infectar células en cultivos de tejidos con esporas de *Encephalitozoon intestinalis*, *E. cuniculi* y *E. hellem*, las cuales fueron incubadas a temperaturas que variaban entre los 10 y 30 °C, en periodos de días hasta meses (Koudela et al., 1999).

2.8.- Respuesta inmune contra microsporidios

La resistencia a infecciones por microsporidios no está mediada por respuestas de anticuerpos sino mediante citocinas. Inclusivese ha demostrado que la activación de los linfocitos T citotóxicos no depende de las células T CD4; sin embargo, son células importantes para la protección contra estos patógenos. Para promover resistencia o susceptibilidad de la infección por *Encephalitozoon*, los linfocitos T citotóxicos deben interactuar en conjunto con el sistema inmune innato, ya que los linfocitos deben activarse antes para poder eliminar al patógeno (Khan et al., 2001; Mathews et al., 2009; Lallo & Hirschfeld, 2012).

2.8.1.- Respuesta inmune innata contra microsporidios

La inmunidad mediada por células y citocinas conducen a la activación de la respuesta inmune innata contra los microsporidios, donde participan citocinas como la interleucina

12 (IL-12) y el interferón gamma (IFN- γ) secretados por las células del sistema inmune innato en respuesta de la invasión. Estos son los primeros en reconocer las respuestas de los linfocitos Th 1 que activan los linfocitos T citotóxicos. La respuesta inmune innata está mediada principalmente por monocitos, neutrófilos, células dendríticas y células endoteliales; cuya función es reconocer al patógeno para eliminarlo y generar una respuesta inmune adaptativa (Valencakova & Halanova, 2012).

2.9.- Interacciones con macrófagos

Las células del sistema inmune, como los macrófagos, funcionan como un mecanismo de control intracelular contra agentes infecciosos; sin embargo, *E. cuniculi* puede evadir el sistema inmune para completar su ciclo de vida (Valencakova & Halanova, 2012) internalizándose en las células que infecta mediante la germinación de sus esporas; es decir, mediante invasión activa y a través de la ingesta de las mismas, (fagocitosis) (Hofmannová et al., 2014). En el estudio de Franzen (2005) se sugirió que las esporas son internalizadas en mayor proporción a través de ingesta fagocítica y que éstas logran evadir su destrucción en los fagolisosomas mediante la germinación dirigida hacia el citoplasma de la célula hospedadora.

La diseminación de esporas de *E. cuniculi* y *E. intestinalis* ocurre cuando los macrófagos reconocen al patógeno y secretan quimioatrayentes como respuesta, con la finalidad de atraer nuevas células, incluidos los monocitos para poder suprimir la infección. De esta forma, si los macrófagos no puede eliminar al patógeno, y estando infectados migran al sistema linfático, y posteriormente para la sangre y los tejidos, logrando la diseminación del microorganismo en el hospedador (Valencakova & Halanova, 2012b).

Los macrófagos reconocen al patógeno por las interacciones específicas de la proteína huésped con el microsporidio; sin embargo, existen pocos datos al respecto. Se sabe que la unión de las esporas en las células huésped está relacionado con las proteínas glicosiladas; como los glicosaminoglicanos, relacionados con el reconocimiento de *E. intestinalis*, los cuales dependen de la unión de la proteína de la pared de la espora, con los motivos de unión a heparina (Leitch & Ceballos, 2009). Otro grupo de proteínas

glicosiladas son los O-glucanos, relacionados con la unión de las esporas a los receptores de la célula huésped (Lores et al., 2002). Esto sugiere que los receptores de la célula hospedadora que reconocen a estas proteínas glicosiladas son los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés). Estos receptores reconocen un amplio espectro de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) de diversos patógenos. Los PRRs pueden unirse a proteínas, glicoproteínas, lípidos y carbohidratos complejos, como peptidoglicanos, lipoproteínas bacterianas, cimosos y manosa (Malcekova et al., 2010; Mohn & Nordstoga, 1975).

Dentro del grupo de los PRR se encuentran los receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés) que inician respuestas inmunes innatas frente a patógenos en mamíferos. Por ejemplo, *Encephalitozoon* spp. utiliza TLR-2 para inducir respuestas inmunes, y se han realizado análisis en células HEK293 infectadas, que expresan TLR-2 o TLR-4, MD-2 y CD-14; revelando que TLR-2 aumenta su expresión en presencia los microsporidios *E. cuniculi* y *E. intestinalis*; por lo que parece ser importante para la activación de las respuestas inmunes innatas. Así mismo, con la expresión de TLR-2 se vio afectada la producción de IL-8, CCL-3 y CCL-4, las cuales son quimiocinas que participan en el reclutamiento de células que fagocitan patógenos, que también están implicadas en la difusión de estos (Moretto et al., 2000), lo que podría indicar que estos macrófagos pueden ser usados por los microsporidios para replicarse.

3.- JUSTIFICACIÓN

Encephalitozoon cuniculi ha sido identificado como un patógeno de gran relevancia para la salud pública y animal que puede causar enfermedades zoonóticas; aunque este patógeno no es comúnmente investigado. Los mecanismos exactos entre las PTP de los microsporidios y los receptores de las diferentes células hospedadoras continúan sin desarrollarse completamente, y ahora se sabe que interferir en esta interacción disminuye significativamente la infección por microsporidios; por lo que estos estudios nos guían hacia la premisa de que los mecanismos para los microsporidios son similares, incluyendo *E. cuniculi*, lo cual puede ser una herramienta para contrarrestar este patógeno. Las infecciones por microsporidios pueden ser mediante la eversión del túbulo polar o por fagocitosis, por lo que en el presente trabajo se pretende generar información respecto a los mecanismos de respuesta celular innata de *E. cuniculi*, y su principal factor de éxito para infectar a la célula hospedadora: el túbulo polar, y los receptores que podría utilizar la espora para internalizarse.

4.- HIPÓTESIS

La capacidad fagocítica del macrófago induce una expresión diferencial de genes asociados con la respuesta inmune innata en macrófagos murinos infectados experimentalmente con *Encephalitozoon cuniculi*.

5.- OBJETIVO

Evaluar las diferencias en la expresión de los receptores y genes de respuesta inmune innata en macrófagos murinos infectados experimentalmente con *Encephalitozoon cuniculi*.

5.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

Definir la ruta de infección predominante de *E. cuniculi* para invadir la célula hospedadora.

Determinar el efecto del bloqueo de receptores asociados a la infección por *E. cuniculi*.

Determinar el nivel de expresión de las diferentes citocinas y receptores que están asociados al proceso de invasión de *E. cuniculi*.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en conjunto con el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL.

6.1.- Líneas celulares

Células J774A.1 (macrófagos peritoneales de ratón Balb/c) y Vero E6 (Células epiteliales de riñón de mono verde) fueron cultivadas usando RPMI (Roswell Park Memorial Institute)-1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) como medio de cultivo, complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB) (Corning, Nueva York, EUA), y una combinación de antibiótico y antimicótico; penicilina y estreptomina respectivamente (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) para prevenir contaminación. Esta mezcla es referida como RPMI complementado (cRPMI). Las células fueron incubadas a una temperatura de 37°C, al 5% de CO₂, con una humedad del 80% en una incubadora Forma Series II Water Jacket (Thermo Fisher, Ohio, EUA).

6.1.1.- Propagación de esporas

La cepa de laboratorio de *E. cuniculi* (ATCC[®]50789^{MR}) fue obtenida de *American Type Cell Collection* (ATCC, por sus siglas en inglés). Para la propagación sus esporas, las células Vero E6 (ATCC[®]CCL-81^{MR}) se utilizaron debido a su eficiencia en la replicación de dichos microorganismos (Joseph & Sharma, 2009). Las células fueron sembradas en cajas de cultivo celular ventiladas de 25 cm² (Corning, Nueva York, EUA).

Una vez desarrollada la monocapa de células Vero E6 libre de contaminación y con una confluencia de aproximadamente 60%, prosiguió la propagación de las esporas previamente purificadas, añadiéndose 250 µl a una concentración de 6.0×10^7 esporas, sobre una monocapa celular permitiendo así su internalización y desarrollo intracelular.

Haciendo periódicamente cambios de medio de cultivo cada tercer día de las células infectadas recolectando el sobrenadante, para obtener esporas extracelulares. Una vez que la confluencia sobrepasaba el 90 % se realizaba un pase celular mediante tripsina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) al 0.25 % de acuerdo con las instrucciones de la ATCC® manteniendo así la viabilidad celular y el desarrollo de las esporas dentro de las monocapas celulares. Se observó que la replicación del microorganismo inició durante la segunda semana post- infección (PI) evidenciado por el surgimiento de vacuolas parasitóforas (VP) dentro del citoplasma y un aumento en la morfología celular, vistas a través de un microscopio invertido Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Overkochen, Alemania).

6.1.2.- Obtención de esporas de *E. cuniculi*

Una vez que la confluencia de las células Vero E6 infectadas superó el 80% y las vacuolas parasitóforas eran visibles en el 90% de las células, se obtuvieron las esporas del sobrenadante y de la monocapa celular. Las cajas fueron raspadas usando un descamador celular (Corning, Nueva York, EUA) y la suspensión celular resultante fue homogenizada en el medio de cultivo para posteriormente ser transferida a un tubo Falcon® de 50 ml (Axygen Scientific, Nueva York, EUA) centrifugándose a 1,500 X g durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Alemania). Enseguida se decantó el sobrenadante cuidando de no perder el sedimento celular, el cual fue resuspendido en 5 ml de medio fresco y disgregada a través de una aguja de calibre 27 mm (Nanchang, Jiangxi, China) hacia un tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Nueva York, EUA). Esta suspensión fue homogenizada en un Vortex Mixer (Labnet, Nueva York, EUA) repitiéndose tres veces este procedimiento para eliminar la mayor parte de restos celulares. Finalmente, el sedimento celular compuesto en su mayoría por esporas dispersas fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo cRPMI.

