

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“Efecto modulador de *Encephalitozoon cuniculi* sobre macrófagos
peritoneales murinos”**

POR

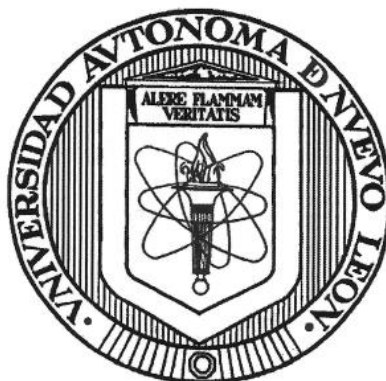
MVZ. JENNIFER ANALÍ GONZÁLEZ CASTILLO

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

OCTUBRE, 2022

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“EFECTO MODULADOR DE *Encephalitozoon cuniculi* SOBRE
MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS”**

Aprobación de tesis por el comité particular de

Jennifer Analí González Castillo

DIRECCIÓN DE TESIS

Dra. Alicia Nevárez Garza
Directora

PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Co-Director

Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo

Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director

Dr. Gerardo Méndez Zamora
Co-Director

General Escobedo, Nuevo León. a 7 de octubre de 2022.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el Cuerpo Académico Consolidado de Zoonosis y Enfermedades Emergentes (UANL-CA-343), Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, UANL y el Cuerpo Académico Consolidado de Morfología (UANL-CA-230), Departamento de Histología, UANL. Con la colaboración del Dr. Adolfo Soto Domínguez y del Dr. Roberto Montes de Oca Luna.

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Campus de Ciencias Agropecuarias
Av. Francisco Villa s/n. Col. Ex-Hacienda El Canadá
General Escobedo, N. L. México, C. P. 66050

DEDICATORIA

A mi mamá Ana Lilia Castillo Cuéllar, por ser el ángel más protector y lleno de amor que llevo siempre conmigo.

A mi papá Leopoldo González Rodríguez, quien nunca me ha dejado caer, impulsándome siempre a volar más alto.

A mis hermanos Leonardo y Paola, porque sin saberlo me dan la motivación que necesito para continuar.

Con amor, les dedico todo mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, la Dra. Alicia Nevárez Garza, a quien admiro y aprecio enormemente, gracias por guiarme en este y tantos otros caminos de la vida.

Al PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar, por permitirme trabajar bajo su liderazgo y formar parte de tan enriquecedor equipo de investigación.

A mis co-directores, el Dr. Adolfo Soto Domínguez, el Dr. Uziel Castillo Velázquez y el Dr. Gerardo Méndez Zamora, por dejarme tomar de ustedes lo mejor que pude haber aprendido, de cada uno me llevo grandes enseñanzas.

A la MCA. Argelia Holguín Salas, por nunca dudar en extenderme su ayuda e instrucción.

Al MVZ. Jonás Hernández Barrera, por todos los altos y bajos compartidos.

Al mejor equipo de trabajo, el Departamento de Inmunología de la FMVZ, por el apoyo técnico y moral.

A los animales que formaron parte de este proyecto, que sus vidas queden inmortalizadas en el conocimiento que nos obsequiaron.

ÍNDICE

Resumen.....	15
Abstract	17
Resumen gráfico.....	19
1. Introducción	21
1.1. Justificación.....	23
1.2. Hipótesis.....	23
1.3. Objetivo general	23
1.4. Objetivos específicos.....	23
2. Literatura revisada.....	24
2.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	24
2.1.1. Antecedentes.....	24
2.1.2. Clasificación	24
2.1.3. Estructura de la espora.....	25
2.1.4. Ciclo biológico y patogénesis.....	28
2.2. Respuesta inmune.....	31
2.3. Macrófago	31
2.3.1. Polarización M1/M2 del macrófago.....	32
2.3.2. Vía de la enzima óxido nítrico sintasa inducible.....	33
2.3.3. Vía de la enzima arginasa 1	33
2.3.4. Marcadores de macrófagos M1/M2.....	35
2.3.5. Identificación de fenotipos M1/M2.....	35
3. Material y métodos.....	39
3.1. Animales y diseño experimental	39
3.1.1. Aislamiento de macrófagos peritoneales.....	39
3.2. Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	40
3.3. Activación de macrófagos y desafíos <i>in vitro</i>	41
3.4. Detección de iNOS y Arg-1	43
3.4.1. Inmunocitofluorescencia indirecta	43
3.4.2. Extracción de RNA.....	43

3.4.3.	Transcripción reversa	44
3.4.4.	PCR en tiempo real.....	44
3.5.	Detección de esporas en orina y heces con Calcoflúor White	45
3.6.	Análisis estadístico	45
4.	Resultados	46
4.1.	Confirmación del modelo de infección murino.....	46
4.2.	Detección de iNOS y Arg-1	48
4.3.	Inmunocitofluorescencia indirecta	48
4.3.1.	Grupo sano.....	48
4.3.1.1.	Macrófagos basales.....	48
4.3.1.2.	Macrófagos M1.....	56
4.3.1.3.	Macrófagos M2.....	63
4.3.2.	Grupo infectado <i>in vivo</i>	70
4.3.2.1.	Macrófagos basales.....	70
4.3.2.2.	Macrófagos M1.....	76
4.3.2.3.	Macrófagos M2.....	84
4.4.	Cuantificación de la expresión génica.....	91
4.4.1.	Respuesta de macrófagos peritoneales murinos a la polarización M1/M2 <i>ex vivo</i>	91
4.4.2.	Respuesta de macrófagos M1 y M2 al desafío con la espora viva de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	93
4.4.3.	Respuesta de macrófagos M1 y M2 al desafío con la espora inactivada por calor.....	95
4.4.4.	Respuesta de macrófagos M1 y M2 al desafío con la espora inactivada con formalina.....	97
4.4.5.	Controles sin desafío con espora	99
5.	Discusión.....	101
6.	Conclusiones	110
7.	Bibliografía	111
	Apéndice	127

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Diagrama de la espora microsporidiana clásica.....	27
Fig. 2. Ciclo biológico de <i>Encephalitozoon</i> spp.	30
Fig. 3. Metabolismo diferencial de la arginina vía iNOS o Arg-1 en macrófagos M1/M2 y sus consecuencias funcionales	35
Fig. 4. Frotis de orina de ratones del grupo sano	46
Fig. 5. Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en frotis de orina de ratones del grupo infectado.....	47
Fig. 6. Macrófagos basales del grupo sano sin desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	50
Fig. 7. Macrófagos basales del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas vivas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	51
Fig. 8. Macrófagos basales del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor.....	52
Fig. 9. Macrófagos basales del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina	53
Fig. 10. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos basales de ratones clínicamente sanos.....	55
Fig. 11. Macrófagos M1 del grupo sano, sin desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	57
Fig. 12. Macrófagos M1 del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas vivas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	58
Fig. 13. Macrófagos M1 del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor.....	59
Fig. 14. Macrófagos M1 del grupo sano, desafiados con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina.....	60
Fig. 15. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas espora sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M1 de ratones clínicamente sanos	62

Fig. 16. Macrófagos M2 del grupo sano, sin desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	64
Fig. 17. Macrófagos M2 del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas vivas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	65
Fig. 18. Macrófagos M2 del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor.....	66
Fig. 19. Macrófagos M2 del grupo sano, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina	67
Fig. 20. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M2 de ratones sanos	69
Figura 21. Macrófagos basales del grupo infectado, sin desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	71
Fig. 22. Macrófagos basales del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas vivas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	72
Fig. 23. Macrófagos basales del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor.....	73
Fig. 24. Macrófagos basales del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina.....	74
Fig. 25. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos basales de ratones infectados <i>in vivo</i> con <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	76
Figura 26. Macrófagos M1 del grupo infectado, sin desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	78
Fig. 27. Macrófagos M1 del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas vivas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	79
Fig. 28. Macrófagos M1 del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor.....	80
Fig. 29. Macrófagos M1 del grupo infectado, desafiados con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina.....	81
Fig. 30. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M1 de ratones infectados <i>in vivo</i> con <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	83

Figura 31. Macrófagos M2 del grupo infectado, sin desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	85
Fig. 32. Macrófagos M2 del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas vivas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	86
Fig. 33. Macrófagos M2 del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor.....	87
Fig. 34. Macrófagos M2 del grupo infectado, desafiados <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina.....	88
Fig. 35. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M2 de ratones infectados <i>in vivo</i> con <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	90
Fig. 36. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos basales (-) y estimulados <i>in vitro</i> para la polarización hacia M1 (IFN- γ +LPS) o M2 (IL-4), en los grupos experimentales sano e infectado <i>in vivo</i> con <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	92
Fig. 37. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, luego del desafío <i>ex vivo</i> con esporas viables de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> , en los grupos experimentales sano e infectado <i>in vivo</i> ...	94
Fig. 38. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, luego del desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas por calor, en los grupos experimentales sano e infectado <i>in vivo</i>	96
Fig. 39. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, luego del desafío <i>ex vivo</i> con esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> inactivadas con formalina, en los grupos experimentales sano e infectado <i>in vivo</i>	98
Fig. 40. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, en ausencia del desafío con la espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> , en los grupos experimentales sano e infectado <i>in vivo</i>	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos para la activación y desafío <i>ex vivo</i> de macrófagos peritoneales de los grupos experimentales clínicamente sano e infectado <i>in vivo</i>	42
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg-1	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BMDM	Monocitos derivados de médula ósea
CCL	Ligando de quimiocinas
CD	Cluster de diferenciación
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CW	Calcoflúor White
CXCL	Ligando C-X-C de quimiocinas
dNTP	Dinucleótidos trifosfato
<i>E. cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
EIC	Espora inactivada por calor
EIF	Espora inactivada con formalina
EV	Espora viva
Fc γ R	Receptor de la fracción cristalizable gamma
FIZZ1	Proteína localizada en zona de inflamación 1
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP	Guanosín trifosfato
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JAK	Quinasa Janus
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
M ϕ	Macrófago basal
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NBF	Formalina neutra tamponada
NF- $\kappa\beta$	Factor de transcripción nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEC	Células del exudado peritoneal
PTP	Proteína del tubo polar
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSP	Proteína de superficie del esporoplasma
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
SWP	Proteína de pared de la espora

TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TYK	Tirosina quinasa
VDAC	Canal aniónico dependiente de voltaje
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Ym1	Proteína tipo quitinasa 3

RESUMEN

Introducción. *Encephalitozoon cuniculi* es hongo intracelular obligado formador de esporas perteneciente al Phylum Microsporidia que infecta a roedores y lagomorfos, aunque también es reconocido como un patógeno oportunista emergente por su potencial zoonótico en individuos inmunocomprometidos. Una de las células con mayor participación en el desarrollo de la respuesta inmune ante la infección por *E. cuniculi* es el macrófago. Se ha reportado la capacidad transitoria de macrófagos M1 para eliminar eficiente la espора; sin embargo, ésta puede evadir mecanismos efectores y replicarse dentro de la célula. Es posible que la espора de *E. cuniculi* module el fenotipo del macrófago hacia uno más permisivo que facilite su supervivencia y propagación.

Objetivo. Investigar el efecto la espора de *E. cuniculi*, tanto viable como inactivada, sobre macrófagos peritoneales obtenidos a partir de un modelo murino de la infección *in vivo* y polarizados *in vitro* hacia M1 (iNOS⁺) o hacia M2 (Arg-1⁺), con la finalidad de determinar una posible función moduladora. **Material y métodos.** Fueron empleados dos grupos experimentales de ratones BALB/c: A) sano negativo a la infección, B) infectado con *E. cuniculi in vivo*. La expresión y presencia de iNOS y Arg-1 fue evaluada en macrófagos peritoneales murinos basales (M ϕ), activados hacia M1 (IFN- γ ⁺LPS⁺) o hacia M2 (IL-4⁺) en respuesta al desafío *ex vivo* con esporas vivas (EV), inactivadas por calor (EIC) e inactivadas por formalina (EIF).

Resultados. El fenotipo basal predominante en macrófagos peritoneales del grupo infectado fue M2. Aunque la polarización *in vitro* causó incrementos diferenciales en iNOS y Arg-1 para los fenotipos M1 y M2, respectivamente, el grupo infectado tuvo mayor resistencia a la polarización a M1. El desafío *ex vivo* con la EV incrementó el fenotipo M2 en todas las poblaciones de macrófagos, excepto en M ϕ del grupo infectado donde se observaron niveles similares de los fenotipos M1 y M2. La EIC promovió la repolarización a M2 en macrófagos M1 y el mantenimiento del fenotipo M2 en el resto de las poblaciones. En comparación con la EV, las presentaciones inactivadas de la espора tuvieron mayor efecto sobre el incremento de iNOS, siendo el desafío con la EIF el que resultó en la mayor expresión del fenotipo M1 a nivel génico. Sin embargo, a nivel proteico M2 fue el fenotipo predominante obtenido con ambos desafíos. **Conclusiones.** *Encephalitozoon cuniculi* modula el fenotipo del macrófago peritoneal murino hacia M2 independientemente del estado previo de infección

in vivo y activación *in vitro*. El fenotipo M2 es mantenido incluso después del desafío con esporas vivas, así como con inactivadas tanto por calor como con formalina.