6.1.3.- Cuantificación de esporas de *E. cuniculi*

Una vez colectadas las esporas en 1 ml de RPMI, se tomaron 10 μ l del homogenizado, más 190 μ l de cRPMI con un factor de dilución de 1:20 en un volumen final de 200 μ l para la cuantificación de esporas. La solución fue homogenizada adecuadamente usando una micropipeta y después cuantificar el número de esporas en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Pensilvania, EUA), donde se le colocó un cubreobjetos para posteriormente tomar 10 microlitros de la dilución y depositarlos en las cámaras mediante capilaridad. Se analizaron cinco cuadros de la cuadrícula central con un aumento de 100 \times en un microscopio (Primo Star, Carl Zeiss, Gotinga, Alemania). El número de esporas se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas} = (\bar{X}) \times (0.25) \times (20) \times (1,000,000).$$

Donde \bar{X} representa el valor del promedio de los cinco cuadros contabilizados. El factor de dilución fue 20, obtenido de dividir el volumen final de la muestra entre el volumen inicial de la misma. La suspensión de esporas se conservó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

6.1.4.- Cultivo de macrófagos

Para obtener células J744A.1, fue seleccionada una caja de cultivo celular ventilada de 25 cm² con una confluencia de aproximadamente el 80%. El medio de cultivo de mantenimiento de las células fue decantado para hacer tres lavados con 2ml de PBS. Posteriormente, 4 ml de cRPMI fueron agregados y la caja fue raspada en su totalidad para despegar las células de la superficie. La solución celular fue homogenizada usando una micropipeta y se decantó en un tubo Falcon[®] de 50 ml. En esta suspensión se tomaron 10 μ l depositándose en un tubo de microcentrífuga de 0.5 μ l para complementar con 10 μ l de Azul de Tripán (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) y homogenizar por pipeteo para depositar 10 μ l en una cámara de Neubauer. El conteo de las células fue realizado en un microscopio Axiostar Plus a 100 \times . La suspensión celular fue centrifugada a 1,700 X g durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Alemania). Para determinar el número total de células fue usada una cámara de Neubauer y la fórmula:

Número total de células = $\bar{X} (4) \times 0.25 \times 2 \times 10,000 \times \text{ml}$.

Donde 4 es el número de cuadrantes grandes contados, y 2 es el factor de dilución, que es obtenido por volumen final entre el volumen inicial.

Es importante señalar que sólo fueron contadas las células refringentes, ya que son las que se consideraron viables, sin tomar en cuenta a las células teñidas de azul.

6.2.- Infección de macrófagos y tratamientos experimentales

A partir de la solución de macrófagos J774A.1 fueron tomados 300 µl con 1×10^4 células, y se colocaron en microplacas de cultivo celular de 8 pozos (Lab-Tek® II, Thermo Fisher Scientific Inc., Nueva York, EUA) durante 24 horas bajo las condiciones de cultivo estándar. Para evidenciar la capacidad fagocítica se utilizó citocalasina D de *Zygosporium mansonii* (Sigma-Aldich, St. Louis, MO, EUA) a una concentración 1 mg/ml.

Los tratamientos aplicados durante la presente investigación se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos aplicados a los macrófagos J774A.1.

Con citocalasina D ¹	Sin citocalasina D ²
MØ (Control negativo)	MØ + <i>E.c.</i> (Control positivo)
MØ + LPS + <i>E.c.</i>	MØ + LPS + <i>E.c.</i>
MØ + INF- γ + <i>E.c.</i>	MØ + INF- γ + <i>E.c.</i>
MØ + INF/LPS + <i>E.c.</i>	MØ + INF/LPS + <i>E.c.</i>
MØ + <i>Dec-1</i> + <i>E.c.</i>	MØ + <i>Dec-1</i> + <i>E.c.</i>
MØ + <i>Tfr-1</i> + <i>E.c.</i>	MØ + <i>Tfr-1</i> + <i>E.c.</i>
MØ + <i>Tfr-2</i> + <i>E.c.</i>	MØ + <i>Tfr-2</i> + <i>E.c.</i>
MØ + <i>Lox-1</i> + <i>E.c.</i>	MØ + <i>Lox-1</i> + <i>E.c.</i>

¹ Fueron tomados como controles células sin estimular y sin anticuerpos y un grupo de macrófagos estimulados únicamente con citocalasina D. ² El segundo grupo fue tratado bajo las mismas condiciones, sin agregar citocalasina D. Concentración LPS: 50ng/ml, concentración INF- γ : 100ng/ml. (MØ: macrófagos murinos, LPS: lipopolisacárido, INF- γ : interferón gamma, *Dec-1*: dectina 1, *Tfr-1*: transferrina 1, *Tfr-2* transferrina 2, *Lox-1*: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas).

Transcurridos 30 minutos de la aplicación de los tratamientos, las células se infectaron con esporas de *E. cuniculi* a una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Se usaron

como controles macrófagos sin estimular. A las 24 horas posteriores las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con hematoxilina y eosina (H y E).

Para observar si había un efecto en la pre-estimulación del macrófago sobre la expresión en presencia de esporas, las células se activaron con INF- γ y LPS. Los macrófagos fueron pre-estimulados por 22 horas antes de la infección y el tratamiento se mantuvo durante la infección.

6.2.1.- Cuantificación de vacuolas parasitóforas y esporas internalizadas

La espora de *E. cuniculi* puede internalizarse en la célula hospedadora eficientemente mediante la fagocitosis, por lo que se planteó demostrar si es capaz de germinar desde el interior del fagosoma de la célula hospedadora, evaluando así el método de invasión predominante. Para descartar esta hipótesis, se empleó citocalasina D para impedir la fagocitosis de la espora, y examinar más a fondo el papel de los receptores celulares durante la infección por microsporidios. Para ello, los anticuerpos se añadieron directamente al cultivo celular antes de la infección con esporas, y se cuantificó el número de vacuolas parasitóforas (VP) y esporas internalizadas (EI) 24 horas después de la infección.

El número de VP y EI fueron determinados a partir del conteo de 100 células por campo, en un microscopio (Primo Star, Carl Zeiss, Gotinga, Alemania) a un aumento de 100 \times . Las cuantificaciones independientes de las VP y las EI se realizaron bajo el siguiente planteamiento:

Las VP fueron internalizadas a la célula hospedadora mediante el uso de receptores; y para este no se tomaron en cuenta las esporas internalizadas sin replicar ya que posiblemente fueron fagocitadas. Sin embargo, para el conteo de las EI se tomó en cuenta bajo la hipótesis de que la replicación de la espora no se llevó a cabo al no mostrar evidencias de la formación de VP, por lo que solo hubo internalización, ya sea por la vía activa o pasiva.

6.3.- Infección de macrófagos para la extracción de ARN

Se realizó el desafío de los macrófagos J774A.1 en cajas de cultivo celular de 25 cm² a una confluencia del 80% los cuales fueron pre-estimuladas por 22 horas con INF- γ y LPS a concentraciones de 50 y 100 ng/ml, respectivamente; transcurrido este tiempo fueron infectados con esporas de *E. cuniculi*, a una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1. Posteriormente se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 30 minutos. Una vez que transcurrió el tiempo necesario para la fagocitosis, se les realizaron 3 lavados con PBS 1x para remover esporas extracelulares. Como controles se usaron macrófagos sin estimular y sin infectar, para usarse como comparaciones válidas.

6.3.1.- Extracción de ARN

La extracción del ARN se llevó a cabo siguiendo el método de paso simple de Chomczynski (1993) decantándose el medio de cultivo de las cajas de 25 cm² agregando 2 ml del reactivo de lisis celular RNazol[®], Tiocianato de guanidina (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, OH, USA). Esta suspensión se homogenizó con una pipeta de transferencia estéril para depositar 1 ml del lisado celular en 2 microtubos (Eppendorf[®]) de 1.5 ml, después de 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada mililitro de RNazol para mezclarse vigorosamente, e incubar por un periodo de 5 a 15 minutos para centrifugar a 12,000 X durante 15 minutos. La fase acuosa (0.7 ml) se transfirió a microtubos nuevos agregando 0.5 ml de isopropanol y se mezcló invirtiendo el microtubo, para incubar durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente para permitir la precipitación, y volver a centrifugar a 1,200 X g durante 10 minutos a 4 °C. Al finalizar la centrifugación se observó la presencia del sedimento celular en el fondo del tubo, por lo que se decantó cuidadosamente el sobrenadante para no perder el RNA, lavando con etanol al 75% con uso de un Vortex Mixer. Posteriormente se centrifugó a 7,500 X g durante 5 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante con exceso de etanol. Este proceso fue repetido dos veces más. El sedimento celular obtenido se dejó secar al aire libre para resuspenderse en agua libre de nucleasas. Las muestras se dejaron incubar a 60 °C durante 10 a 15 minutos en una termoplaca AccuBlock[™] (Labnet[®], Taiwan) para

cuantificar su pureza y concentración por espectrofotometría mediante el uso de EPOCH™ (BioTek Instruments GmbH) usando el programa Gen5. Para su conservación, se hicieron alícuotas a una concentración de 2.5 µg de ARN manteniéndose a -80 °C hasta su uso.

6.3.2.- Cuantificación de ARN mensajero

Tabla 2. Concentración de ARN (DO 260/280)¹.

Tratamiento	Concentración ng/µl	Pureza 260/280
MØ + <i>E. cuniculi</i>	625.941	1.980
MØ + LPS	710.489	2.083
MØ + INF	842.273	2.075
MØ + LPS + <i>E. c.</i>	837.512	2.052
MØ + INF + <i>E. c.</i>	892.332	2.008
MØ + INF/LPS + <i>E. c.</i>	724.975	1.987

¹ Se muestran las lecturas de la concentración y pureza del ARNt que se obtuvieron. La pureza y concentración de la extracción mostraron una variación de 1.980 a 2.083 y de 625.941 a 892.332 ng/µL respectivamente. (DO: densidad óptica).

6.3.3.- Síntesis de ADN complementario (ADNc)

El ADN complementario se sintetizó *in vitro* a partir de ARN mensajero (ARNm) usando un kit de transcripción reversa (PROMEGA® GoScript™ Reversion Transcription Mixes, Madison, WI, EUA) en un volumen final de 25 µl por reacción, mezclando las siguientes soluciones: DNTPs (1 µl), AMV Reaction Buffer (10 µl), MgSO₄ (2 µl), AMV transcriptasa reversa (1 µl), ADN polimerasa (1 µl), templado de ARN (2.5 µg) y se agregó agua libre de nucleasas hasta alcanzar el volumen necesario. Las muestras se colocaron en el termociclador para ser procesadas a 45 °C durante 45 minutos para la transcripción reversa y a 95 °C durante 2 minutos para la inactivación de la enzima y desnaturalización de ARN/ADN/oligonucleótido. El volumen final se ajustó a 500 µl con agua libre de nucleasas y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.3.4.- Cuantificación de ARNm de receptores y citocinas por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Q-PCR)

Fueron evaluados los candidatos potenciales a la interacción de la espora con la célula hospedadora mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) utilizando macrófagos incubados con INF- γ y LPS y células no tratadas.

Para la detección de los transcritos de citocinas y receptores, así como para los controles internos se diseñaron los oligonucleótidos específicos mediante el programa IDT's PrimerQuestSM desarrollado por Whitehead Institute for Biomedical Research (Tabla 3). El PCR en tiempo real se realizó en un equipo Applied Biosystems (ABI) 7300 usando SYBR[®] Green I (10,000X Cambrex Bio Science Rockland Inc USA) como sistema de detección. La reacción de amplificación se realizó a base de 4 μ l de mix SYBR[®] Green, 1.5 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de dNTPs 0.2 μ l de Taq polimerasa y 8.5 μ l de agua libre de nucleasas más 0.2 μ l de cada iniciador (sentido y antisentido) y 5 μ l de cDNA en un volumen final de 20 μ l. El ciclo de síntesis empleado consistió en un ciclo inicial a una temperatura de 50 °C por 2 minutos, un ciclo de activación de la polimerasa a 95 °C seguido de 40 ciclos con una temperatura de desnaturalización a 95 °C por 30 s seguido de una alineación de 55 °C por 30 s para una extensión a 72 °C por 45 s. Al finalizar, la temperatura se incrementó de 60 °C a 95 °C para construir la curva de disociación (Melting curve). Se colocó una reacción control sin template (NTC, por sus siglas en inglés) de ADNc en cada placa y cada muestra se ejecutó por triplicado.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos para las citocinas y receptores analizados.

Gen ¹	Sentido	Antisentido	Número de referencia NCBI ²
<i>β-actina</i>	5'- GAG GTA TCC TGA CCC TGA AGT A -3'	5'- CAC ACG CAG CTC ATT GTA GA -3'	NM_007393.5
<i>Gpd1</i>	5'- CCT ACT GCT GAC CTT TCT TCT C -3'	5'- GCC CTG AGG ACG ATA AAC TAT AA -3'	NM_010271
<i>Tnf-α</i>	5'- TTG TCT ACT CCC AGG TTC TCT -3'	5'- GAG GTT GAC TTT CTC CTG GTA TG -3'	NM_001278601.1
<i>Mcp-1</i>	5'- TTA CAC CTG TGG CCC TTA TTT -3'	5'- CTG AGT AGC AGA TGA CCA TGA -3'	NM_009915.2
<i>Mip-1</i>	5'- GAA GAT TCC ACG CCA ATT CAT C	5'- GAT CTG CCG GTT TCT CTT AGT C -3'	NM_011337.2
<i>Mhc-II</i>	5'- GTC TCA GAC TGT AAG ACC TGA ATG-3'	5'- GCT GAG GTG GTG GAT ACA ATA G-3'	NM_207105.3
<i>Tfr-1</i>	5'- TCC TGT CGC CCT ATG TAT CT -3'	5'- CGA AGC TTC AAG TTC TCC ACT A -3'	NM_001164406.1
<i>Tfr-2</i>	5'- GTG TGT AAG GGT CTC CAG TTC -3'	5'- GGT TCA AGG AGT GCT GAT ATA C -3'	NM_015799.4
<i>Tlr-2</i>	5'- CAC TAT CCG GAG GTT GCA TAT C -3'	5'- GGA AGA CCT TGC TGT TCT CTA C -3'	NM_011905.3
<i>Tlr-4</i>	5'- AGT ATC GAG AGG CTC AGG TAT AG -3'	5'- TAC AGG ATG CAG GAC AAG TAA TC -3'	NM_021297.3

¹*β-actina*: beta actina, *Gpd-1*: glycerol-3-fosfato deshidrogenasa uno, *Tnf-α*: factor de necrosis tumoral alfa, *Mcp-1*: proteína quimiotáctica del macrófago uno, *Mip-1*: proteína inflamatoria del macrófago uno, *Mhc-II*: complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos, *Tfr-1*: receptor de transferrina uno, *Tfr-2*: receptor de transferrina dos. ² NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

6.3.5.- Método de cuantificación de la expresión génica mediante Q-PCR

Para la presente investigación se empleó el método de cuantificación relativa, que consiste en comparar el CT (ciclo de umbral) de la muestra desconocida con una muestra calibradora que sirve como referencia fisiológica (muestras provenientes de células no infectadas y no estimuladas). Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado con tres repeticiones y fueron normalizadas con un control endógeno, en este caso *Gpd1* 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. Las ecuaciones para calcular $\Delta\Delta^{CT}$ para el método de cuantificación relativa son:

$$CT \text{ de la muestra} - CT \text{ } Gpd-1 = \Delta^{CT}.$$

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

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

6.4.- Análisis estadístico

Los datos de los ensayos de la capacidad fagocítica del macrófago fueron analizados utilizando *t* de *Student* con una comparación de medias de *Bonferroni*.

Los datos de cuantificación de vacuolas parasitóforas, esporas internalizadas y expresión génica fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de comparación múltiple de *Dunnnett*.

Cada experimento fue realizado por triplicado y de forma independiente.

Para la generación de gráficos fue empleado el programa GraphPad Prism 4.

7.- RESULTADOS

7.1.- Determinación de la ruta de infección predominante de *E. cuniculi* en macrófagos murinos

La internalización de esporas (EI) y la formación de vacuolas parasitóforas (VP) se cuantificaron como indicador de la ruta de infección predominante de *E. cuniculi*, con la finalidad de verificar si la producción de VP es dependiente de fagocitosis; por lo que se empleó citocalasina D a una concentración 1mg/ml con la finalidad de inhibir la polimerización de los filamentos de actina para impedir el proceso fagocítico del macrófago. Se observan células sanas, así como vacuolas parasitóforas en células afectadas (flechas) y cambios morfológicos como la elongación de pseudópodos y agrandamiento celular (Figura 2).

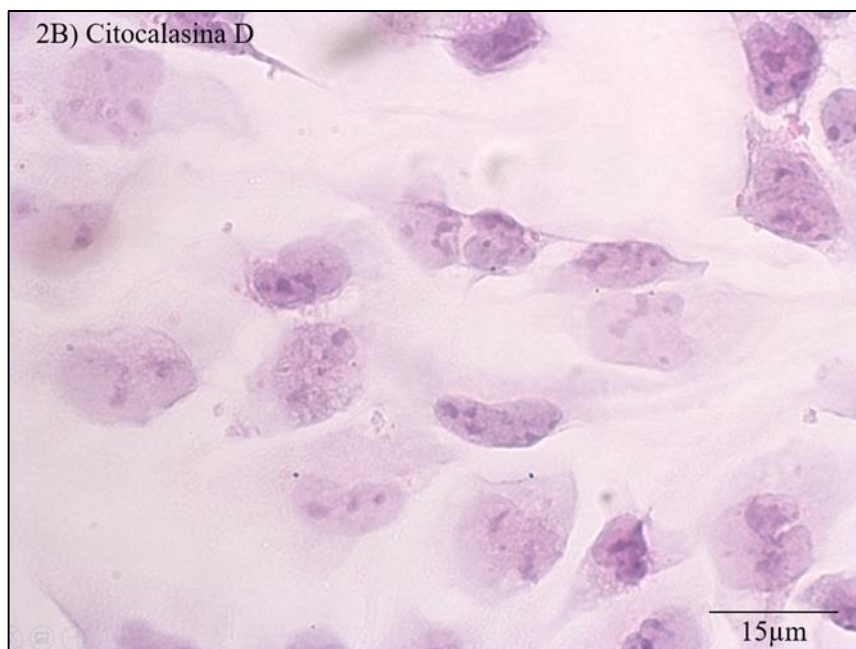
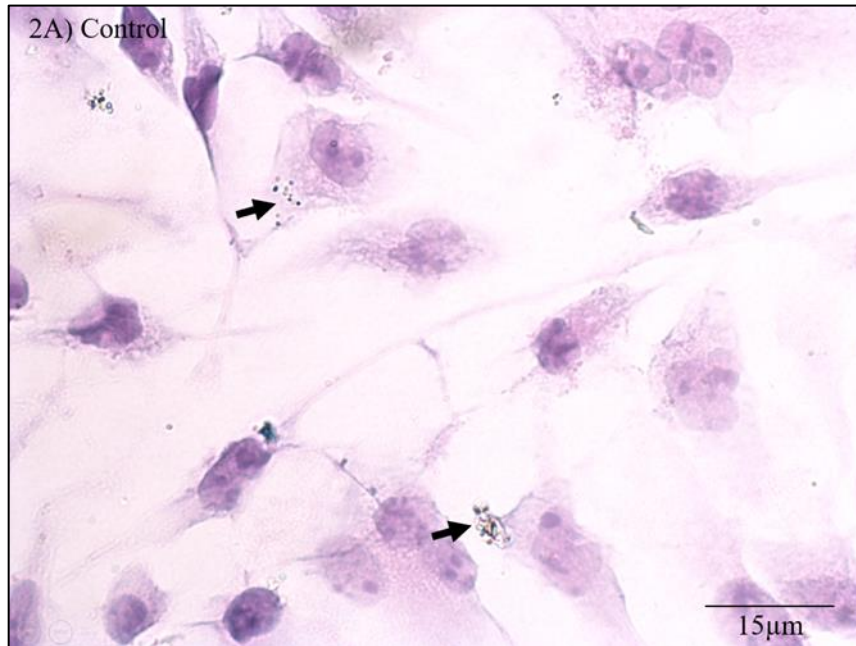


Figura 2. Macrófagos J774A.1 infectados con *E. cuniculi*. 2A) Como control se utilizaron macrófagos infectados con esporas de *E. cuniculi* sin bloquear, ni activar. 2B) Como control positivo se utilizaron macrófagos infectados con *E. cuniculi* y tratados con citocalasina D. H&E. Microscopio de luz 100x.

Como control negativo se utilizaron células J774 infectadas con *E. cuniculi* (MØ + *E.c.*) donde el número de VP fue de 4.66 en promedio, mientras que para el control positivo se adicionó citocalasina D (MØ + Cito. D + *E.c.*), donde el promedio de la formación de VP fue de 2.00 (Figura 3); es decir, se observó una reducción en la internalización de la espora de un 42% con respecto a las células no bloqueadas, lo que demuestra que la disminución de la fagocitosis fue exitosa.

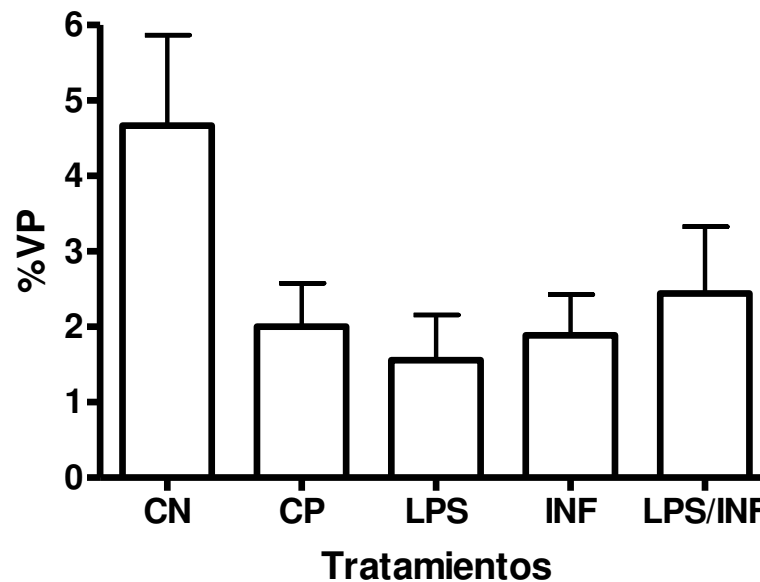


Figura 3. Efecto de la estimulación y activación de macrófagos infectados con *E. cuniculi* durante la acción de la citocalasina D. Las células fueron activadas con LPS y/o INF para posteriormente ser infectadas con esporas. Se evaluó el efecto de los diferentes tratamientos con LPS e INF. (VP: vacuola parasitófora, CN: control negativo, macrófagos sin citocalasina D, CP: control positivo, macrófagos con citocalasina D, LPS: lipopolisacárido, INF: interferón gamma de ratón).