Palabras clave: *arginasa 1, Encephalitozoon cuniculi, iNOS, macrófago, M1, M2*

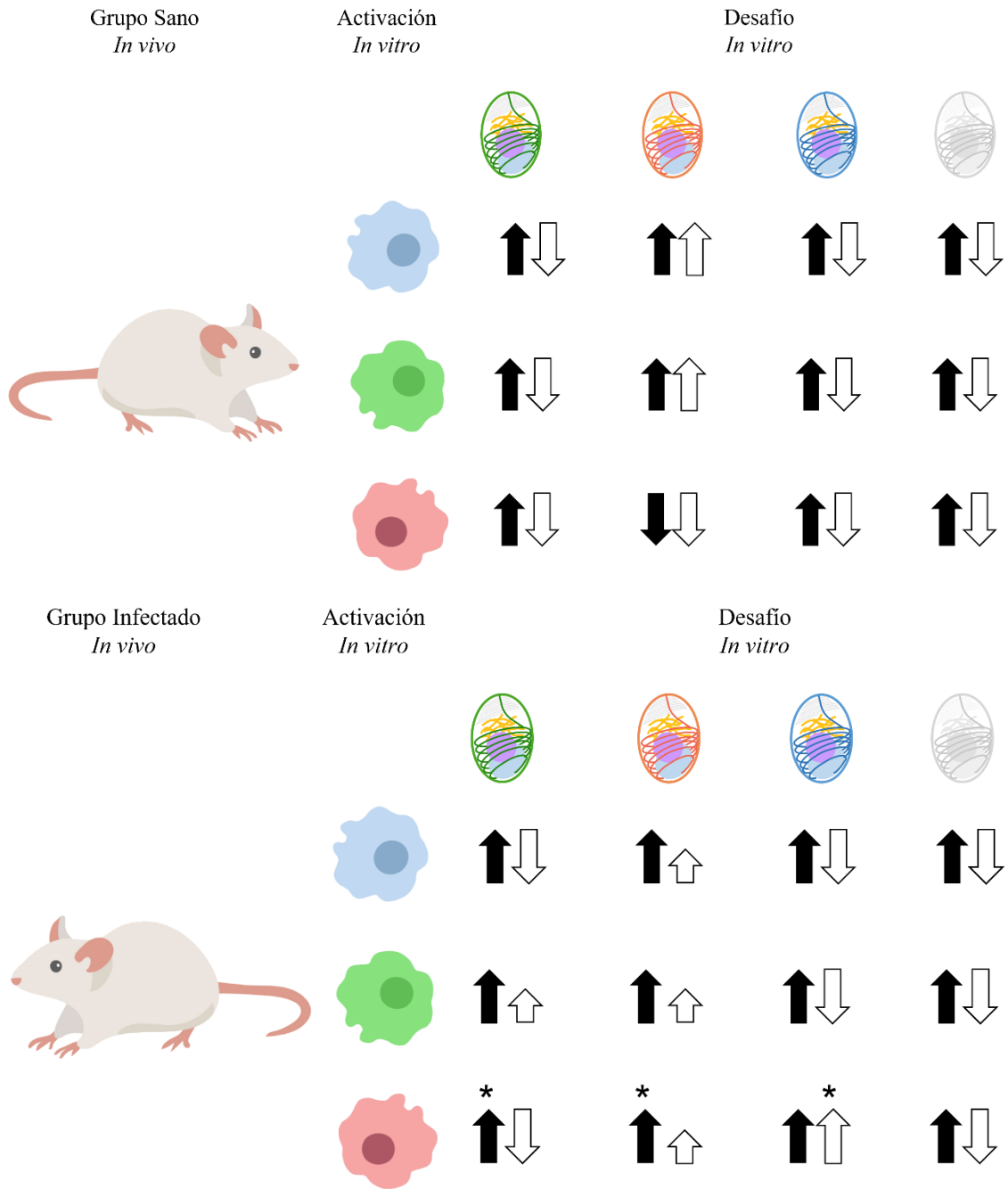
ABSTRACT








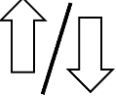



Introduction. *Encephalitozoon cuniculi* is an obligate intracellular, spore-forming fungus of the Microsporidia Phylum, infecting namely rodents and lagomorphs, although it is considered an emergent opportunistic pathogen of zoonotic potential in immunocompromised individuals. One of the most actively participating cells in mounting the immune response during *E. cuniculi* infection is the macrophage. M1 macrophages have been reported to efficiently, though only transitionally, eliminate the spore, which has the ability of evading effector mechanisms and replicating within the cell. It is possible that modulation of the macrophage phenotype enables a permissive microenvironment for survival and propagation of the spore. **Objective.** To investigate the effect of the *E. cuniculi* spore, both live and inactivated, on murine peritoneal macrophages obtained from an *in vivo* model of infection and polarized *in vitro* towards M1 (iNOS⁺) or M2 (Arg-1⁺) to determine whether modulatory effect exists after challenge with the spore. **Materials and methods.** Two experimental groups of BALB/c mice were used: A) negative to infection, B) *E. cuniculi*-infected *in vivo*. Expression and presence of iNOS and Arg-1 was assessed in basal, M1 (IFN- γ ⁺LPS⁺) and M2 (IL-4⁺) murine peritoneal macrophages in response to the *in vitro* challenge with live, heat-inactivated, and formalin-inactivated spores. **Results.** M2 was the predominant phenotype in basal peritoneal M ϕ of chronically infected mice. Although *in vitro* polarization resulted in a differential increase in iNOS and Arg-1 levels for M1 and M2 cells respectively, M ϕ from the infected group were more resistant to pro-M1 stimuli. *Ex vivo* challenging with live spores caused an increase in the M2 phenotype in all macrophage populations, except for M ϕ of the infected group which adopted similar levels of M1 and M2 phenotypes. Heat-killed spores promoted the repolarization towards M2 in M1 cells and the maintenance of the M2 phenotype in all macrophage populations. In comparison with live spores, inactivated versions of the spores had a greater effect promoting the M1 phenotype, with formalin-killed spores causing the highest expression of iNOS. However, M2 was the predominant phenotype at the protein level with either challenge. **Conclusions.** *Encephalitozoon cuniculi* modulates the phenotype of murine peritoneal macrophages towards M2 regardless of previous *in vivo* infection and *in vitro* activation. The M2

phenotype was maintained even after challenging macrophages *ex vivo* with live, as well as heat- and formalin-killed spores.

Keywords: *arginase 1, Encephalitozoon cuniculi, iNOS, macrophage, M1, M2*

RESUMEN GRÁFICO



	Macrófagos peritoneales basales		Espora viva
	Células M1 (IFN- γ +LPS)		Espora inactivada por calor
	Células M2 (IL-4)		Espora inactivada con formalina
*	Tratamiento con diferencia significativa		Sin espora
	Incremento/disminución de iNOS con respecto al control		Incremento leve de iNOS con respecto al control
	Incremento/disminución de arginasa 1 con respecto al control		Incremento leve de arginasa 1 con respecto al control

1. INTRODUCCIÓN

Encephalitozoon cuniculi es un hongo intracelular obligado formador de esporas, perteneciente al Phylum Microspora, el cual infecta principalmente roedores y lagomorfos, además de ser un agente zoonótico, oportunista y emergente capaz de generar infecciones crónicas predominantemente en hospederos inmunocomprometidos (Didier *et al.*, 2014). Actualmente se han identificado cuatro genotipos (I al IV) de *E. cuniculi*, clasificados según el orden y la especie de la que originalmente fueron aislados: conejo, ratón, perro y humano (Kotková *et al.*, 2018).

La infección experimental con *E. cuniculi* en modelos murinos genera severos granulomas en sistema nervioso central, riñón, bazo, hígado, entre otros tejidos, y los síndromes desarrollados son similares a aquellos presentados por individuos con inmunodeficiencias severas como VIH-SIDA, receptores de trasplantes de órganos o bajo otros estados de inmunosupresión (Al-Sadi & Mahmood, 2014; Han *et al.*, 2021). Las reacciones se caracterizan por abundantes infiltrados mononucleares en donde los macrófagos tienen una participación importante (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016).

El papel del macrófago es de especial interés durante la infección por *E. cuniculi*, pues una vez que la espora es fagocitada, ésta puede evadir, interferir o modular la respuesta inmune innata, lo cual le permite sobrevivir y continuar con su replicación dentro de la célula. Este mecanismo de resistencia posiblemente sea clave en la diseminación del patógeno hacia otros sistemas y en la persistencia de la infección (Franzen *et al.*, 2004). Se ha demostrado que macrófagos clásicamente activados o del fenotipo M1, son capaces de eliminar la espora; sin embargo, su efecto fungicida es transitorio (Didier *et al.*, 2010; González-Machorro *et al.*, 2019).

Recientemente se evidenció la capacidad de la infección experimental *in vivo* y posterior desafío *ex vivo* de macrófagos peritoneales murinos para generar una polarización M1/M2 balanceada (Holguín-Salas, 2021), pero se desconoce si la espora de *Encephalitozoon cuniculi* ejerce un efecto modulador sobre el fenotipo de macrófagos previamente activados hacia M1 o M2. En el presente trabajo se observó que macrófagos peritoneales de ratones BALB/c, independientemente de su estado previo de activación (M1, M2 o

Mφ), exhibieron una mayor tendencia hacia el fenotipo M2, luego de la infección *in vivo* y posterior desafío *in vitro* con diferentes versiones de la espora (viva, inactivada por calor e inactivada con formalina). Además, la presente investigación constituye la primera evidencia del efecto modulador de las esporas de *E. cuniculi* sobre poblaciones de macrófagos peritoneales.

1.1. Justificación

El estudio de los marcadores de macrófagos peritoneales murinos nos permitirá entender el papel modulador de las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* durante una infección experimental.

1.2. Hipótesis

La expresión diferencial de iNOS y Arg1 es modulada por la infección por *Encephalitozoon cuniculi* en macrófagos peritoneales murinos.

1.3. Objetivo general

Estudiar el efecto de las diferentes presentaciones de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la modulación de macrófagos peritoneales durante la infección en un modelo murino.

1.4. Objetivos específicos

- 1.4.1.** Identificar el fenotipo de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.
- 1.4.2.** Polarizar macrófagos M1 y M2 *in vitro*.
- 1.4.3.** Determinar la proporción de macrófagos M1 y M2 como respuesta al efecto modulador de la infección.

2. LITERATURA REVISADA

2.1. *Encephalitozoon cuniculi*

2.1.1. Antecedentes

Encephalitozoon cuniculi fue el primer microsporidio reportado en infecciones en mamíferos. Originalmente fue aislado de la orina de conejos de laboratorio con encefalitis y parálisis motora, cuyas lesiones granulomatosas podían reproducirse al inocular las esporas viables en animales sanos (Wright & Craighead, 1922). La nomenclatura *Encephalitozoon cuniculi*, inicialmente propuesta por Levaditi *et al.* (1923), fue más tarde reclasificada dentro del género *Nosema*, por lo que *E. cuniculi* pasó a ser nombrado *Nosema cuniculi* (Weiser *et al.*, 1964). Finalmente, en 1971 el análisis ultraestructural de la espora permitió consolidar a *Encephalitozoon* como un género independiente en base a sus diferencias morfológicas con otros del Orden Microsporidia (Sprague & Vernick).

Durante años *Encephalitozoon cuniculi* se presentó con tasas de seroprevalencia que iban de moderadas a altas en colonias de conejos, ratones y otros animales de laboratorio (Gannon, 1980). Posteriormente, este agente fue clasificado como zoonótico tras su aislamiento a partir de un paciente VIH-SIDA positivo con encefalitozoonosis diseminada (DeGroot *et al.*, 1995). También fue la primera especie microsporidiana de origen mamífero en ser cultivada exitosamente *in vitro*, permitiendo su estudio biológico, patogénesis y diagnóstico de este y otros miembros de la familia Encephalitozoonidae (Han *et al.*, 2019).

2.1.2. Clasificación

Actualmente, el Phylum Microspora comprende alrededor de 220 géneros y 1700 especies reconocidas como eucariontes unicelulares formadores de esporas, con vida parasítica intracelular obligada en hospederos vertebrados e invertebrados (Han *et al.*, 2021). *Encephalitozoon* es el género más incidente en mamíferos, aves y reptiles, dentro del cual *E. cuniculi* permanece como la especie tipo y ha sido identificada principalmente en lagomorfos y roedores, además de carnívoros, rumiantes, equinos y primates tanto no humanos como humanos (Didier *et al.*, 2014). *Encephalitozoon cuniculi* es un patógeno

zoonótico oportunista y emergente de especial relevancia en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes, siendo uno de los microsporidios con mayor incidencia en humanos luego de *E. hellem*, *E. intestinalis* y *Enterocytozoon bieneusi* (Hernández Rodríguez *et al.*, 2012).

La secuenciación del genoma completo de *E. cuniculi* y consecuentes análisis filogenéticos a nivel molecular de éste y otros géneros sugieren una relación entre *Microspora* y los zigomicetos o criptomycetos, por lo que actualmente se les considera dentro del reino Fungi (Capella-Gutiérrez *et al.*, 2012; Xiang *et al.*, 2019).