7.2.- Efecto de la citocalasina D sobre el índice de internalización de esporas bajo diferentes esquemas de activación o estimulación celular

Una vez que se demostró bajo el efecto de la citocalasina D los macrófagos disminuían su capacidad fagocítica, se procedió a activarlos por la vía clásica mediante la incubación con interferón gamma recombinante de ratón (INF- γ) y lipopolisacárido (LPS) a concentraciones de 100 ng/ml y 50 ng/ml, respectivamente. En la Figura 4 puede

observarse que el número de VP no difiere significativamente ($P > 0.05$) entre células activadas mediante LPS o INF- γ comparadas con el tratamiento control (MØ + *E.c.*), es decir sin activación celular y bloqueados con citocalasina D; sin embargo, todos los tratamientos redujeron significativamente ($P < 0.05$) la formación de VP respecto al control (MØ + *E.c.*) cuando las células fueron expuestas a la citocalasina D. Por ejemplo, se observó una disminución en la formación de VP del 42.85% cuando fueron incubadas con citocalasina D, mientras que con LPS e INF- γ y una combinación de INF- γ y LPS los porcentajes de disminución fueron de 33.33, 40.47 y 52.38 respectivamente. Nótese la disminución en la formación de VP por efecto de la citocalasina D, independientemente del estimulante (Figura 3).

En la Figura 4 puede apreciarse que los diferentes tipos de activación del macrófago no afectaron la internalización de la espora, lo que puede sugerir que *E. cuniculi* no es internalizado mediante receptores asociados al tipo de activación, ya que no se observaron diferencias significativas en el número de VP de células activadas y no activadas por esta vía.

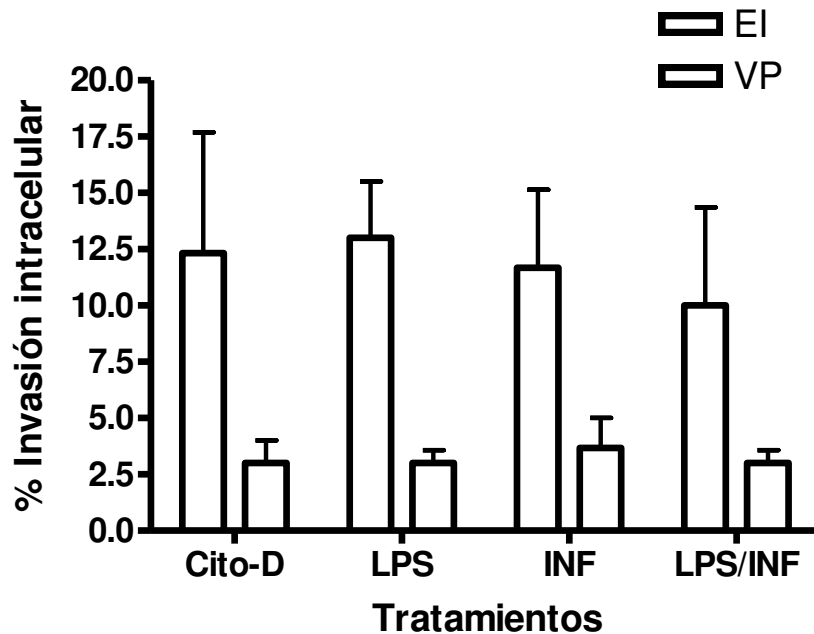


Figura 4. Porcentaje de invasión intracelular de EI y VP de macrófagos incubados con citocalasina D. Previo a la infección con esporas de *E. cuniculi* se realizó la estimulación y activación celular por medio de LPS e INF. (EI: esporas internalizadas, VP: vacuolas parasitóforas, LPS: lipopolisacárido, INF: interferón gamma).

7.3.- Evaluación del efecto del bloqueo de receptores asociados a la infección por *E. cuniculi*

Debido a que se observó que el proceso de fagocitosis no determina la presencia de VP, se evaluó el efecto del bloqueo de receptores que pueden estar asociados al proceso de infección por *E. cuniculi*; se consideraron el receptor de dectina 1 (*Dec-1*), el receptor de transferrina 2 (*Tfr-2*), el receptor scavenger A (*Sr-A*) y el receptor de lipoproteínas de baja densidad tipo lectina (*Lox-1*).

El promedio del tratamiento con el bloqueo del receptor de *Dec-1* fue de 3.66, para el de *Tfr-2* fue de 5.44, mientras que para *Sr-A* fue de 3.77, y el de *Lox-1* de 3.11. Ninguno de los tratamientos mostró diferencias significativas con respecto al control positivo (MØ + *E.c.*) (Figura 5), esto indica que las diferencias respecto al control fueron de 21.42 para *Dec-1*, 16.66 para *Tfr-2*, 19.04 para *Sr-A* y de 33.33 para *Lox-1*.

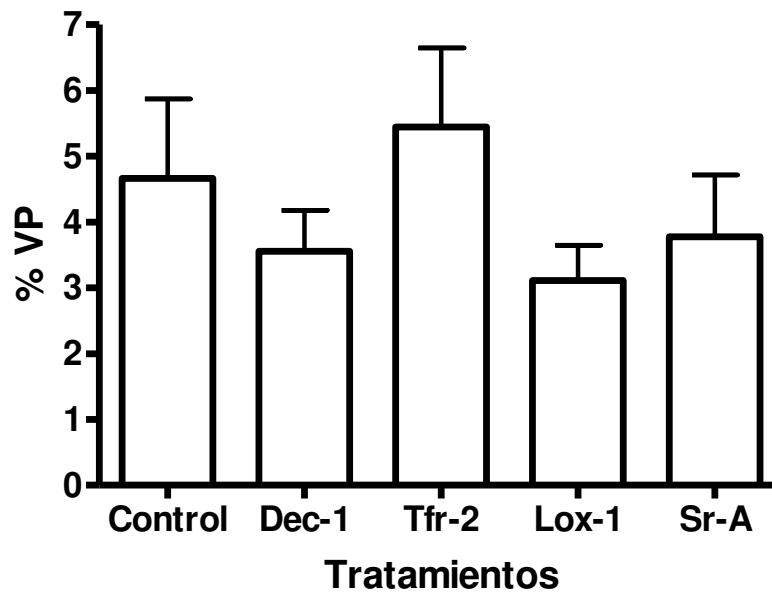


Figura 5. Bloqueo de receptores asociados a la infección por *E. cuniculi*. No estimulado, sin diferencias. (VP: vacuola parasitófora, *Dec-1*: dectina 1, *Tfr-2*: transferrina-2, *Lox-1*: lipoproteínas de baja densidad, *Sr-A*: scavenger A).

7.4.- Efecto de la citocalasina D sobre el índice de internalización de esporas en macrófagos bloqueados con anticuerpos contra receptores

En la Figura 6 pueden observarse los experimentos de bloqueo de anticuerpos para los receptores de superficie en macrófagos que conservan su capacidad fagocítica junto con macrófagos sin capacidad fagocítica, empleando citocalasina D.

Similar a lo que se vio con el bloqueo de las células pre estimuladas, la infección disminuyó en células que se les aplicó citocalasina D ($M\emptyset + \text{Cito. D} + E. c. = 2.00$) comparadas con células con capacidad fagocítica ($M\emptyset + E. c. = 4.66$), ya que hubo una reducción del 42% en la internalización de *E. cuniculi*. Se observó en el tratamiento con citocalasina D en macrófagos con Dectina ($M\emptyset + Dec-1 + \text{Cito. D} + E. c.$) un promedio de 2.00 VP y de 3.66 para los macrófagos cuya membrana no fue bloqueada ($M\emptyset + Dec-1 + E. c.$); observándose una diferencia del 54% entre macrófagos con y sin citocalasina D. para el receptor de *Tfr-2* no hubo diferencias en el número de VP entre macrófagos tratados y no tratados con citocalasina D.

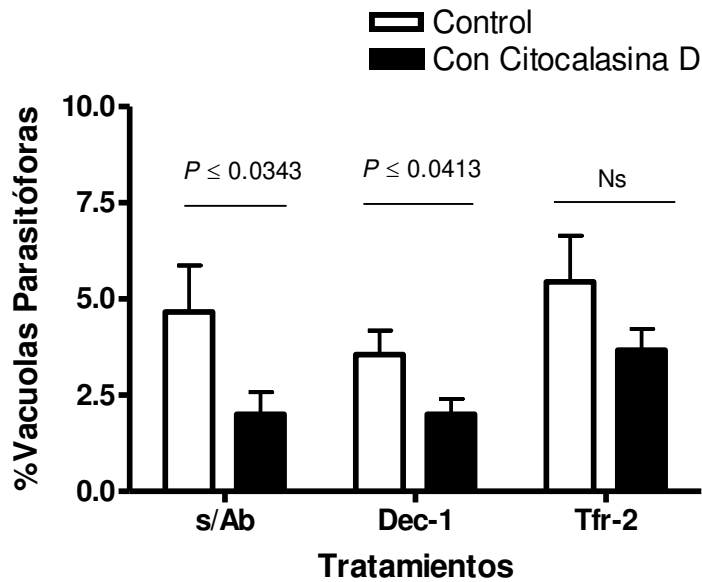


Figura 6. Comparación de tratamientos con y sin citocalasina D. Se observa la internalización de *E. cuniculi* en células J774A.1 bloqueadas con anticuerpos para los receptores de *Dec-1* y *Tfr-2* (VP: vacuola parasitófora, Ab: anticuerpo, *Dec-1*: dectina 1, *Tfr-2*: transferrina 2, Ns: no significativo).

7.5.- Efecto de *E. cuniculi* sobre la expresión de receptores y citocinas de respuesta inmune innata

En las células infectadas la expresión del ARNm para los receptores de *Tfr-1*, *Tfr-2*, *Tlr-2* y *Tlr-4* en promedio se incrementó 0.6593, 0.2431, 0.7400 y 0.8998 respectivamente, comparados con macrófagos no estimulados y no infectados (expresión basal) (Figura 7). Por otra parte, es importante mencionar que la expresión de la proteína quimiotáctica del macrófago (*Mcp-1*) tuvo una expresión positiva con respecto a la proteína inflamatoria del macrófago (*Mip-1*); que se expresan en promedio de 0.9143 y 3.4004 respectivamente.

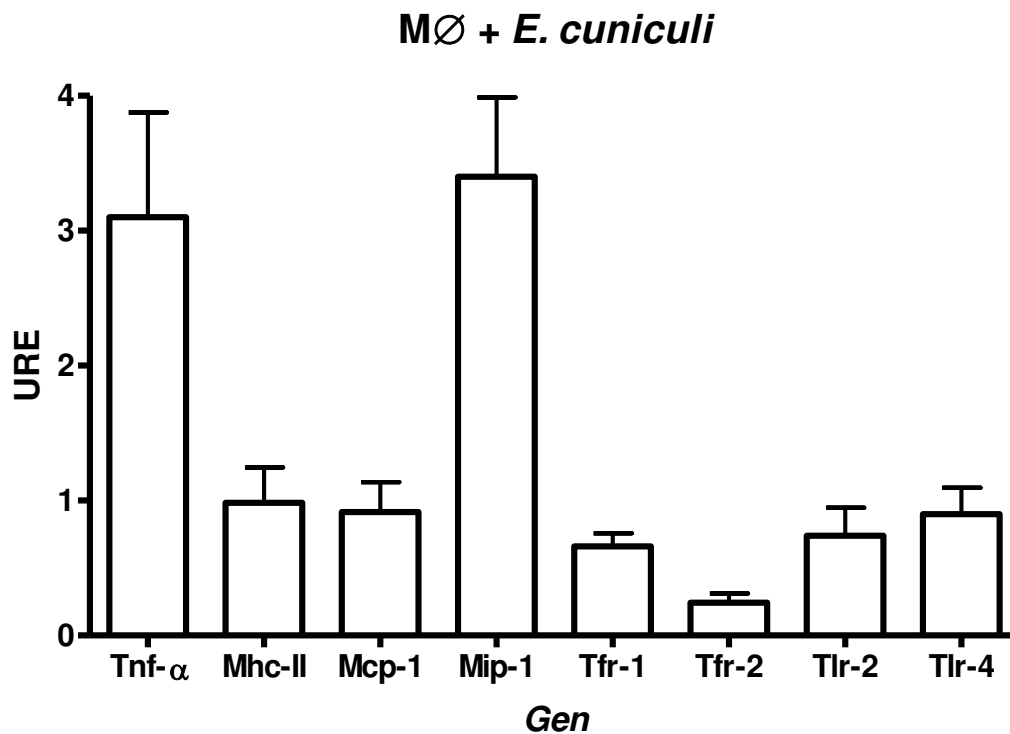


Figura 7. Efecto de *E. cuniculi* en células J774A.1 sobre la expresión de las citocinas y receptores evaluados. (URE: Unidades Relativas de Expresión, *Tnf- α* : factor de necrosis tumoral alfa, *Mhc-II*: complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos, *Mcp-1*: proteína quimiotáctica del macrófago, *Mip-1*: proteína inflamatoria del macrófago, *Tfr-1*: transferrina 1, *Tfr-2*: transferrina 2, *Tlr-2*: receptor tipo Toll dos, *Tlr-4*: receptor tipo Toll cuatro).

7.6.- Efecto de la estimulación del macrófago en presencia de *E. cuniculi*

Los resultados indicaron que la estimulación con LPS aumenta la expresión de las citocinas y receptores analizados en presencia de *E. cuniculi*, en cambio, cuando son estimulados con INF- γ en presencia de la espora hay una disminución con respecto al LPS. Para el tratamiento con LPS la expresión del receptor de *Tfr-1* en presencia de la espora fue de 0.7319, mientras que para INF- γ fue de 0.2149 bajo las mismas condiciones de infección (Figura 8), para el resto de los genes la expresión bajo los mismos estimulantes es similar y se resumen en la Tabla 4. La estimulación con LPS aumenta la expresión con los receptores y citocinas aun en presencia de *E. cuniculi*, en cambio, cuando son estimulados con INF- γ en presencia de la espora hay una disminución con respecto al LPS.

Tabla 4. Expresión de los genes evaluados bajo los tratamientos de activación celular.

Gen ¹	Tratamientos		Diferencias
	MØ + LPS + <i>E. c.</i> ²	MØ + INF- γ + <i>E. c.</i> ²	
<i>Tnf-α</i>	4.2189	1.9867	2.2322
<i>Mhc-II</i>	2.9772	0.1741	2.8031
<i>Mcp-1</i>	0.7989	0.1757	0.6232
<i>Mip-1</i>	1.6247	0.3604	1.2643
<i>Tfr-1</i>	0.7319	0.2149	0.5170
<i>Tfr-2</i>	0.3299	0.0782	0.2518
<i>Tlr-2</i>	0.6207	0.1801	0.4406
<i>Tlr-4</i>	0.6615	0.1920	0.4695

¹ *Tnf- α* : Factor de necrosis tumoral alfa, *Mhc-II*: Complejo mayor de histocompatibilidad tipo dos, *Mcp-1*: Proteína quimiotáctica del macrófago uno, *Mip-1*: Proteína inflamatoria del macrófago uno, *Tfr-1*: Receptor de transferrina 1, *Tfr-2*: Receptor de transferrina dos, *Tlr-2*: Receptor tipo Toll dos, *Tlr-4*: Receptor tipo Toll cuatro.

²MØ: Macrófago, LPS: Lipopolisacárido, INF- γ : Interferón gamma, *E. c.*: *Encephalitozoon cuniculi*.

Todos los valores son mostrados en URE (Unidades Relativas de Expresión).

Receptores

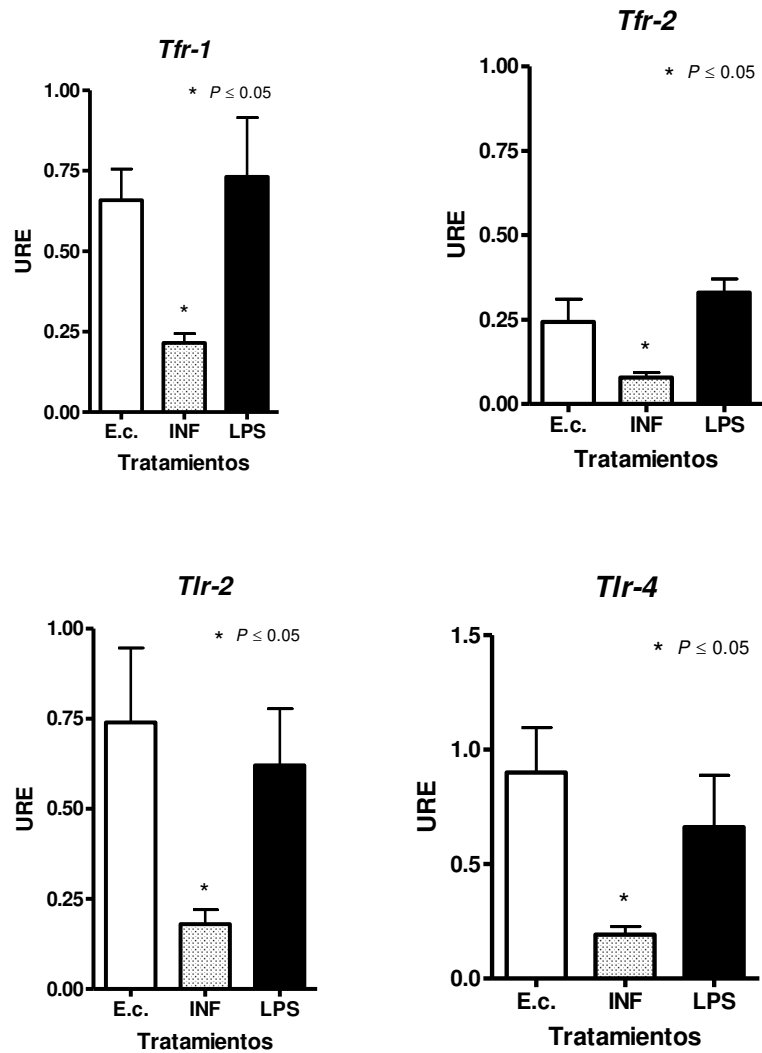


Figura 8. Efecto de la estimulación del macrófago en presencia de *E. cuniculi* para los receptores de *Tfr-1*, *Tfr-2*, *Tlr-2* y *Tlr-4*. La estimulación con LPS aumenta la expresión con los receptores aún en presencia de *E. cuniculi*, en cambio, cuando son estimulados con INF en presencia de la espora hay una disminución con respecto al LPS. (URE= Unidades Relativas de Expresión).

7.7.- La activación con LPS promueve una mayor expresión de receptores y citocinas de respuesta inmune innata

En macrófagos murinos estimulados con LPS existe un efecto mayor sobre la expresión de los mensajeros de *Mcp-1*, *Mhc-II*, *Tfr-1*, *Tfr-2* y *Tlr-4* ya que se observó un aumento al ser desafiados con *E. cuniculi*, así como al ser activados con LPS. En el caso de *Mip-1* muestra una expresión superior con la activación con LPS disminuyendo en presencia de *E. cuniculi*. *Tnf- α* aumenta su expresión solamente al estar en presencia de la espora, caso contrario de la expresión del resto de los genes, que aumentan considerablemente con la previa activación del macrófago con LPS. Mientras tanto, la activación del macrófago con INF- γ no tuvo un efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la expresión de dichos genes en presencia de la espora, ya que dicha estimulación parece disminuir la expresión de los receptores evaluados (Figura 9). La activación del macrófago con LPS aumenta la expresión de citocinas del sistema inmune innato para facilitar la replicación de *E. cuniculi*.

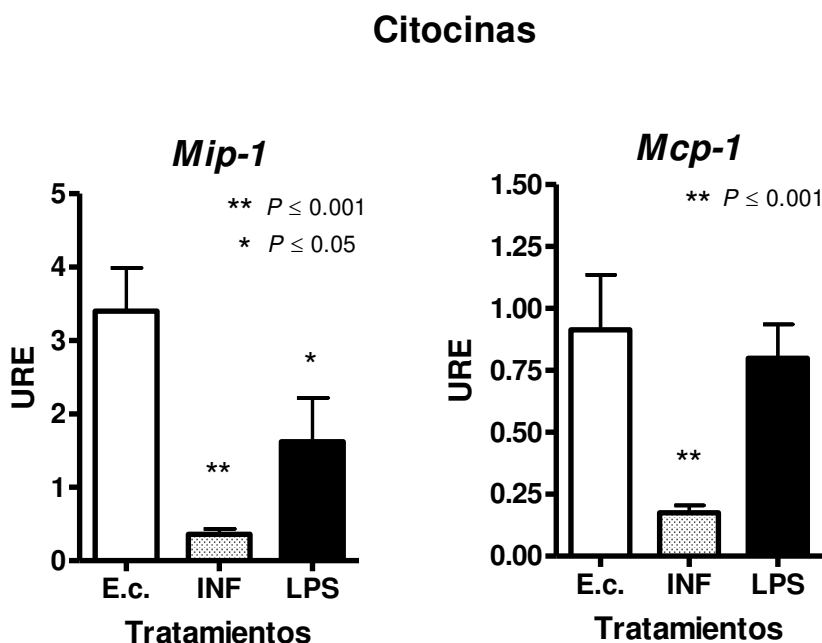


Figura 9. Efecto de la estimulación del macrófago en presencia de *E. cuniculi* para las citocinas *Mcp-1* y *Mip-1*. (URE: Unidades Relativas de Expresión).