2.1.3. Estructura de la espora

La única fase de *E. cuniculi* con capacidad infectiva y resistente en el medio ambiente es la espora madura (Vávra & Larsson, 2014) (Fig. 1). Presenta una morfología piriforme u ovoide, con dimensiones de 1 – 2 x 2 – 4 μm aproximadamente. *Encephalitozoon spp.* cuenta con una pared celular trilaminar gruesa (~60 nm) alrededor de la espora, la cual se vuelve más fina en su ápice (30 – 35 nm). La capa más externa corresponde a la exospora electrodensa de 25 – 30 nm de grosor, compuesta por una matriz proteínica granulo-fibrosa (Bigliardi *et al.*, 1996). La endospora conforma la capa intermedia electrolúcida (30 – 35 nm), constituida por α -quitina y proteínas transmembranales como EcEnP2/EcSWP3, quimiorreceptores como EcEnP1 y enzimas con funciones metabólicas como la EcCDA (Han *et al.*, 2020). La superficie interna de la endospora está recubierta por una membrana plasmática típica envolviendo el esporoplasma, considerada como el tercer componente de la pared dado que permanece *in situ* después de la germinación de la espora (Vávra & Larsson, 2014). Al centro del esporoplasma se localiza un núcleo delimitado por una doble membrana y sin nucleolos aparentes, que contiene uno de los genomas más reducidos y altamente conservados en eucariontes, con sólo 2.9 Mb que codifican para cerca de 2,000 proteínas (Pombert *et al.*, 2013). El citoplasma contiene otros organelos primitivos como abundantes ribosomas atípicos similares a los de procariontes, un aparato de Golgi no apilado que es más prominente durante la fase de esporogonia, retículo endoplásmico (RE), mitosomas, componentes del citoesqueleto y las principales estructuras asociadas al aparato de infección: el polaroplasto, el filamento o tubo polar y la vacuola posterior (Vávra & Larsson, 2014).

En los miembros de Microsporidia es característico el aparato de infección conformado por un filamento o tubo polar (una vez extruido) cuya función es transferir el material genético de la espora al citoplasma de la célula blanco (Franzen, 2005). Mide 100 – 200 nm de diámetro y puede ir de los 50 a 500 μm de largo. Se localiza adherido al disco de anclaje en el ápice y se enrolla de 5 a 7 veces alrededor de la vacuola en *E. cuniculi* (Xu & Weiss, 2005). La proteína del tubo polar 1 (PTP1) es el principal constituyente de esta estructura y por su contenido rico en prolina puede aportar mayor fuerza de tensión y elasticidad necesaria para la extrusión. PTP1, PTP2 y PTP3 interactúan entre sí para dar estructura al tubo polar, mientras que PTP4 se localiza en el extremo libre del mismo (Bouzahzah *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2017).

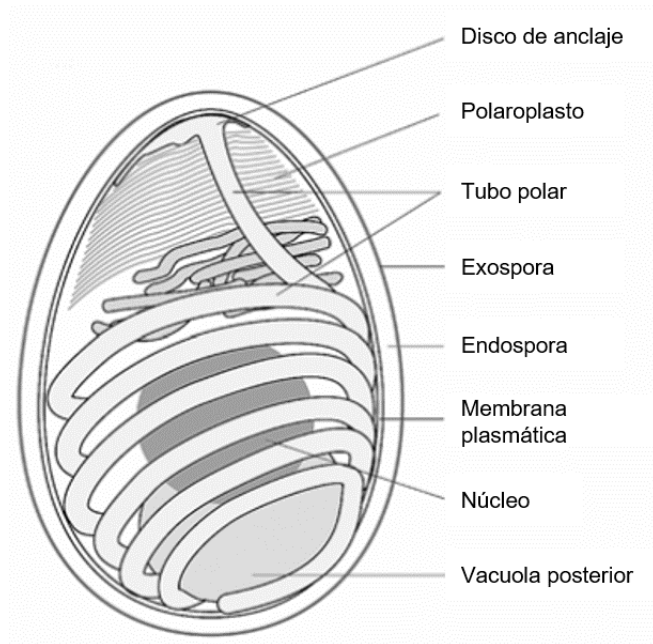


Figura 1. Diagrama de la espora microsporidiana clásica. Modificado de Franzen, 2005.
How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitologica* 52: pp. 36-40.

2.1.4. Ciclo biológico y patogénesis

Encephalitozoon cuniculi tiene un ciclo de vida directo, dividido en una fase ambiental vegetativa e infectiva y una fase intracelular proliferativa (Latney *et al.*, 2014) (Fig. 2). Las principales vías de ingreso al hospedero incluyen la ingesta e inhalación de esporas, aunque también se ha reportado la transmisión vertical *in utero* en ratones, conejos, carnívoros, primates y equinos (Baneux & Pognan, 2003; Kotková *et al.*, 2018). Una vez dentro del hospedero, la espora germina al encontrarse en proximidad de la célula blanco. El tubo polar es rápidamente extruido a una velocidad de $\sim 300 \mu\text{m/s}$, por la porción apical en respuesta a diversos factores como la presión osmótica, pH, presión iónica, etcétera (Jaroenlak *et al.*, 2020). A diferencia de otras especies de *Encephalitozoon*, *E. cuniculi* no libera el esporoplasma en contacto directo con el citosol, sino dentro de una membrana invaginada que posteriormente forma la vacuola o vesícula parasitófora donde completará su fase replicativa (Bohne *et al.*, 2011).

Un mecanismo alternativo e indirecto de infección puede ocurrir dentro de fagocitos profesionales, como los macrófagos, y no profesionales como líneas celulares de enterocitos y fibroblastos (Franzen *et al.*, 2005). Después de ser fagocitada, la espora puede inhibir la fusión del fagosoma con el lisosoma para prevenir su acidificación por un mecanismo aún desconocido, o extruir el tubo polar antes de que se complete la fusión del fagolisosoma, para liberar el esporoplasma en una nueva vesícula cuya matriz mantiene un pH neutro (Fasshauer *et al.*, 2005). Esta vía de internalización parece ser al menos 10 veces más frecuente que la activa (Couzinet *et al.*, 2000). Sin embargo, en macrófagos, la mayoría de las esporas no escapan del compartimento lisosomal y son eliminadas alrededor de 72 horas después de la internalización (Fischer *et al.*, 2008).

La membrana de la vesícula parasitófora parece derivar parcialmente del huésped, mientras que el resto posiblemente provenga del hongo durante sus fases proliferativas. Presenta poros que permiten el paso de moléculas de 3 a 10 kDa, facilitando el intercambio de metabolitos (Rönnebäumer *et al.*, 2008). Se ha demostrado que se asocia directamente con las mitocondrias de la célula hospedera, a través de la unión de una proteína de superficie del esporoplasma (SSP1) con la porina mitocondrial VDAC (canal aniónico dependiente de voltaje). Estos complejos se concentran alrededor de la vesícula a fin de

maximizar el suministro de ATP obtenido directamente de la mitocondria de la célula hospedera (Hacker *et al.*, 2014). También existen múltiples transportadores de nucleótidos (NTT 1 – 3) asociados a la membrana del meronte que permiten la importación de ATP, GTP y NAD⁺ (Williams *et al.*, 2014).

Ya sea a través de la vía activa o pasiva, una vez dentro de la vesícula parasitófora el meronte atraviesa una fase inicial de crecimiento y mitosis cerrada, seguida de fisión binaria para producir merozoitos. Al final de la merogonia, los núcleos son grandes en comparación con el citoplasma y aparecen abundantes láminas de RER. Los merozoitos pasan a formar esporontes. Durante la esporogonia existe la acumulación progresiva de material electrodensó alrededor de la membrana plasmática, que pasará a formar la pared celular, y aparecen organelos membranosos como el aparato de Golgi. Los esporontes también atraviesan algunas divisiones mitóticas antes de formar esporoblastos. Finalmente, los esporoblastos atraviesan una morfogénesis a esporas que serán liberadas por lisis de la célula hospedera (Cali & Takvorian, 2014; Vávra & Larsson, 2014).

La mayoría de las infecciones naturales inician en el epitelio intestinal o respiratorio, dado que representan las principales vías de entrada de la espora. Si bien no se ha dilucidado por completo el curso de la infección es posible que la consecuente diseminación de la espora hacia otros sistemas inicie en el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), dada la capacidad del hongo para infectar fagocitos, particularmente macrófagos (Mathews *et al.*, 2009). Los órganos con mayor predilección a la infección son encéfalo, riñón, hígado, intestino y pulmón, donde se desarrollan lesiones granulomatosas severas. La infección generalmente es crónica y asintomática en hospederos inmunocompetentes, mientras que individuos inmunocomprometidos pueden existir signos asociados a meningoencefalitis, falla renal, enteritis, entre otros menos frecuentes (Al-Sadi & Al-Mahmood, 2014; Didier *et al.*, 2014).

Los animales infectados comienzan a liberar esporas alrededor de 3 – 5 semanas post infección, principalmente a través de la orina, aunque las heces son otra fuente de contaminación. La diseminación de esporas es intermitente y eventualmente puede cesar o reincidir (Künzel & Joachim, 2010).

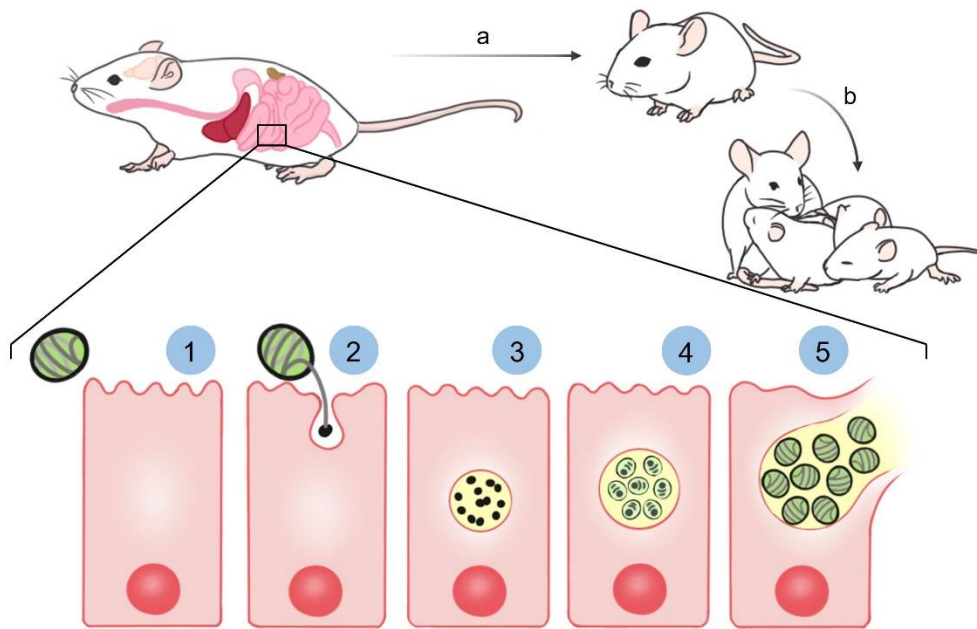


Figura 2. Ciclo biológico de *Encephalitozoon* spp. 1. Esporas libres en el ambiente. 2. Germinación de la espora y formación de la vesícula parasitófora. 3. Merogonia. 4. Esporogonia. 5. Lisis celular y liberación de esporas maduras. a. Transmisión horizontal. b. Transmisión vertical. Modificado de la CDC, 2019.

2.2. Respuesta inmune

Las infecciones por *E. cuniculi* se caracterizan por su persistencia, cronicidad y diseminación, siendo más severas en hospederos inmunosuprimidos, pero clínicamente silenciosas en inmunocompetentes (Jeklová *et al.*, 2020). La respuesta inmune efectiva para la eliminación de la infección es predominantemente del tipo Th1. Esto depende mayormente de la respuesta celular por linfocitos T CD8+ citotóxicos y citocinas proinflamatorias como IFN- γ o IL-12, puesto que la respuesta humoral parece no tiene un efecto protector contra el hongo (Khan & Didier, 2004). Por otro lado, la predisposición a respuestas tipo Th2 se relacionan con mayor susceptibilidad hacia la infección. Es posible que un efecto inmunomodulador, relacionado con citocinas antiinflamatorias como la IL-10, tenga como consecuencia el establecimiento de un microambiente permisivo para la espora (Matthews *et al.*, 2009).

Si bien estudios previos han demostrado la importancia de la respuesta adaptativa celular en la eliminación de *E. cuniculi* como patógeno estrictamente intracelular, es también relevante el papel de la respuesta inmune innata, especialmente del macrófago, como primera línea de defensa previo a la activación de linfocitos T (Pereira *et al.*, 2019).

2.2.1. Macrófago

El macrófago es una célula clave como vínculo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (Mills, 2012). Pertenece al sistema fagocítico mononuclear (MPS), deriva del monocito y posteriormente se diferencia a macrófago en tejido. Está involucrado en el reconocimiento, fagocitosis, y eliminación de patógenos, además de la presentación de antígenos y la liberación de citocinas necesarias para la activación de linfocitos Th0, tales como IL-12 para Th1 o IL-4/IL-13 para Th2, así como de mediadores de defensa como óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) (Oishi *et al.*, 2016). El macrófago no sólo cumple con una función efectora durante el desarrollo de la inflamación, sino que también participa en la modulación de la respuesta inmune, la reparación y mantenimiento tisular (Rodríguez *et al.*, 2017).