8.- DISCUSIÓN

Encephalitozoon cuniculi posee diversos mecanismos de invasión celular; además de la diacitosis, una proporción notable de esporas de *E. cuniculi* obtiene acceso a la células huésped por mecanismos de fagocitosis no convencionales, por lo que en la presente investigación se disminuyó la internalización de las esporas mediante la inhibición de la polimerización de actina, con el uso de citocalasina D para bloquear la membrana del macrófago, impidiendo la captación de esporas mediante fagocitosis. Sin embargo, se observó la presencia de esporas internalizadas, lo que puede indicar el empleo de otros métodos de internalización de esporas como mecanismos de invasión dependientes de receptores y el estado de activación del macrófago como lo observado por Foucault y Drancourt (2000).

Al analizar los resultados donde los macrófagos fueron tratados con citocalasina D, se observó que la internalización de *E. cuniculi* disminuyó un 30%, considerando que el 70% restante corresponde a la internalización o invasión mediada por la espora, dichas observaciones son similares a los reportado por Couzinet et al. (2000), donde ellos compararon la tasa de internalización y de absorción de *E. cuniculi* en células fagocíticas profesionales en contraste con células fagocíticas no profesionales como las células epiteliales de pulmón, fibroblastos pulmonares y células embrionarias de riñón fueron del 0,6, 4,4 y 22,2%, respectivamente, mientras que en los monocitos de sangre periférica observaron un 40% de fagocitosis en ausencia de Citocalasina D. Kazuyasu y sus colaboradores (2012) compararon el efecto de la citocalasina D sobre el proceso de invasión observaron una reducción del 95%, sin encontrar diferencias con respecto a la viabilidad de la espora (viva o muerta). Estos datos contrastan con los resultados de nuestra investigación donde la reducción fue de un 30% únicamente, dichas diferencias pueden deberse al tipo de observaciones realizadas, ya que este porcentaje reportado en este estudio corresponde a vacuolas parasitóforas (VP). Por otra parte, Orlik y sus colaboradores (2010) mencionaron que el tratamiento con citocalasina D resultó en una disminución de las esporas internalizadas a menos del 10% de las muestras control en células J774 estimuladas con LPS, esto representa un 20% menor a lo reportado en esta investigación mientras que la mayoría de las investigaciones reportan sólo esporas

fagocitadas. En esta investigación fueron contabilizadas las vacuolas parasitóforas, ya que es la forma replicativa *E. cuniculi* y así mostrar aquellas que mantenían su capacidad infectante sin disminuir su capacidad de replicación, considerando que el proceso de internalización podía disminuir o afectar su capacidad de reproducirse de forma intracelular. Adicionalmente, Franzen (2005) señaló que la fagocitosis de las esporas es al menos diez veces más frecuente que la inyección de esporoplasmas, y que algunas esporas extruyen su tubo polar dentro de las células después de la fagocitosis. Estos datos confirman por una parte la importancia del proceso fagocítico y el papel que la polimerización de las fibras de actina tienen sobre la captación de antígenos o patógenos, y por otra parte que las esporas de *E. cuniculi* pueden extruir el túbulo polar aun dentro de la célula que la ha fagocitado previamente. Por lo tanto, el número de esporas fagocitadas puede no ser un indicativo del estado real de infección siendo, esto porque en la presente investigación se observaron esporas, las cuales eran carentes del esporoplasma, o que en su caso pudieron ser fagocitadas después de haber extruido su túbulo polar y transferir su contenido infeccioso, mientras que al contabilizar las vacuolas parasitóforas puede ser una valor más real del estado infectante de la espóra y la evasión de la respuesta inmune innata por parte de la célula hospedadora.

La adhesión de bacterias a las células se ha sugerido como uno de los pasos cruciales en la diseminación de microorganismos a otros órganos a través del torrente sanguíneo ya sea al unirse a células endoteliales o al ser transportadas a través de células fagocíticas permitiendo así su diseminación por diapédesis (Kerr et al., 1999; Joh et al., 1999; Rich et al., 1999; Palma., Haggard & Flock, 1999); tal podría ser el caso de *E. cuniculi* y su interacción con macrófagos, ya que se observó que a pesar del bloqueo de la membrana de la célula huésped y los posibles receptores que participan en el proceso de invasión, se observó la formación de VP, lo que indica una infección exitosa.

Además de las bacterias, la endotoxina bacteriana, componentes de la pared bacteriana como el LPS, son ligandos de Receptores tipo scavenger, entre ellos Scavenger-A, sin embargo, aunque *Lox-1* no se une significativamente al LPS, es uno de los receptores clave en la opsonización de moléculas ricas en glucoproteínas como en este caso las

contenidas en la exospora de *E. cuniculi*. Donde observamos que en comparación con macrófagos a los cuales se les bloquearon receptores de tipo Scavenger A (*Sra-A*) mostraron una disminución en la presencia de vacuolas parasitóforas del 19% para *Sra-A* con respecto al control y al bloquear la polimerización de actina en el macrófago estas diferencias aumentaron hasta un 57% con respecto a macrófagos sin bloqueo y sin Citocalasina, por otra parte en macrófagos a los cuales se les bloqueo el receptor tipo *Lox-1* se observó una disminución del 33% con respecto al control, estos datos sugieren que la espora utiliza estos receptores para internalizarse dentro de la célula huésped e hipotéticamente evitar el paso a través de fagosomas tempranos, para tener la capacidad de extruir su túbulo polar e infectar células vecinas (Shimaoka et al., 2001; Han et al., 2017).

Por otra parte, el receptor de dectina-1 (*Dec-1*) es expresado por los fagocitos mieloides (macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) el cual tiene la capacidad de reconocer azúcares compuestas como los mananos y β -glucanos en las paredes celulares fúngicas y desencadena la actividad antimicrobiana celular incluida la fagocitosis (Goodridge, H. S., Wolf, A. J., y Underhill, D. M. 2009. Kerrigan, A. M., y Brown, G. D. 2010). Esto concuerda con nuestros resultados, donde hubo una diferencia en la formación de VP cuando el receptor de *Dec-1* fue bloqueado, lo que puede indicar que este receptor participa en la invasión de *E. cuniculi*.

Sajou y sus colaboradores (2007) generaron ratones deficientes en el receptor de dectina-1 para determinar su importancia en la defensa contra patógenos fúngicos. Mencionando que a nivel *in vitro*, la producción de citocinas por parte de células dendríticas y macrófagos deficientes en este receptor fue nula tras la inducción con β -glucanos. Mientras que a nivel *in vivo*, los ratones carentes del receptor mostraron mayor susceptibilidad a la infección por *Pneumocystis* en comparación con ratones control, a pesar de que su producción de citocinas fue normal. Sin embargo, los macrófagos carentes en dectina-1 mostraron una producción defectuosa de especies reactivas de oxígeno, concluyendo que este receptor es indispensable para las respuestas inmunes a infecciones fúngicas. Esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que hubo una disminución ($P \leq$

0.0413) en la formación de VP cuando el receptor de *Dec-1* fue bloqueado. Se sabe que este receptor participa en la inmunidad innata y el reconocimiento microbiano, y es probable que la señalización a través de algunos de estos receptores coopere con la señalización de receptores tipo Toll (*Tlr*) en la definición de respuestas inflamatorias.

En un estudio de Lawlor et al. (2010), mostraron que los receptores tipo Toll 4 (*Tlr-4*) desempeña un papel importante en la activación de CD_s esplénicas durante la infección por *E. cuniculi*, lo que resultó en el inicio de una respuesta inmune protectora. Si bien se observaron aumentos la expresión de *Tlr-4* y la expresión de proteínas de superficie en DC esplénicas, la expresión de otros TLR importantes (*Tlr-2* y *Tlr-9*) se mantuvo igual.

Actualmente se ha atribuido un papel clave a la inmunidad innata, en particular a la respuesta inicial por parte de los macrófagos, en el inicio de la respuesta inmune frente a los microsporidios. Los macrófagos reconocen las especies de *Encephalitozoon* por un receptor tipo Toll (TLR2) que resulta en la activación de NF- κ B y en la regulación positiva y secreción de varias quimiocinas que conducen al reclutamiento de monocitos indiferenciados; por lo que en nuestra investigación se basó en las quimiocinas dependientes del macrófago como lo es la Proteína Quimiotáctica del Macrófago (*Mcp-1*) y la Proteína inflamatoria (*Mip-1*). Recientemente, Lawlor *et al.*, demostró la fuerte activación por parte de células presentadoras de antígeno es dependiente de TLR4 mencionando que este receptor está altamente involucrado en la inmunidad de las células T CD8⁺ contra *E. cuniculi* (Lawlor et al., 2010) TLR2 y TLR4 reconocen patógenos fúngicos a través de fosfolipomananos y O-manan vinculados, respectivamente (van de Veerdonk, 2008), lo que sugiere que las proteínas de *Encephalitozoon* O-manosinadas y O-mannans (Xu & Weiss, 2005; Taupin et al., 2006) pueden actuar como PAMP. Los macrófagos infectados con microsporidios pueden matar al invasor intracelular o no hacerlo dependiendo del estado de pre-activación de la célula y de la existencia de mecanismos de supervivencia de parásitos los cuales son mediados de manera positiva por la expresión a nivel de superficie de estos receptores tipo Toll (Fisher et al., 2006; Fisher et al, 2007; Lanzavecchia et al.,2001). Sin embargo, en esta investigación se observó un aumento en la producción de citocinas de respuesta inmune innata en presencia de la espora y con los macrófagos activados con LPS, caso contrario a cuando fueron

estimulados por INF- γ , esto podría atribuirse a que el LPS fue reconocido como un agente externo por la célula hospedadora, mientras que el INF- γ es producido normalmente por el hospedador cuando este entra en contacto con un agente patógeno, en este caso las esporas de *E. cuniculi*, para combatir la infección.

Tanto la pared de esporas como el tubo polar forman parte del mecanismo de invasión y juegan un papel importante durante el proceso de internalización de los microsporidios. Las esporas de *E. cuniculi* desarrollaron un orgánulo de invasión especial, un tubo polar de estructura en espiral, que está compuesto por cuatro proteínas distintas del tubo polar: PTP1, una proteína rica en prolina; PTP2, una proteína rica en lisina, PTP3, una proteína grande de más de 135 kDa de tamaño, y PTP4, involucrados en una interacción directa con el huésped.