2.2.2. Polarización M1/M2 del macrófago

La capacidad del macrófago para adquirir diferentes estados funcionales en respuesta a los estímulos presentes en su microambiente se denomina plasticidad (Rodríguez *et al.*, 2017). A cada extremo de este posible continuum se posicionan las células M1, o macrófagos clásicamente activados, y M2 o alternativamente activados, las cuales no representan subtipos ontogénicamente diferenciados, sino fenotipos funcionales que han sido mejor caracterizados *in vitro* (Yang & Ming, 2014).

La nomenclatura M1/M2 originalmente derivó de las citocinas Th1 y Th2 asociadas con la activación del macrófago hacia el respectivo fenotipo (Muraille *et al.*, 2014). La diferenciación del macrófago a células M1 se obtiene bajo la estimulación con citocinas tipo Th1 como IFN- γ (activación clásica) solo o en combinación con TNF- α , y/o LPS (activación innata) (Italiani & Boraschi, 2014). La estimulación conlleva a la activación del inflammasoma y la expresión de un perfil de citocinas proinflamatorias como IL-12, IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IFN- β , moléculas efectoras microbicidas como NO, ROS y RNS, quimiocinas, moléculas MHC clase II y peptidasas procesadoras de antígeno (Martinez & Gordon, 2014).

La clasificación de células M2 se aplica genéricamente a macrófagos alternativamente activados, antiinflamatorios y de reparación tisular, por lo que se han descrito tres subdivisiones en base a los diferentes programas de activación obtenidos *in vitro*. Las células M2a se activan a través de la estimulación con las citocinas tipo Th2 IL-4 e IL-3 (activación alternativa), y responden expresando mayor actividad de arginasa 1 (Arg-1). El fenotipo M2b ocurre por la co-estimulación de Fc γ Rs por complejos inmunes y de TLRs por PAMPs. Al fenotipo M2c también se le denomina estado de desactivación, y resulta de la estimulación con IL-10, TGF- β o glucocorticoides (Mills *et al.*, 2012; Martinez & Gordon, 2014).

Las células M1/M2 presentan una tendencia diferencial para metabolizar la L-arginina, ya sea hacia la producción de NO por M1 o hacia la síntesis de ornitina y poliaminas por M2 (Rath *et al.*, 2014) (Fig. 3). Las enzimas óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y Arg-1

son las involucradas en estas vías catabólicas en el macrófago, por lo que se consideran marcadores prototípicos de los fenotipos M1/M2, respectivamente (Jablonski *et al.*, 2015).

2.2.3. Vía de la enzima óxido nítrico sintasa inducible

La familia de las enzimas óxido nítrico sintasas (NOS) se conforma por 3 isoenzimas: neural (nNOS o NOS1), inducible (iNOS o NOS2) y endotelial (eNOS o NOS3), las cuales difieren en distribución y capacidad sintética, pero comparten una estructura homodimérica y catalizan la incorporación del óxido molecular y nitrógeno a partir de L-arginina, liberando NO y generando citrulina como subproducto. La isoenzima iNOS (131 kDa) puede ser inducida en el macrófago por múltiples estímulos proinflamatorios hacia el fenotipo M1, dado que la producción de NO es uno de los mecanismos de defensa durante la respuesta microbicida, tumorocida y fungicida (Rath *et al.*, 2014).

La expresión de iNOS es inducida por una serie de citocinas proinflamatorias, típicamente IFN- γ y TNF- α , por sí solos o en combinación con productos microbianos como el LPS. Tanto IFN- γ como TNF- α pueden ser producidas por el macrófago y actuar de manera autócrina a través de la activación de sus respectivos receptores, IFNR1-IFNR2 y TNFR1. El complejo IFNR1-IFNR2 activa una vía de señalización dependiente de JAK1-2/STAT1, mientras que TNFR1 utiliza la vía de las MAP quinasas, la cual resulta en la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ al núcleo. Ambas vías promueven la expresión de iNOS y otros genes codificantes para IL-1 β , IL-6, TNF- α , entre otras (Rodríguez *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018).

2.2.4. Vía de la enzima arginasa 1

Existen dos isoenzimas para arginasa, la Arg-1 (35 kDa) o citosólica, y la Arg-2 o mitocondrial, a pesar de ser codificadas por diferentes genes, ambas catalizan la hidrólisis de L-arginina a L-ornitina y urea. La función de Arg-2 en el macrófago durante la respuesta inflamatoria aún no está bien definida, mientras que Arg-1 es uno de los indicadores más característicos del fenotipo M2 durante respuestas antiinflamatorias o de reparación tisular (Yang & Ming, 2014).

La expresión de Arg-1 en el macrófago es estimulada por IL-4 e IL-13, cuyos efectos son mediados por un complejo sistema de receptores, como el IL-4R α / γ c y el IL-13R α 1. La subunidad γ c del IL-4R activa a la tirosina-quinasa JAK3, mientras que IL-13R α 1 activa a TYK2 y JAK2. Las tirosina-quinasa activadas por ambas vías median la fosforilación de STAT6, que se dimeriza y transloca al núcleo, donde se une a promotores de genes responsivos a IL-4/IL-13, como Arg-1, Ym1, FIZZ1, entre otros (Oh *et al.*, 2010).

Como producto del metabolismo de la arginina, la ornitina sirve como sustrato para la síntesis de poliaminas, que a su vez regulan la replicación del ADN, traducción de proteínas, crecimiento y diferenciación celular. La ornitina también es el precursor para la síntesis de prolina, necesaria para la producción de colágeno durante la deposición de tejido (Rath *et al.*, 2014). Además de su función promotora en la regeneración tisular, los macrófagos M2 pueden ejercer un efecto antiinflamatorio mediante la depleción de arginina biodisponible para iNOS, así como la supresión de la activación de linfocitos T por deficiencia de arginina (Rószler, 2015). Por otro lado, citocinas producidas por células M2 como IL-10 y TGF- β son potentes supresores de la expresión de iNOS (Rodríguez *et al.*, 2017).

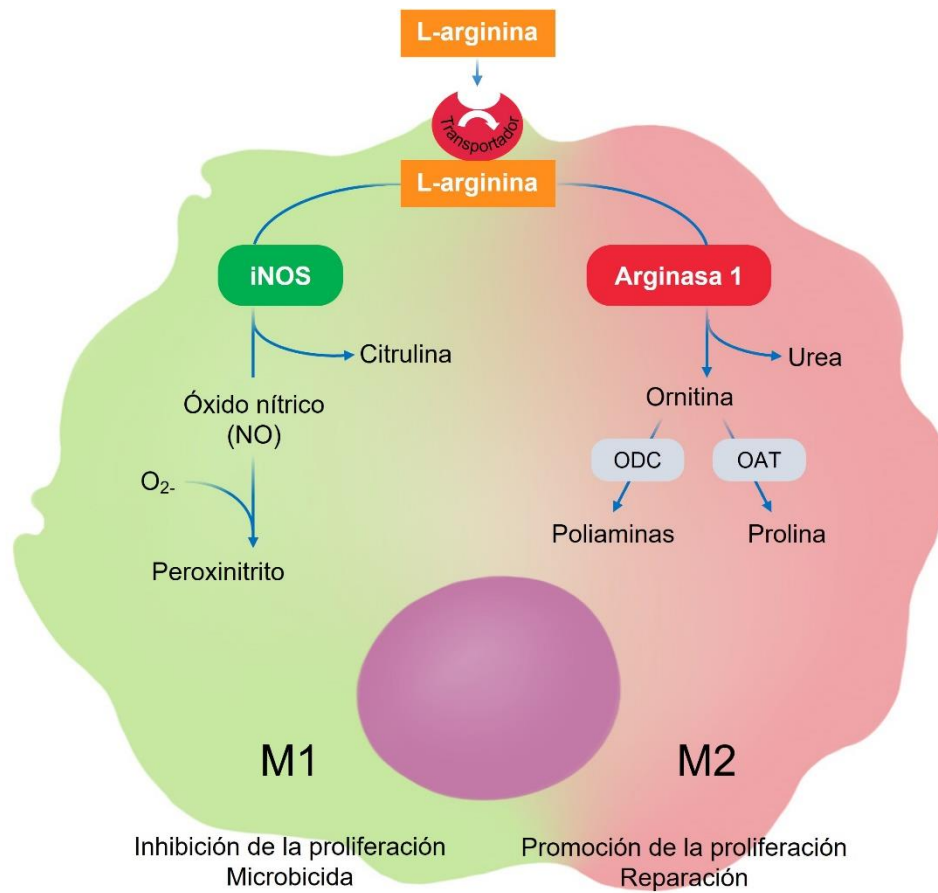


Figura 3. Metabolismo diferencial de la arginina vía iNOS o Arg-1 en macrófagos M1/M2 y sus consecuencias funcionales. Modificado de Rath *et al.*, 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*, 5(532): pp. 1-10.

2.2.5. Marcadores de macrófagos M1/M2

Las células M1 expresan iNOS como marcador intracelular primario del fenotipo proinflamatorio, promovido por LPS, IFN- γ , TNF- α o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Los marcadores de superficie de macrófagos clásicamente activados incluyen TLR-2, TLR-4, CD80, CD86 y CD69 (Rex *et al.*, 2016). Los factores de transcripción NF- $\kappa\beta$ y factores reguladores de IFN 3 y 5 (IRF3 e IRF5) son activados en respuesta a IFN- γ , TNF- α o LPS, y resultan en la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α , además de quimiocinas como CCL2 y CXCL10, entre otras (Martinez & Gordon, 2014).

Las subpoblaciones de macrófagos M2 (M2a, M2b, M2c) se caracterizan por la expresión de Arg-1 en respuesta a la estimulación con IL-4 e/o IL-13. Los marcadores de superficie de estos subtipos con mayores niveles de expresión son el receptor de manosa CD206, el receptor tipo *scavenger* CD163, FIZZ1, Ym1, entre otros (Rex *et al.*, 2016). STAT6 es el factor de transcripción más relacionado con la expresión de genes responsivos a IL-4/IL-13 (Oh *et al.*, 2010). El IFN- γ también puede estimular la polarización al fenotipo M2 en una vía dependiente de IL-4 que activa IRF4 (Oishi *et al.*, 2016). El panel de citocinas de macrófagos M2 incluye altos niveles de IL-10 y TGF- β , aunque IL-4, IL-13, IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- α también pueden ser expresados a diferente grado según la subpoblación (De-Sousa *et al.*, 2019).

2.3. Identificación de los fenotipos M1/M2

La proporción de macrófagos M1/M2 se mantiene altamente regulada bajo condiciones normales, mientras que alteraciones en este balance han demostrado ser determinantes en el desarrollo y resolución de la inflamación (Parisi *et al.*, 2018). Es posible monitorear la polarización, cambio o modulación del fenotipo del macrófago a través de la expresión de los marcadores canónicos iNOS (M1) y Arg-1 (M2), ya sea a nivel de mRNA o proteína (Atri *et al.*, 2018), tal como se ha realizado para el estudio de diversas infecciones por patógenos intracelulares del macrófago. Por ejemplo, la infección con *Mycobacterium tuberculosis* induce la polarización del macrófago hacia el fenotipo M1, aunque éste es gradualmente modulado hacia M2 *in vitro* (Huang *et al.* 2015). Estas variaciones en el

fenotipo del macrófago también son observadas en el granuloma, en el cual existen regiones estratificadas donde la predominancia del fenotipo M1 (iNOS⁺) se correlaciona con mayor actividad microbicida y carga bacteriana, mientras que regiones mayormente M2 (Arg-1⁺) tienen una función antiinflamatoria y posiblemente limitante de la respuesta M1 (Mattila *et al.*, 2015). *Toxoplasma gondii* es otro patógeno intracelular que puede sobrevivir dentro del macrófago a través de la modulación del fenotipo. En macrófagos murinos, *T. gondii* induce mayor expresión de Arg-1, que compite con iNOS por arginina y en consecuencia reduce la producción de NO, una molécula necesaria para la eliminación del parásito. El efecto contrario se ha observado en macrófagos humanos infectados con cepas de alta virulencia, en las cuales la expresión de iNOS actúa como factor pro-*Toxoplasma* y es promovida por el parásito (Bando *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019). Durante la infección con el hongo intracelular facultativo *Cryptococcus neoformans*, el estado de polarización del macrófago también se ve alterado. Inicialmente el macrófago adopta un fenotipo M1 (iNOS⁺) que predomina durante varias semanas, pero éste es eventualmente reemplazado por el fenotipo M2. Esta capacidad de repolarización también fue independiente del fenotipo inicial establecido *in vitro* (Davis *et al.*, 2013).

Si bien el estudio de iNOS/Arg-1 en macrófagos no había sido explorado en contexto de la infección con *Encephalitozoon cuniculi* sino hasta recientemente (Holguín-Salas, 2021), algunos autores han reportado la presencia de otros marcadores tipo-M1 y tipo-M2 en respuesta a la infección *in vitro* (Pereira *et al.*, 2019; Dalboni *et al.*, 2021).