Curiosamente, PTP4 se localiza en la punta del tubo polar e interactúa con el receptor de transferrina 1 (*Tfr-1*), los cuales generalmente están asociados en la absorción de hierro en muchas células, que importan el hierro mediante la internalización del complejo de transferrina-hierro a través de endocitosis mediada por clatrina (Qian et al., 2002). Este receptor 1 de transferrina es un receptor de células huésped para la PTP4 y contribuye a la infección de esporas. En esta investigación se evaluó la participación de los receptores de transferrina *Tfr-1* y *Tfr-2*; en el caso del receptor 1 de transferrina no observamos una actividad significativa con respecto al control, sin embargo con el receptor *Tfr-2* lograron obtenerse divergencias con respecto al control en un 16.6%, estos datos sugieren que el túbulo polar tiene la capacidad de interactuar con las proteínas primarias de transferrina 1 y 2 similar a lo mencionado por otros autores, aunque en otras investigaciones solo se concentraron en los receptores 1 de transferrina y el de manosa, estos hallazgos indican que el túbulo polar tiene la capacidad de unirse a estos receptores y mediar su internalización en el macrófago mientras que en el caso del tratamiento con *Tfr-2* resultó ser el que produjo una menor internalización de esporas; mostrando solamente una diferencia del 1% de internalización entre los tratamientos con y sin bloqueo de membrana, lo que parece indicar que *Tfr-1* es uno de los receptores que utiliza *E. cuniculi* para internalizarse. Actualmente se sabe que los macrófagos usan receptores de *Tfr* para captar hierro y no dejarlo disponible para las bacterias, estos receptores también son

aprovechados por *E. cuniculi*, para captar hierro de la célula hospedadora, probablemente la misma espora promueve la expresión de receptores de transferrina para aprovechar el hierro intracelular necesario para su replicación (Han et al., 2017., Delbac et al., 1998a. Delbac et al., 1998b; Keohane et al., 1998., Peuvel et al., 2002).

A partir de los datos encontrados, aceptamos la hipótesis alterna general, que establece que la capacidad fagocítica del macrófago induce una expresión diferencial de genes asociados a la respuesta inmune innata en macrófagos murinos que fueron infectados experimentalmente con *Encephalitozoon cuniculi*.

Estos resultados guardan relación con lo que sostienen Nevárez (2017) y Franzen (2004) quienes señalan que algunas citocinas como *Tnf- α* , aumentan tras la estimulación de macrófagos con las esporas de *E. cuniculi*, similar a nuestros resultados donde su producción aumentó 3.1 veces comparado con la expresión basal. Lo que apoya la teoría de que dicho parásito puede modular la respuesta inmune innata para sobrevivir dentro de la célula hospedadora.

Estos mecanismos de sobrevivencia del microsporidio parecen ser similares a los reportados por Denkers & Butcher (2005) con el protozoario *Toxoplasma gondii*, que puede sobrevivir y proliferar en macrófagos al inhibir IL-12 y TNF- α , suprimiendo la producción de óxido nítrico, regular negativa entre las moléculas de MHC de clase II y modular al factor nuclear NF- κ B. Además, este parásito subvierte la regulación de la motilidad de las células dendríticas y utiliza este tipo específico de célula huésped como un caballo de Troya para propagarse a través del organismo similar a lo reportado por Lambert et al. (2006) y Machorro et al. (2019) para *E. cuniculi*. En los estudios de Palenzuela et al. (2014) en peces con parasitosis intestinal observaron que los macrófagos y otros fagocitos son los mecanismos de transporte, donde el microsporidio *Enterospora nucleophila* es capaz de esporular en el citoplasma de las células fagocíticas del pez conocido como la dorada (*Sparus aurata*), mientras que en los macrófagos ubicados en la submucosa y vasos sanguíneos, el parásito flagelado *Cryptobia iubilans* tiene una fase intracelular en estas células fagocíticas (Yanong et al., 2004). En ambos casos, el parásito puede vivir dentro de estas células en lugar de ser destruido por la maquinaria citosólica.

Con base en los resultados de la presente investigación, los macrófagos parecen estar involucrados tanto en la destrucción del parásito como en su diseminación, ya que esporas degradadas se observaron dentro de los macrófagos, similar a lo reportado por Palenzuela et al. (2014). No obstante, ellos mencionan una posible migración del epitelio a la submucosa de macrófagos infectados para poder extenderse a otros sitios.

En los macrófagos al ser infectados por esporas de *E. cuniculi*, se desencadena la maquinaria de señalización la cual promueve la producción de citocinas para combatir la infección. De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, se observó un aumento en la expresión de las citocinas asociadas a receptores no convencionales para este tipo de microorganismo como el *Dec-1* y *Lox-1*. Aunque los datos no fueron estadísticamente significativos ($P > 0.05$), dentro de los receptores con mayor expresión a nivel de transcritos se observó que el Receptor de Transferrina-1 es usado por parte de la espora para poder internalizarse en la célula hospedadora y así poder comenzar su ciclo de replicación. Esto es similar a los resultados obtenidos por Han et al. (2017), donde propusieron que la PTP4 de *E. hellem* puede unirse a la superficie de la célula hospedadora por medio del receptor de Transferrina-1 y otras proteínas de superficie como manosa, y así facilitar la internalización de la espora a la célula. Esto demuestra que los microsporidios precisan los receptores de Transferrina para internalizarse y poder llevar a cabo su replicación. Sin embargo, contrario a lo esperado en el presente estudio, el receptor de Transferrina-2 mostró una mayor expresión en presencia de LPS en comparación con el tratamiento donde se estimula la activación con $\text{INF-}\gamma$ ambos en presencia de la espora, entonces el efecto observado obedece a la presencia de la espora o del mecanismo de activación al cual se sometió el macrófago o si estos activadores modifican la expresión del receptor.

En esta investigación, no se observó un cambio sustancial a nivel de expresión de receptores únicamente a nivel de moléculas coestimuladoras (CMH) por efecto del LPS, sin embargo, una diferencia donde se involucró la presencia de la espora no fue observada.

En los macrófagos infectados con *E. cuniculi* se observó que para los receptores de *Tfr-1*, *Tfr-2* y *Tlr-2* se expresaron de forma positiva por efecto del patógeno; no obstante, estos receptores mostraron una mayor expresión por efecto del LPS, siendo este uno de los

mejores PRR conocidos y que probablemente la espora disminuye esta expresión aun en presencia del lipopolisacárido. Los *Tlr* son proteínas transmembranales en los mamíferos que participan en el reconocimiento de patógenos (Bautista et al., 2005), por lo que *Tlr-4* podría expresarse en presencia de *E. cuniculi*, ya que los TLR desempeñan un papel fundamental en la iniciación de la inmunidad innata, así como en la coordinación entre la inmunidad innata y adaptativa. Específicamente, *Tlr-4* distingue LPS de bacterias gramnegativas. Por ende, la expresión de *Tlr-4* indica que la espora activa vías de señalización que inducen respuestas efectoras contra patógenos y de inflamación al reconocer a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).

También se observó que en la Proteína Quimiotáctica del Macrófago (*Mcp-1*) tuvo una mayor expresión con respecto a la Proteína Inflamatoria del Macrófago (*Mip-1*). *Mcp-1* pertenece a la familia de mediadores de inmunidad natural (Duque & Rojas, 2007), cuya función es atraer células del sistema inmune, mientras que *Mip-1* es producido por los macrófagos después de que son estimulados por endotoxinas de patógenos, y conducen a la inflamación con la finalidad de atraer células de respuesta inmune y combatir la infección (Ye et al., 2012). Sin embargo, en estos ensayos se observó que *Mcp-1* suprime la expresión de *Mip-1*, lo que podría indicar que *E. cuniculi* promueve la estimulación de quimiocinas y así atraer otras células para diseminar la infección, y a su vez disminuir los procesos antiinflamatorios por parte del macrófago para evadir a las células de respuesta inmune.

Han et al. (2017) identificaron el receptor *Tfr-1* como un potencial compañero de interacción de la célula huésped para la PTP4, mientras que la alta expresión de *Tfr-2* podría indicar que es el receptor que utiliza *E. cuniculi* para internalizarse dentro del macrófago.

La presencia de *Mcp-1* es superior en macrófagos infectados con *E. cuniculi* y estimulados con LPS, probablemente esto se deba a que la espora promueve el reclutamiento de nuevas células para poder infectar a otras y replicarse. Mientras que *Mip-1* la espora promueve una reducción en la expresión, esto posiblemente porque requiere un ambiente antiinflamatorio para replicarse. MHC-II al ser una molécula que se expresa cuando hay infecciones intracelulares, precisamente bajo la activación de los macrófagos con LPS y

la infección con *E. cuniculi*, se expresa de manera natural. *Mhc-II* se estimula porque la espora es intracelular, es solamente bajo vacuolas, cuando se forma el fagolisosoma, es el receptor o molécula que se une a moléculas intracelulares por fagosoma. Con *E. cuniculi* se expresan los receptores de *Tlr* lo que indica que la espora puede promover un proceso proinflamatorio, para que lleguen más células y poderlas infectar, seguramente en conjunto de *Mip-1*.

Fisher et al. (2008) demostraron que macrófagos humanos reconocen las lipoproteínas de superficie de la espora de *E. cuniculi* a través de los receptores *Tlr-2* produciendo una señalización que favorece la producción de citocinas proinflamatorias como *Tnf- α* . Así mismo, la digestión de estos microorganismos induce al hospedador a producir INF- γ mediante linfocitos T y NK, para estimular a los macrófagos y controlar la infección por medio de la fagocitosis (Fischer et al., 2008). Estos datos contrarrestan con los obtenidos en esta investigación, ya que se observa una disminución de las citocinas de respuesta inmune innata cuando el macrófago fue estimulado con INF- γ en presencia de la espora. Datos similares son observados por Valencakova & Halanova (2012) quienes mencionan que este mecanismo resulta infructuoso si el hospedador está inmunocomprometido, lo que puede ser similar con nuestra multiplicidad de infección. Sin embargo, estos resultados parecieran contrastar los obtenidos en esta investigación, puesto que la expresión de las citocinas y receptores disminuyeron cuando los macrófagos fueron estimulados con INF- γ , no obstante, esto puede deberse al microambiente celular ausente de células co-estimuladoras como los linfocitos T y NK quienes son capaces de producir de manera constante la citocina activadora, de igual manera, el uso de una línea celular puede ser un obstáculo en el desarrollo de este tipo de investigaciones dado que va a depender del número de pase y el linaje de la cepa, en este caso al ser células a partir de ratones Balb/c es sabido que esta línea es susceptible a parásitos intracelulares. A pesar de ello, en ambos trabajos se observó un aumento de *Tnf- α* bajo todos los tratamientos. Emplear un modelo basado en cultivo celular tiene la ventaja de analizar el comportamiento individual de los macrófagos peritoneales de ratón descartando la influencia de citocinas proinflamatorias producidas por las células T o NK, es decir, los

resultados presentan únicamente una respuesta inmune de tipo innata. Las citocinas proinflamatorias como *Tnf- α* son producidas por la activación de factores de transcripción una vez que los LPS hayan sido reconocidos por los receptores *Tlr-4* y a su vez esto incrementa la motilidad de los macrófagos y favorecen la fagocitosis mediante estas citocinas proinflamatorias (Tizard, 2013).

Por lo tanto, es más común que *E. cuniculi* infecte a la célula hospedadora a través de la fagocitosis de sus esporas y que el túbulo polar sea una herramienta que le ayuda a evadir su destrucción dentro del fagolisosoma, como lo indicaron Franzen et al. (2005), y mediante el estímulo de la fagocitosis, se asegura también la infección.