En monocitos derivados de sangre periférica (PBMC), el desafío con la espora viva de *Encephalitozoon cuniculi* condujo al incremento en la expresión de una variedad de marcadores asociados al fenotipo M1, como TLR-2 y TLR-4, el factor transcripcional NF- κ B, citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-8, IL-12; y quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1, CXCL5, CXCL8 (Fischer *et al.*, 2007; Fischer *et al.*, 2008). Sin embargo, la fagocitosis de la espora no promueve un incremento significativo de NO en PBMC (Franzen *et al.*, 2005). En macrófagos murinos se ha demostrado que la activación con los estímulos pro-M1 LPS e/o IFN- γ previo al desafío promueve la eliminación eficiente de la espora de *E. cuniculi*, por mecanismos aparentemente dependientes de RNS más que de NO (Didier *et al.*, 2010; González-Machorro *et al.*, 2019).

Por otro lado, marcadores típicamente M2 también han sido reportados durante la infección con *Encephalitozoon cuniculi*. En PBMC, IL-10 es altamente expresada durante las primeras 24 – 48 horas después de la fagocitosis de la espora, en niveles incluso mayores que los de TNF- α e IFN- γ (Franzen *et al.*, 2005). Un efecto similar se ha observado en macrófagos murinos peritoneales y derivados de médula ósea (BMDM), en los cuales, además de la elevada producción de IL-10, también existió una alta expresión del receptor de manosa CD206 durante la respuesta temprana a la infección (Pereira *et al.*, 2019; Dalboni *et al.*, 2021).

Recientemente, un estudio sobre la infección experimental con *Encephalitozoon cuniculi* en la cepa murina BALB/c (Th2-dominante) resultó en mayor producción de Arg-1 en macrófagos peritoneales. Sin embargo, al desafiar a estas poblaciones de macrófagos con la espora viable *ex vivo*, la respuesta observada se mantuvo balanceada entre M1 y M2, contrario a la respuesta M1-dominante caracterizada por mejor eficiencia esporicida (Holguín-Salas, 2021). En conjunto, estos hallazgos sugieren que *E. cuniculi* podría modular el fenotipo del macrófago hacia uno que favorezca su supervivencia y el establecimiento de la infección, pero la evidencia experimental para sustentar esta posibilidad aún es escasa.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales y diseño experimental

Ratones de la cepa BALB/c de 6 semanas de edad aproximadamente, de ambos sexos y clínicamente sanos, fueron adquiridos (Círculo ADN S.A. de S.V., CDMX, México). Los animales fueron alojados en las instalaciones de la FMVZ-UANL, a 22 ± 1 °C con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con dieta comercial de mantenimiento (LabDiet® 5001, Missouri, USA) y agua *ad libitum*. El total de animales fue dividido en dos grupos: A) infectado experimentalmente con de *Encephalitozoon cuniculi* (n=7) y B) control sano negativo a la infección (n=7). Los ratones del grupo A recibieron *per os* (PO) 10^6 esporas vivas diluidas en 1 ml de solución tamponada con fosfatos (PBS) (pH 7.4), mientras que al grupo B se le administró únicamente 1 ml de PBS, utilizando un catéter de calibre 24G como sonda orogástrica. Al día 30 posterior a la administración del inóculo, las células de exudado peritoneal (PEC) fueron aisladas (ver 3.1.1). Todos los procedimientos se llevaron a cabo acatando la normativa mexicana vigente (NOM-062-ZOO-1999) y bajo la aprobación del Comité de Bioética y Bienestar de la FMVZ-UANL (Dictamen 12/2020).

3.1.1. Aislamiento de macrófagos peritoneales

Al día 30 post inoculación, cada ratón recibió por vía IP 1 ml de RPMI 1640 suplementado con 5% SFB (Gibco, EUA), 1% antibiótico y antimicótico (Sigma-Aldrich, EUA). Luego de 20 minutos de la inyección del medio, Luego de 20 minutos de la inyección del medio, los animales fueron insensibilizados mediante dislocación cervical y posteriormente exanguinados para producir la eutanasia. El ratón fue rociado con etanol al 70% y la extracción de PEC fue realizada junto a un mechero de Bunsen a fin de mantener una atmósfera estéril. Una vez diseccionada la cavidad abdominal, pero sin escindir el peritoneo, 5 ml más de medio nuevo fueron introducidos a la cavidad utilizando un catéter de calibre 24G. Luego de masajear gentilmente la cavidad peritoneal para facilitar el desprendimiento de las células, el medio de cultivo fue depositado en un tubo de 50 ml para centrífuga, mismo que se mantuvo a 4 °C. Dos lavados peritoneales fueron realizados por ratón, y con el medio recolectado se obtuvo un pool de células por grupo experimental.

Las células obtenidas fueron contabilizadas en una cámara de Neubauer (Marienfeld Superior, Alemania), utilizando una tinción vital de azul de tripano (Sigma-Aldrich, EUA) en razón 1:1 (v/v). Los pools de PEC se centrifugaron a 200 xg por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue removido y las células fueron resuspendidas en nuevo RPMI 1640 a las concentraciones finales necesarias para su siembra en microcámaras de 8 pozos o microplacas de 6 pozos. Las células fueron incubadas por 24 horas a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ (Forma™ Series II Water Jacket Incubator, Thermo Scientific, EUA), para permitir la adhesión completa de los macrófagos peritoneales, previo al inicio de los tratamientos *ex vivo*. Posteriormente las células no adherentes fueron removidas tras un lavado con PBS.

3.2. Esporas de *Encephalitozoon cuniculi*

Las esporas de *E. cuniculi*, cepa CDC:V283 (ATCC® 50789™), fueron obtenidas mediante previa propagación en la línea celular Vero E6 (ATCC® CCL-81). Para ello, monocapas con el 80 – 90% de confluencia fueron infectadas a una razón célula:espora de 1:10, y los cultivos fueron mantenidos en RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 1% antibiótico y antimicótico (Sigma-Aldrich, EUA), en una incubadora a 37°C y una atmósfera con 5% CO₂. La cosecha de esporas se realizó a las 3 semanas post-infección, cuando los cultivos presentaron un índice de infección del 90 – 100%. De acuerdo con lo descrito por González-Machorro *et al.*, 2019, las esporas viables obtenidas fueron suspendidas en PBS y almacenadas a 4 °C hasta su uso. Dos versiones de esporas inactivadas adicionales fueron preparadas para los desafíos *ex vivo*: inactivadas por calor (EIC) e inactivadas con formalina (EIF). Para obtener EIC, esporas viables diluidas en PBS se incubaron a 90 °C por 30 minutos en un AccuBlock™ (Labnet International, USA). Para las EIF, esporas viables fueron fijadas con formalina neutra tamponada (NBF) al 10% durante 30 minutos, luego éstas se centrifugaron a 1500 xg por 30 min para descartar el fijador y realizar tres lavados más con PBS por centrifugación y decantación. Todas las versiones de la espora se preservaron en PBS en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

3.3. Activación de macrófagos y desafíos *ex vivo*

Para obtener células M1, los macrófagos peritoneales recibieron un co-estímulo con 100 ng/ml de LPS (*Escherichia coli* O111:B4, L4391, Sigma-Aldrich, EUA) y 20 ng/ml de IFN- γ (Mouse Interferon-gamma, recombinant, 22060589 bioPLUS™, BioWorld, EUA) durante 24 horas. Alternativamente, las células M2 fueron activadas utilizando 20 ng/ml de IL-4 (Recombinant mouse IL-4 protein, ab9729, Abcam, EUA) durante 24 horas, según lo descrito por Martinez *et al.* (2015). Macrófagos sin estimulación previa a los desafíos fueron conservados como controles basales (M ϕ). Posterior al periodo de activación, los estímulos fueron removidos y todas las poblaciones de macrófagos fueron desafiadas con esporas vivas (EV), EIC y EIF a una razón de espora a célula de 10:1, además de PBS como control negativo al desafío, durante 72 horas (Tabla 1).

	M1	M2	Mϕ
Estímulo (24 h)	100 ng/ml LPS 20 ng/ml IFN- γ	20 ng IL4	Ninguno
Desafío (72 h)	10 ⁶ esporas vivas		
	10 ⁶ esporas inactivadas por calor		
	10 ⁶ esporas inactivadas con formalina		
	Control negativo (PBS)		

Tabla 1. Tratamientos para la activación y desafío *ex vivo* de macrófagos peritoneales de los grupos experimentales clínicamente sano e infectado *in vivo*.

3.4. Detección de iNOS y Arg-1

3.4.1. Inmunocitofluorescencia indirecta

Para la detección de iNOS y Arg-1 por IFA, se utilizaron 1.5×10^4 células por pozo incubadas en microcámaras de 8 pozos. Una vez finalizados los tratamientos *ex vivo*, se retiró el medio de cultivo y las células recibieron dos lavados con PBS. A continuación, se realizó la fijación con metanol absoluto a 4 °C por 20 minutos, seguida de la permeabilización con PBS-Triton X 0.1% (PBST). Los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados con suero de caballo al 10% diluido en PBST, durante 1 hora a temperatura ambiente. En seguida se realizó la incubación con anticuerpos monoclonales primarios contra iNOS (Mouse mAb anti-iNOS, ab210823, Abcam, UK) y Arg-1 (Rabbit mAb antiARG1, ab91279, Abcam, UK) a 4 °C durante toda una noche. Al día siguiente, luego de dos lavados con PBST, las laminillas fueron incubadas con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón conjugado (ab150117, Alexa Fluor® 488, Abcam, UK) y anti-IgG de conejo conjugado (ab150088, Alexa Fluor® 594, Abcam, UK), a temperatura ambiente por 2 horas, y después lavadas con PBS. Finalmente, se removieron las microcámaras y las laminillas se montaron utilizando un medio con DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) (Vectashield®, Abcam, UK) para la contratinción de núcleos. La visualización de los campos se llevó a cabo con un microscopio de epifluorescencia (DM1000, Leica Microsystems, USA). La captura de imágenes se realizó a través del programa QCapture Pro 7™ (Teledyne Photometrics, USA), utilizando 10 segundos de exposición para ambos marcadores. Posteriormente, la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada marcador fue calculada en el programa ImageJ, versión 1.8.0_172 (NIH, USA) realizando conteos de 100 células por tratamiento por triplicado.

3.4.2. Extracción de ARN

El medio de cultivo fue retirado y se procedió a realizar dos lavados con PBS. Un total de 2×10^5 células por tratamiento fueron lisadas utilizando 1 ml de TRIzol™ Reagent (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, USA) a temperatura ambiente. Los lisados se transfirieron a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se homogeneizaron mediante pipeteo. A cada muestra se le agregaron 200 µl de cloroformo frío. Los tubos fueron centrifugados a 12000 xg por 15 minutos a 4 °C para la separación de fases. La fase acuosa fue

transferida a un tubo nuevo, al cual se agregaron 500 µl de isopropanol frío, seguido de una incubación a temperatura ambiente de 10 minutos y una centrifugación a 12000 xg por 10 minutos a 4 °C para la precipitación del ARN total. El precipitado recibió una serie de lavados con etanol al 75%, agitación y centrifugación a 7500 xg por 5 minutos a 4°C. Finalmente, el pellet fue secado a 37 °C por 20 minutos, y posteriormente resuspendido en 30 µl de agua libre de nucleasas. El ARN total obtenido fue cuantificado por espectrofotometría (Epoch Microplate Spectrophotometer, Agilent BioTek, EUA).

3.4.3. Transcripción reversa

La síntesis de ADN complementario (cADN) se realizó a partir de 75 ng de RNA total por reacción de 20 µl. Para la retrotranscripción fue utilizado un kit comercialmente disponible con transcriptasa reversa, *primer* Oligo(Dt)₁₅, dNTPs y MgCl₂ (GoScript® Reverse Transcription Mix, Oligo(dT)). La mezcla fue incubada a 25 °C por 5 minutos (alineación), 42 °C por 1 hora (extensión) y finalmente a 70 °C por 15 minutos para la inactivación de la enzima. El cADN obtenido fue cuantificado por espectrofotometría y la concentración final se ajustó a 100 ng/µl. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

3.4.4. PCR en tiempo real

La expresión de *Nos* y *Arg1*, así como de *Actb* como gen normalizador, fue cuantificada utilizando ensayos de sondas de hidrólisis prediseñados (PrimeTime® Mini qPCR Assay, Mm.PT.58.43705194, Mm.PT.58.8651372 y Mm.PT.39a.22214849, respectivamente) y un kit de qPCR con máster mix que contenía DNA polimerasa, MgCl₂, dNTPs, buffer de reacción, y colorante CXR de referencia (GoTaq® Probe qPCR, Promega). A cada reacción fueron agregados 100 ng de cADN y se aforó el volumen con agua libre de nucleasas a 20 µl por reacción.

Las condiciones para amplificación fueron las mismas para todos los genes de interés, las cuales consistieron en 1 ciclo de preincubación a 52 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 10 minutos, hibridación a 95 °C por 15 segundos y extensión a 60 °C por 45 s, en un termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied

Biosystems, EUA). La expresión génica fue calculada usando el método comparativo de $\Delta\Delta Ct$ y los resultados se reportan como la diferencia de transcripción relativa a la muestra control (M ϕ de ratones no infectados).