Los ensayos con el bloqueo de receptores por medio de anticuerpos mostraron una disminución ($P \leq 0.0413$) en la formación de VP con el receptor de dectina (Dec-1 + cito D + *E. c.*) comparados con el tratamiento donde no hubo bloqueo de membrana celular, pero sí el bloqueo de dicho anticuerpo (Dec-1 + *E. c.*), mientras para el bloqueo del receptor de Tfr-2 no se observaron diferencias ($P > 0.05$). Sin embargo, en experimentos adicionales se observaron diferencias estadísticas en la expresión de los genes asociados a los receptores *Tfr-1* y *Tfr-2* siendo este resultado dependiente del método de activación celular (INF- γ y/o LPS), siendo el LPS el activador que mostró mayor expresión de ambos receptores con respecto a la expresión basal. Esto se explica debido a que la célula hospedadora reconoce al LPS como un antígeno altamente inmunogénico, mientras que la estimulación dada por el INF- γ depende de otras moléculas co-estimuladoras como son los TCR y BCR o moléculas acopladas proceso fagocítico.

Esto concuerda con los resultados de Han et al. (2017) donde por medio de técnicas de inmunoprecipitación identificaron que el receptor *Tfr-1* está involucrado en los procesos de invasión de la spora *E. hellem*, lo que sugiere que los receptores de transferrina participan en la infección microsporidiana. Estos resultados concuerdan con lo observado en esta investigación, donde los receptores de transferrina demostraron ser receptores altamente involucrados en el proceso fagocítico y de internalización por parte de la spora de *E. cuniculi*; sin embargo, al compartir proteínas de superficie a nivel de exospora, no

es difícil considerar la similitud en los resultados y el uso de los receptores asociados a este tipo de microorganismos.

El análisis de los resultados confirma que *E. cuniculi* promueve su internalización por medio de ciertos receptores de superficie. En células infectadas con esporas de *E. cuniculi* la expresión del ARNm para los receptores de *Tfr-1*, *Tfr-2*, *Tlr-2* y *Tlr-4* incrementó en comparación con macrófagos no estimulados y no infectados, por lo tanto, se sugiere que estos receptores participan en la respuesta inmune innata contra *E. cuniculi*.

Así mismo, con base a los resultados del presente estudio, puede considerarse el reconocimiento de las PTP por parte de los receptores de *Tfr* y por primera considera a los receptores de *Dec-1* y lo de lipoproteínas de baja densidad oxidados *Lox-1*.

9.- CONCLUSIONES

El método de activación celular aquí expuesto no aumenta la formación de VP cuando la membrana de la célula hospedadora es bloqueada.

La activación celular con LPS a una concentración de 50ng/ml aumenta la expresión de los receptores y citocinas asociadas a la respuesta inmune innata cuando los macrófagos son infectados con esporas de *E. cuniculi*.

Agregar el anticuerpo anti-dectina 1 (*Dec-1*) al cultivo celular reduce las tasas de infección por microsporidios. Estos resultados indican que dectina también puede ser un receptor importante involucrado en el mecanismo de infección de la célula huésped utilizada por estos patógenos. Este receptor es expresado por los macrófagos y juega un papel importante en la inmunidad innata antifúngica. Es el receptor específico de los β -glucanos; polímeros de glucosa que se encuentran en las paredes celulares de los hongos. *Dec-1* se internaliza en los β -glucanos y media la producción de ROS, activa NF- κ B y posteriormente secreta proteínas inflamatorias.

La expresión del receptor de transferrina 2 (*Tfr-2*) puede indicar que está involucrado en la interacción de células hospedadoras con *E. cuniculi*. Este receptor está involucrado en la absorción de hierro en muchas células, y se sabe que este receptor es utilizado por una gran variedad de virus para unir, invadir e infectar a las células huésped.

Estos resultados indican que *Tfr-2* y *Dec-1* son compañeros potenciales de la interacción de células hospedadoras con *E. cuniculi*.

10.- BIBLIOGRAFÍA

- Berger Baldotto, S., Cray, C., Giannico, A.T., Reifur, L., Montiani-Ferreira, F., 2015. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Pet Rabbits in Brazil. *J. Exot. Pet Med.* 24, 435–440.
- Burri, L., Williams, B.A.P., Bursac, D., Lithgow, T., Keeling, P.J., 2006. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 15916–20.
- del Aguila, C., Izquierdo, F., Granja, A.G., Hurtado, C., Fenoy, S., Fresno, M., Revilla, Y., 2006. *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. *Int. J. Parasitol.* 36, 869–876.
- Delbac, F., Peuvel, I., Metenier, G., Vivares, C.P., 2001. Microsporidian Invasion Apparatus : Identification of a Novel Polar Tube Protein and Evidence for Clustering of *ptp1* and *ptp2* Genes in Three *Encephalitozoon* Species Microsporidian Invasion Apparatus : Identification of a Novel Polar Tube Protein and Evidenc 69, 1016–1024.
- Didier, E.S., Didier, P.J., Snowden, K.F., Shadduck, J.A., 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect.* 2, 709–720.
- Didier, E.S., Stovall, M.E., Green, L.C., Brindley, P.J., Sestak, K., Didier, P.J., 2004. Epidemiology of microsporidiosis: Sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 126, 145–166.
- Didier, E.S., Weiss, L.M., 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 485–492.
- Foucault, C., Drancourt, M., 2000. Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb. Pathog.* 28, 51–58.
- Franzen, C., 2005. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol. (Praha).* 52, 36–40.
- Franzen, C., 2004. Microsporidia: How can they invade other cells? *Trends Parasitol.* 20, 275–279.

- Franzen, C., Hartmann, P., Salzberger, B., 2005. Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Exp. Parasitol.* 109, 1–6.
- Ghosh, K., Nieves, E., Keeling, P., Cali, A., Weiss, L.M., 2012. A new vesicular compartment in *Encephalitozoon cuniculi*. *Microbes Infect.* 14, 324–328.
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P.M., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., Tanowitz, H.B., Pan, G., Delbac, F., Zhou, Z., Weiss, L.M., 2017. The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLOS Pathog.* 13, e1006341.
- Hofmannová, L., Sak, B., Jekl, V., Mináriková, A., Škorič, M., Kváč, M., 2014. Lethal *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection in Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*). *Vet. Parasitol.* 205, 357–360.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivarès, C.P., 2001. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450–453.
- Khan, I.A., Moretto, M., Weiss, L.M., 2001. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 3, 401–405.
- Koudela, B., Kučerová, Š., Hudcovic, T., 1999. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitol. (Praha)*. 46, 171–174.
- Lallo, M.A., Porta Miche Hirschfeld, M., 2012. Encephalitozoonosis in pharmacologically immunosuppressed mice. *Exp. Parasitol.* 131, 339–343.
- Lallo, M.A., Vidoto Da Costa, L.F., Alvares-Saraiva, A.M., Rocha, P.R.D., Spadacci-Morena, D.D., Konno, F.T. De C., Suffredini, I.B., 2016. Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 171–176.
- Li, A.X., Palmer, R., Trout, J.M., Fayer, R., 2010. Infectivity of Microsporidia Spores

Stored in Water at Environmental Temperatures Published by: The American Society of Parasitologists Infectivity of Microsporidia Spores Stored in Water at Environmental Temperatures 89, 185–188.

- 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.
- Mathews, A., Hotard, A., Hale-Donze, H., 2009a. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes Infect.* 11, 905–911.
- Mathews, A., Hotard, A., Hale-Donze, H., 2009b. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes Infect.* 11, 905–911.
- Neumayerová, H., Juránková, J., Jeklová, E., Kudláčková, H., Faldyna, M., Kovařík, K., Jánová, E., Koudela, B., 2014. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Vet. Parasitol.* 204, 184–90.
- Okhuysen, P.C., 2001. Traveler's Diarrhea Due to Intestinal Protozoa. *Clin. Infect. Dis.* 33, 110–114.
- Orlik, J., Böttcher, K., Gro, U., Bohne, W., 2010. Germination of phagocytosed *E. cuniculi* spores does not significantly contribute to parasitophorous vacuole formation in J774 cells. *Parasitol. Res.* 106, 753–755.
- Sokolova, O.I., Demyanov, A. V., Bowers, L.C., Didier, E.S., Yakovlev, A. V., Skarlato, S.O., Sokolova, Y.Y., 2011. Emerging Microsporidian Infections in Russian HIV-Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.* 49, 2102–2108.
- Stentiford, G.D., Becnel, J.J., Weiss, L.M., Keeling, P.J., Didier, E.S., Williams, B.A.P., Bjornson, S., Kent, M.L., Freeman, M.A., Brown, M.J.F., Troemel, E.R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K.F., Solter, L., 2016. Microsporidia - Emergent Pathogens in the Global Food Chain. *Trends Parasitol.* 32, 336–48.
- Texier, C., Vidau, C., Viguès, B., El Alaoui, H., Delbac, F., 2010. Microsporidia: A model for minimal parasite-host interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 13, 443–449.

- Valencakova, A., Halanova, M., 2012. Immune response to *Encephalitozoon* infection review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1–7.
- Van Gool, T., Dankert, J., 1995. Human microsporidiosis: Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection. *Clin. Microbiol. Infect.* 1, 75–85.
- Vávra, J., Lukeš, J., 2013. Microsporidia and “the art of living together”., *Advances in parasitology*. Elsevier.
- Waller, T., 1979. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Lab. Anim.* 13, 227–30.
- Xu, Y., Weiss, L.M., 2005. The microsporidian polar tube: A highly specialised invasion organelle. *Int. J. Parasitol.* 35, 941–953.
- Yalçinkaya, N., Haytural, H., Bilgiç, B., Özdemir, Ö., Hanağasi, H., Küçükali, C.I., Özbek, Z., Akcan, U., Idrisoğlu, H.A., Gürvit, H., Tüzün, E., 2016. Expression changes of genes associated with apoptosis and survival processes in Parkinson’s disease. *Neurosci. Lett.* 615, 72–77.

11.- SOLUCIONES

RPMI 1640 con SFB inactivado (cRPMI)

Agua destilada estéril	950 ml
Polvo	14.6 g
SFB inactivado	50 ml
Antibiótico/Antimicótico	11 ml
Bicarbonato de sodio	2 g

Filtrar con poro de 0.22µm.

PBS 1X

NaCl	8.06 g
KCl	0.22 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g

Ajustar a pH de 7.5 y filtrar con poro de 0.22µm.

Tripsina 1X al 0.5%

Tripsina – EDTA 10X	10 ml
PBS 1X	90 ml

Tripsina 1X al 0.25%

Tripsina 1X al 0.5%	1 parte
PBS 1X	1 parte

Medio de congelación para células

DMSO	10 ml
SFB inactivado	90 ml
Antibiótico/Antimicótico	1.1 ml

Medio de congelación para esporas

DMSO	20 ml
SFB inactivado	6 ml
RPMI 1640	74 ml