3.5. Detección de esporas en orina y heces con Calcoflúor White

Muestras de orina fueron recolectadas en un pool por cada grupo experimental, las cuales se conservaron a -20 °C hasta su uso. También se obtuvieron muestras de heces por cada grupo; éstas fueron fijadas en NBF al 10% y almacenadas a temperatura ambiente hasta su uso. Tanto para el análisis urológico como coprológico el protocolo de tinción con Calcoflúor White (CW) fue el mismo. Cada pool fue homogeneizado y utilizando un asa bacteriológica esterilizada por calor, se tomó una muestra del contenido para realizar un frotis sobre un portaobjetos. Los frotis fueron fijados por calor usando un mechero de Bunsen. Posteriormente, las laminillas fueron sumergidas en metanol absoluto por 10 – 20 segundos. Luego del secado a temperatura ambiente, cada frotis fue cubierto con CW utilizando una pipeta Pasteur. La incubación con la tinción se realizó por 5 minutos, seguida de lavados gentiles con agua destilada. Los frotis fueron secados a temperatura ambiente y montados con resina. Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Axiostar Plus, Carl Zeiss Inc., Alemania) a 100X para la detección de esporas.

3.6. Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de la cuantificación de expresión génica relativa, así como de intensidad media de fluorescencia (MFI), fueron analizados a través de un ANOVA por Diseño Factorial con comparación de medias de Tukey, con un nivel de significancia de 0.05, en el programa Minitab® ver. 17.1 (Minitab Inc., EUA).

4. RESULTADOS

4.1. Confirmación del modelo de infección murino

En las muestras de orina, procesadas con CW, del grupo clínicamente sano no se observaron estructuras correspondientes a esporas (Fig. 4). Por lo tanto, el grupo se consideró negativo a *E. cuniculi* a los 30 días posteriores al inicio del estudio. Por otro lado, en el grupo infectado por 30 días, esporas de morfología ovoide se observaron de color azul por fluorescencia sobre un fondo oscuro en muestras de orina teñidas con CW. Éstas tenían dimensiones de alrededor de 1 – 2 μm de largo por 0.5 – 1 μm ancho (Fig. 5).



Figura 4. Frotis de orina de ratones del grupo sano. No se observan esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. Tinción Calcoflúor White. 100X. Barra = 5 μ m.

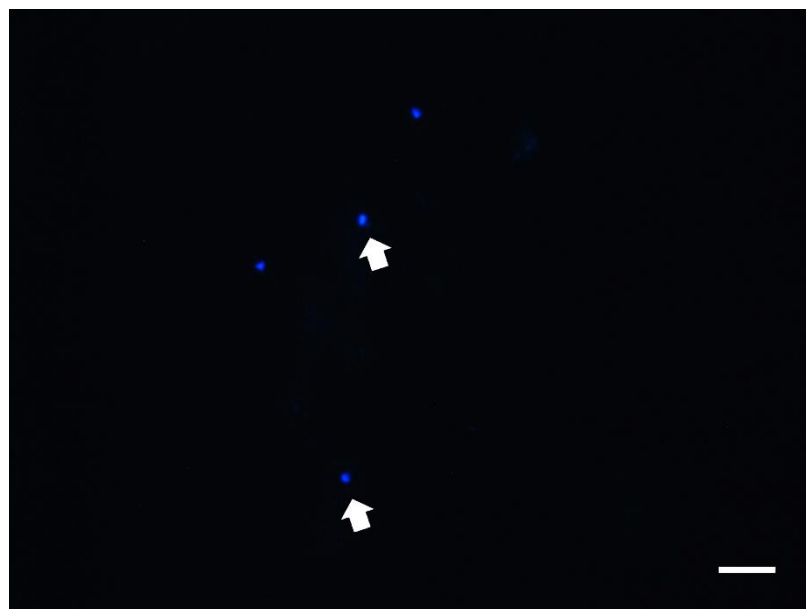


Figura 5. Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en frotis de orina de ratones del grupo infectado. Se observan esporas ovoides fluorescentes (flechas) sobre un fondo oscuro. Tinción Calcoflúor White. 100X. Barra = 5 μ m.

4.2. Detección de iNOS y Arg-1

4.2.1. Inmunocitofluorescencia indirecta

4.2.1.1. Grupo sano

4.2.1.1.1. Efecto de los desafíos con la espora sobre M ϕ

Los macrófagos que no fueron desafiados con ninguna versión de la espora mantuvieron un fenotipo compatible con M2 por la inmunopositividad única al marcador Arg-1 en la mayoría de las células. La morfología de estos macrófagos era alargada o fusiforme, aunque en algunos casos no se apreciaron proyecciones del citoplasma (Fig. 6). La predominancia del fenotipo M2 también fue observada en los M ϕ desafiados con la espora viva de *E. cuniculi*, pero con menor intensidad que el control sin desafío. En algunos campos se observó un resultado positivo para iNOS y Arg-1 en la misma célula, indicando un posible estado transitorio entre M1 y M2. Morfológicamente estas células adoptaron una conformación redonda y extendida luego del desafío (Fig. 7). El desafío con EIC generó un estado de activación para M2 similar a la EV en intensidad de fluorescencia para Arg-1, sin embargo, con EIC se observó una mayor cantidad de células inmunopositivas a ambos marcadores, además de células que no presentaban un estado de polarización M1 o M2 detectable. Los macrófagos, mayormente M2-positivos, tuvieron una morfología más extendida que aquellos en transición o sin un estado de polarización M1/M2 aparente (Fig. 8). En los macrófagos desafiados con EIF predominó el fenotipo M2, aunque también se detectó un estado transitorio M1/M2, además de algunas células sin positividad a cualquiera de los marcadores. La morfología de las células M2 fue extendida y ocasionalmente fusiforme (Fig. 9).

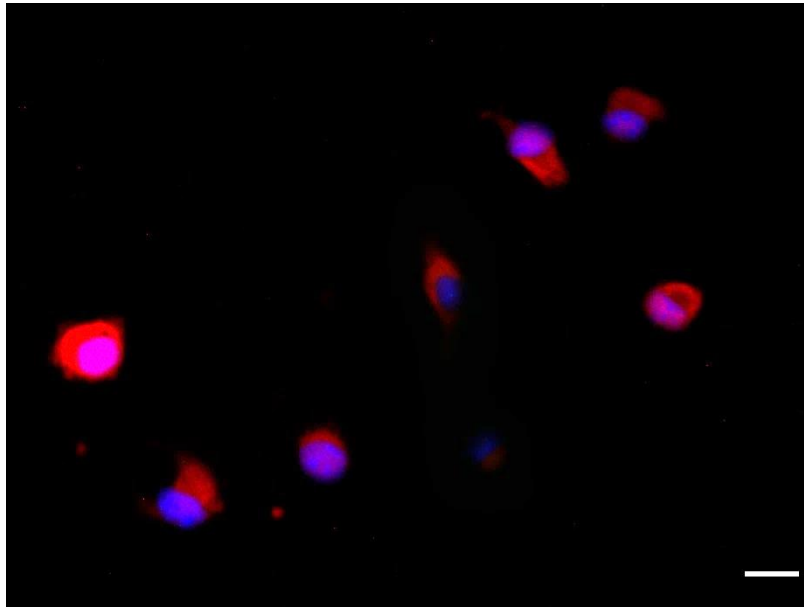


Figura 6. Macrófagos basales del grupo clínicamente sano, sin desafío *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

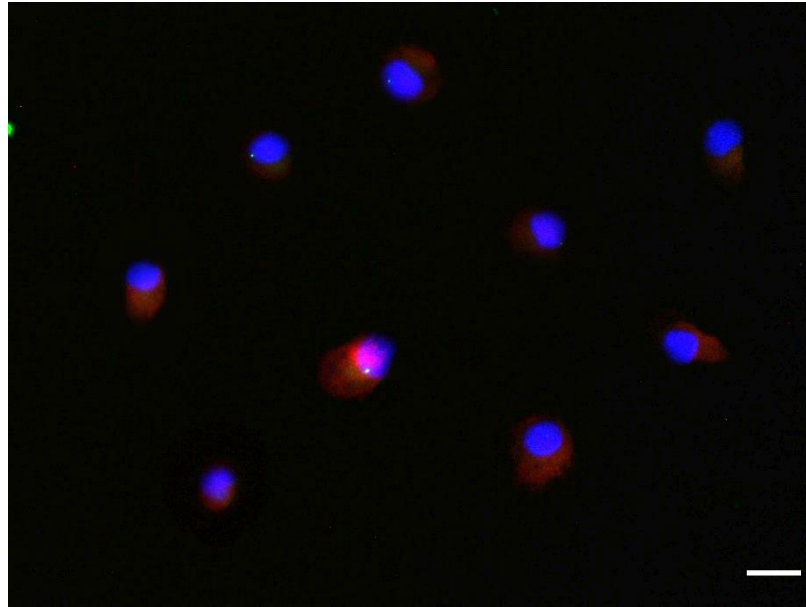


Figura 7. Macrófagos basales del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

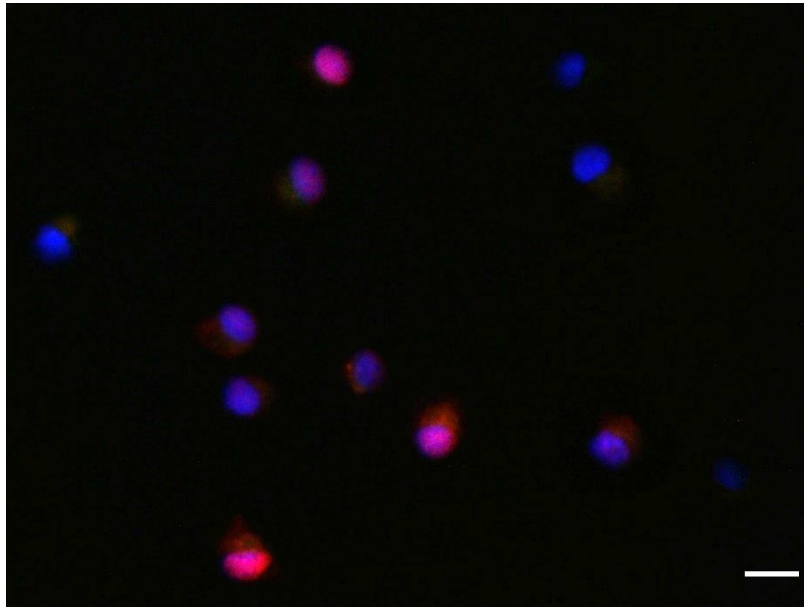


Figura 8. Macrófagos basales del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

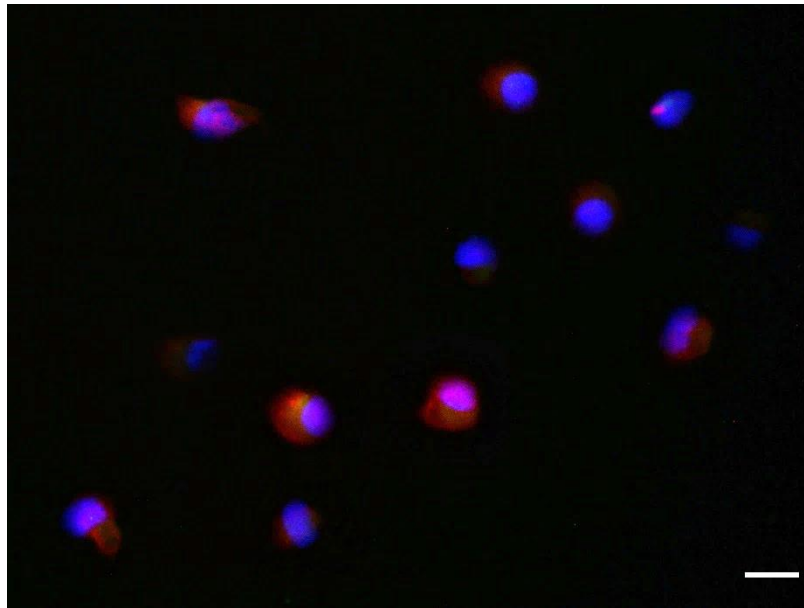


Figura 9. Macrófagos basales del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

La intensidad media de fluorescencia (MFI) de Arg-1 fue mayor ($P < 0.05$) en los M ϕ sin estimulación (50.77 MFI), siendo menor ($P < 0.05$) en los macrófagos desafiados con EIC ($P < 0.05$). La positividad para Arg-1 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la de iNOS en todos los desafíos ($P < 0.05$). La MFI para iNOS fue más elevada en ausencia de desafío, pero disminuyó en el desafío con EIC ($P < 0.05$). No hubo ninguna diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la MFI de los desafíos con EIC y EIF para Arg-1 ni iNOS (Fig. 10).

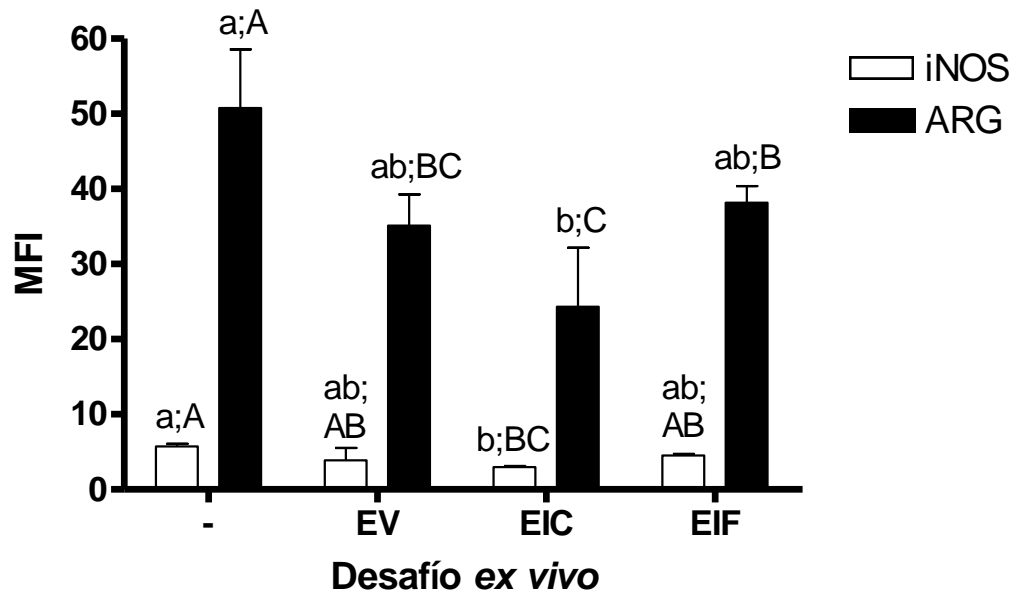


Figura 10. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos basales de ratones clínicamente sanos. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media (MFI). Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo marcador dentro del grupo experimental. *A-C* señalan medias para el mismo marcador entre grupos.

4.2.1.1.2. Efecto de los desafíos con la espora sobre macrófagos M1

Los macrófagos peritoneales estimulados inicialmente *in vitro* para el fenotipo M1 (IFN- γ +LPS) presentaron una disminuida o nula positividad para iNOS, incluso cuando se expusieron a todos los desafíos. Los macrófagos M1 control sin espora retornaron a un fenotipo M2, similar a lo observado en M ϕ (sin activación M1 previa), o en algunos casos dejaron que presentaran positividad tanto a iNOS como a Arg-1, con una morfología redonda o extendida (Fig. 11). Con el desafío con EV, no se detectó un incremento en la positividad a iNOS ni Arg-1, sino que la intensidad de la señal para ambos marcadores fue menor a la observada en el control sin desafío, por lo que estas células no expresaron un fenotipo polarizado hacia M1 o M2 (Fig. 12). El desafío con EIC mostró ligeramente mayor positividad M2, con una morfología más extendida (Fig. 13). Los macrófagos M1 desafiados con EIF presentaron un mayor número de células inmunopositivas a Arg-1, y con leve positividad a iNOS. Estas células predominantemente M2 presentaban una morfología extendida (Fig. 14).

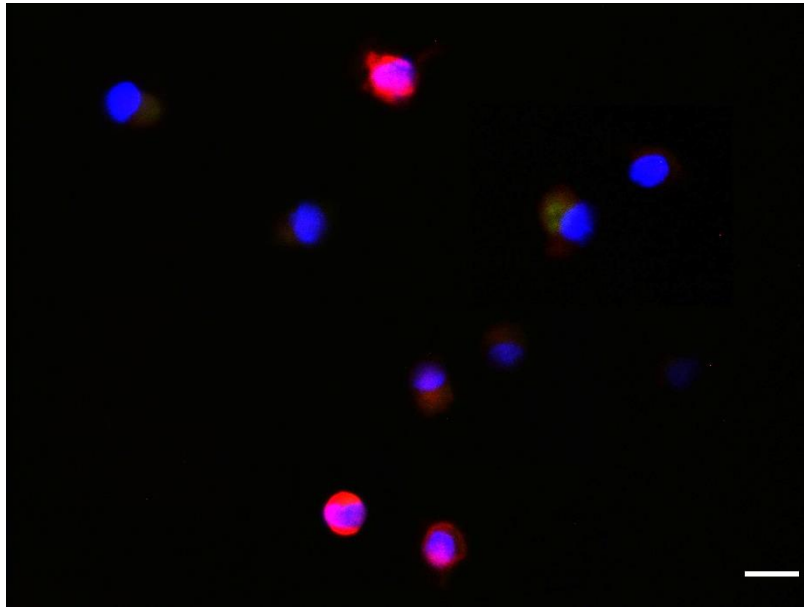


Figura 11. Macrófagos M1 del grupo clínicamente sano, sin desafío *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

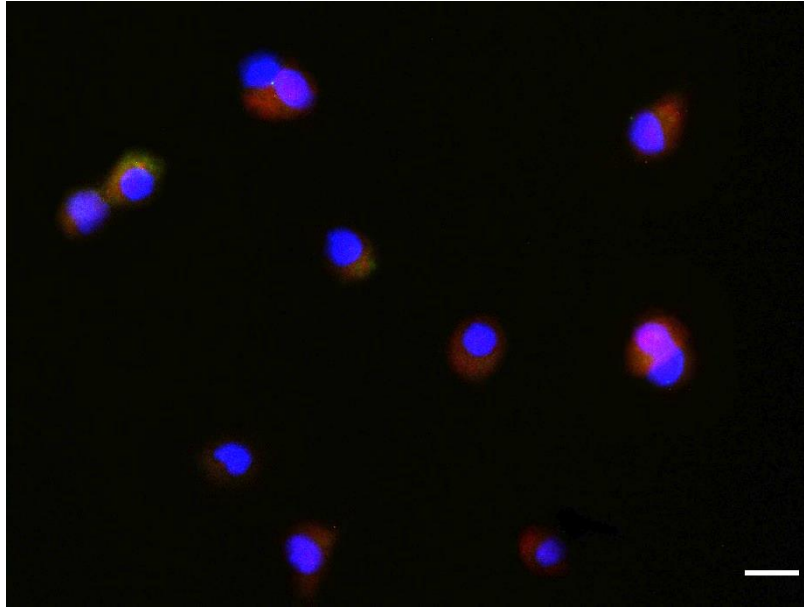


Figura 12. Macrófagos M1 del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

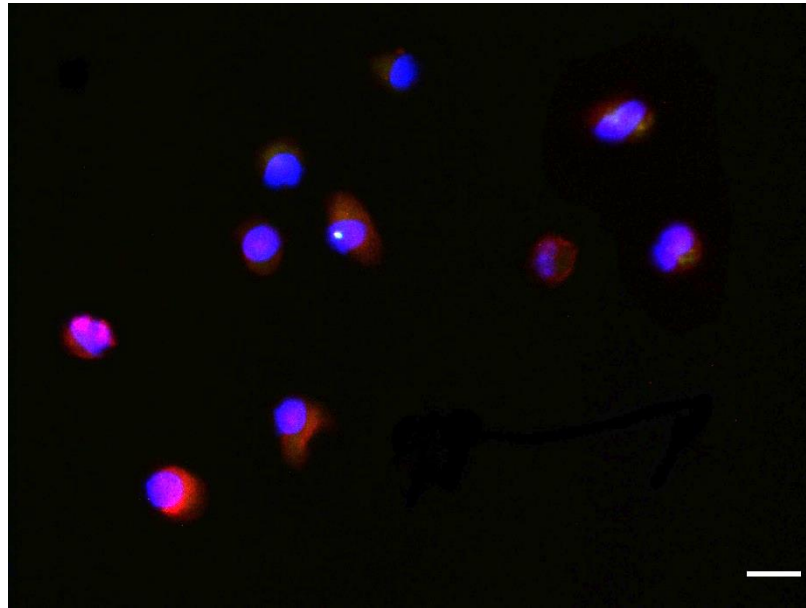


Figura 13. Macrófagos M1 del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

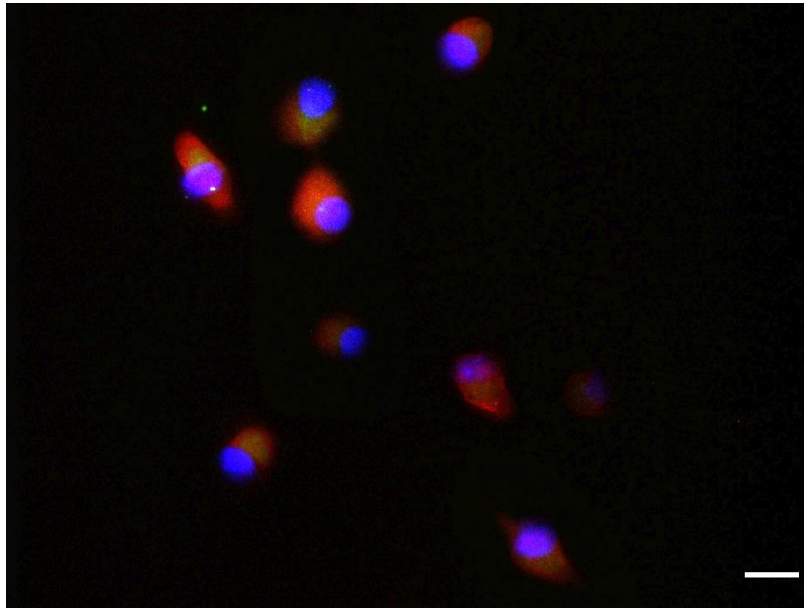


Figura 14. Macrófagos M1 del grupo clínicamente sano, desafiados con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

En la figura 15 se muestran los valores de MFI para cada desafío en macrófagos previamente estimulados hacia M1. La intensidad de la señal para Arg-1 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a la obtenida para iNOS en todos los desafíos ($P < 0.05$), por lo que el fenotipo predominante detectado por IFA fue M2. La mayor intensidad ($P < 0.05$) para Arg-1 se obtuvo en macrófagos sin desafío con la espora (29.38 MFI), mientras que la menor fue correspondiente al desafío con EV (15.17 MFI). En el caso de iNOS, la MFI más alta ($P < 0.05$) correspondió al desafío con EIC (13.50 MFI).

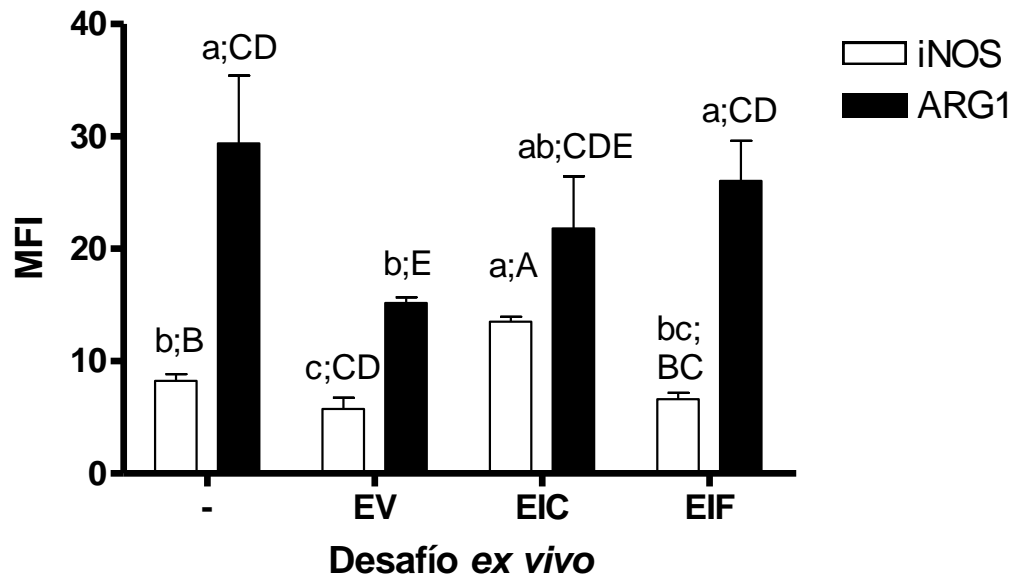


Figura 15. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M1 de ratones clínicamente sanos. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media (MFI). Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-c* señalan medias para el mismo marcador dentro del grupo experimental. *A-E* señalan medias para el mismo marcador entre grupos.

4.2.1.1.3. Efecto de los desafíos con la espora sobre macrófagos M2

La estimulación para el fenotipo M2 (+IL-4) en macrófagos peritoneales resultó en una elevada señal para Arg-1. La morfología fue fusiforme o extendida, la cual se conservó después de 72 horas del estímulo en macrófagos sin desafío con la espora (Fig. 16). Curiosamente, la positividad a M2 aumentó en los macrófagos luego del desafío con la EV, en los cuales el citoplasma se observaba ampliamente expandido en comparación con el grupo control (sin espora) (Fig. 17). En contraste, el desafío con la EIC no estimuló la positividad a M2 ni a M1, donde la señal para ambos marcadores fue casi nula (Fig. 18). Para el desafío con EIF, el fenotipo predominante fue M2 de manera similar a EV, aunque más uniformemente en la población, con morfología redonda o fusiforme y con poca extensión (Fig. 19).

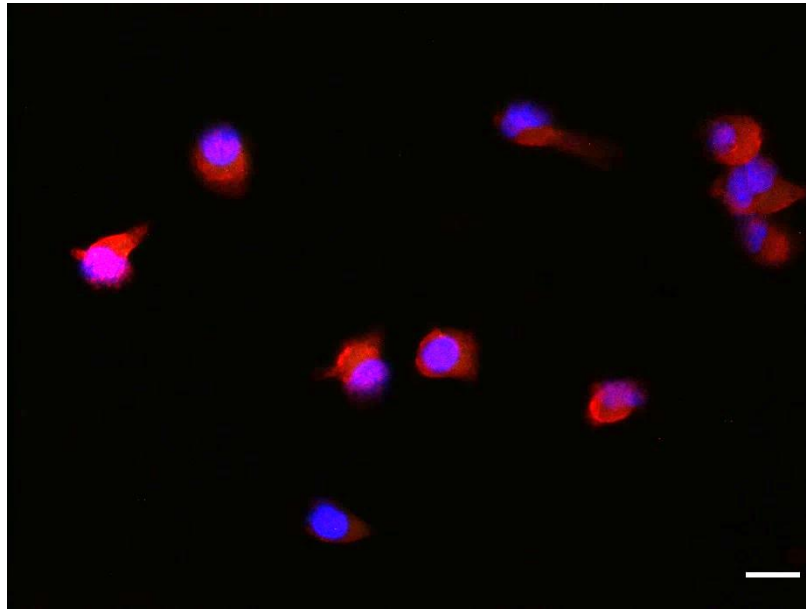


Figura 16. Macrófagos M2 del grupo clínicamente sano, sin desafío con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

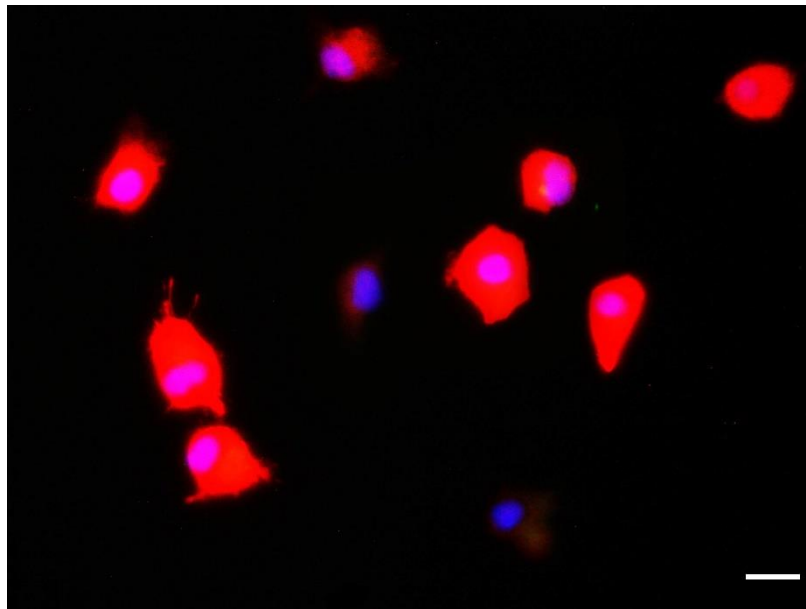


Figura 17. Macrófagos M2 del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

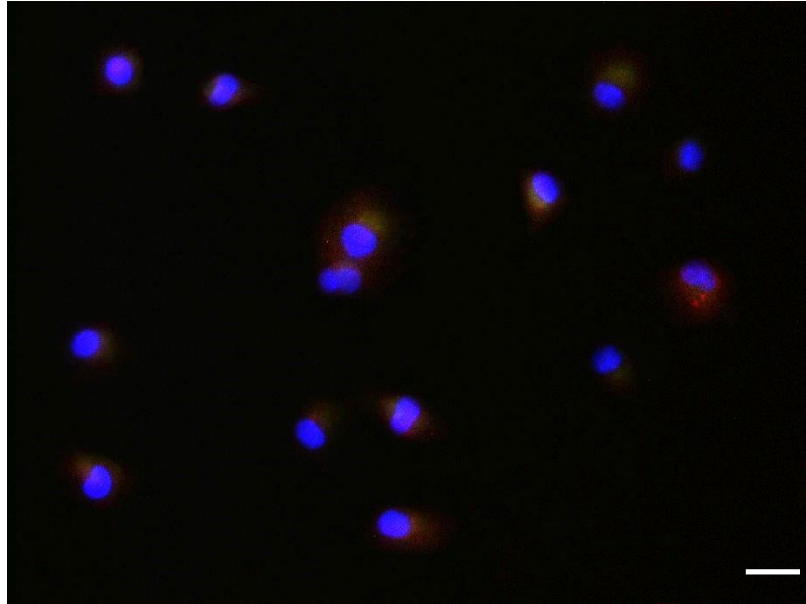


Figura 18. Macrófagos M2 del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

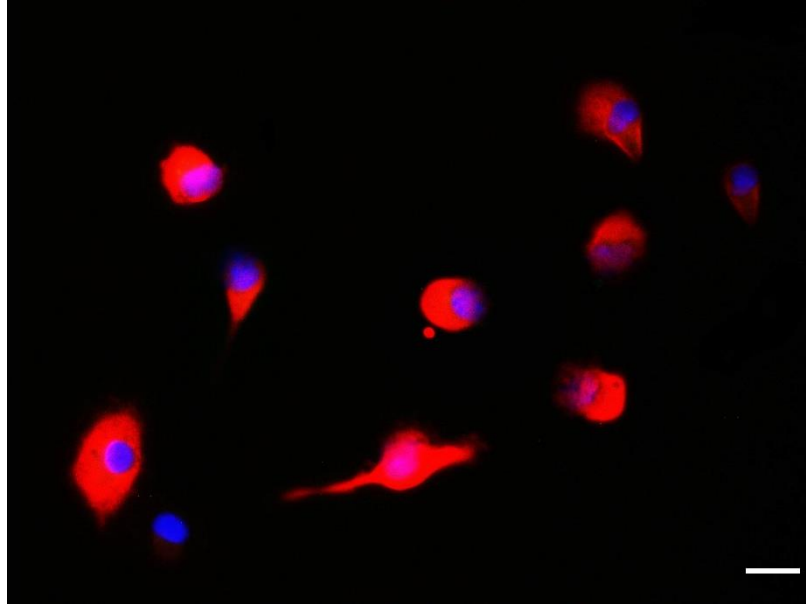


Figura 19. Macrófagos M2 del grupo clínicamente sano, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

El fenotipo de los macrófagos previamente estimulados hacia M2 se conservó en la mayoría de los desafíos (Fig. 20). No obstante, el desafío *ex vivo* con EIF mostró la señal más elevada ($P < 0.05$) para Arg-1 (134.93 MFI), mientras que la menor ($P < 0.05$) señal se observó con las EIC (28.78 MFI). En todos los desafíos la positividad para Arg-1 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que para iNOS. Para iNOS, la mayor intensidad de señal se obtuvo con los desafíos EV y EIF, entre los cuales no existió una diferencia estadística ($P > 0.05$).

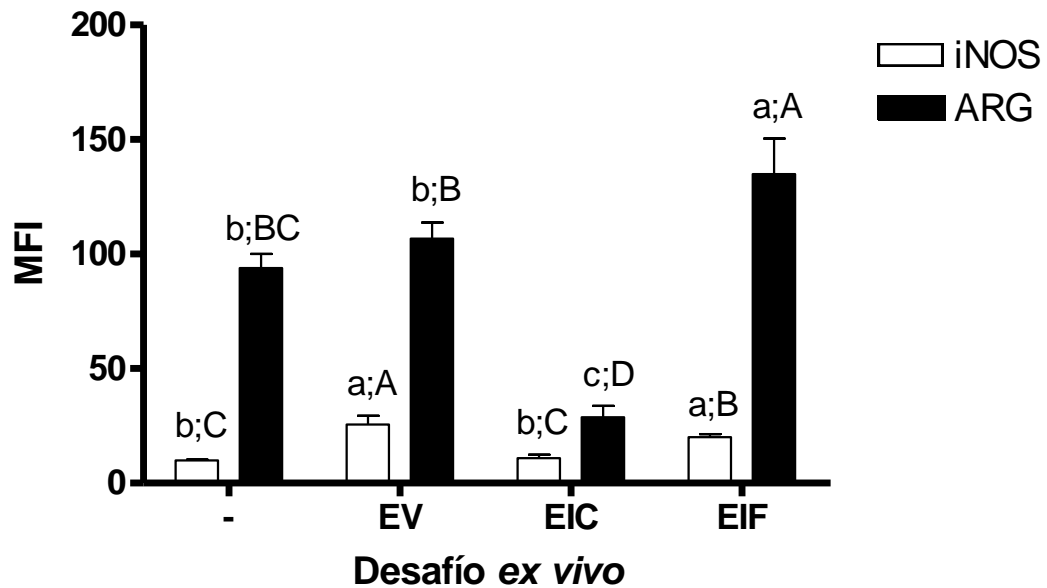


Figura 20. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M2 de ratones clínicamente sanos. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media (MFI). Las barras que no compartan la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo marcador dentro del grupo experimental. *A-C* señalan medias para el mismo marcador entre grupos.

4.2.1.2. Grupo infectado *in vivo*

4.2.1.2.1. Efecto de los desafíos de la espóra sobre M ϕ

Los M ϕ del grupo infectado presentaron una menor MFI, la cual fue observada para ambos marcadores en todos los desafíos. Los macrófagos sin estímulo con la espóra mantuvieron un fenotipo hacia M2, y con una morfología fusiforme (Fig. 21). El desafío con EV elevó discretamente la positividad hacia iNOS, en comparación con Arg-1. Estos macrófagos con mayor inclinación hacia el fenotipo M1 adoptaban una morfología redondeada y con pocas proyecciones. Sin embargo, la mayoría de las células con este desafío dejaron de expresar positividad a ambos marcadores, aparentando un estado de despolarización tanto para M1 como para M2 (Fig. 22). El desafío con EIC también estimuló la positividad hacia iNOS y Arg-1 en los macrófagos con un fenotipo posiblemente transitorio, mientras que el resto no presentó un estado de polarización para M1 o M2 (Fig. 23). La mayor positividad hacia Arg-1 se observó en macrófagos desafiados con las EIF, en algunos casos presentaron un citoplasma extendido con pocas proyecciones (Fig. 24).

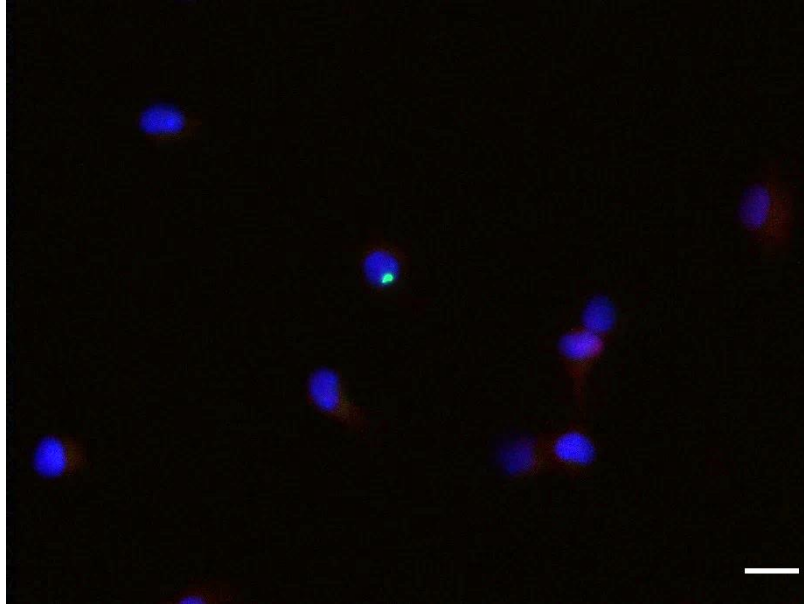


Figura 21. Macrófagos basales del grupo experimentalmente infectado, sin desafío con esporas *ex vivo* de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

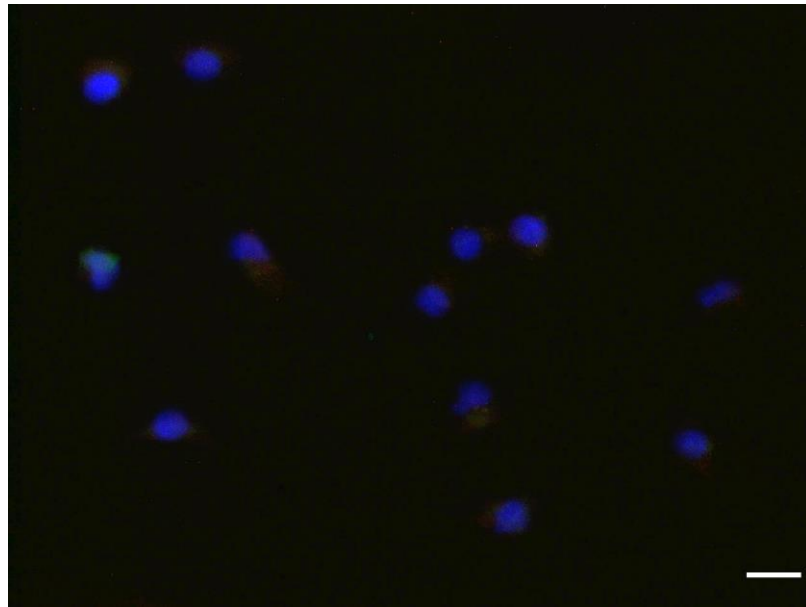


Figura 22. Macrófagos basales del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

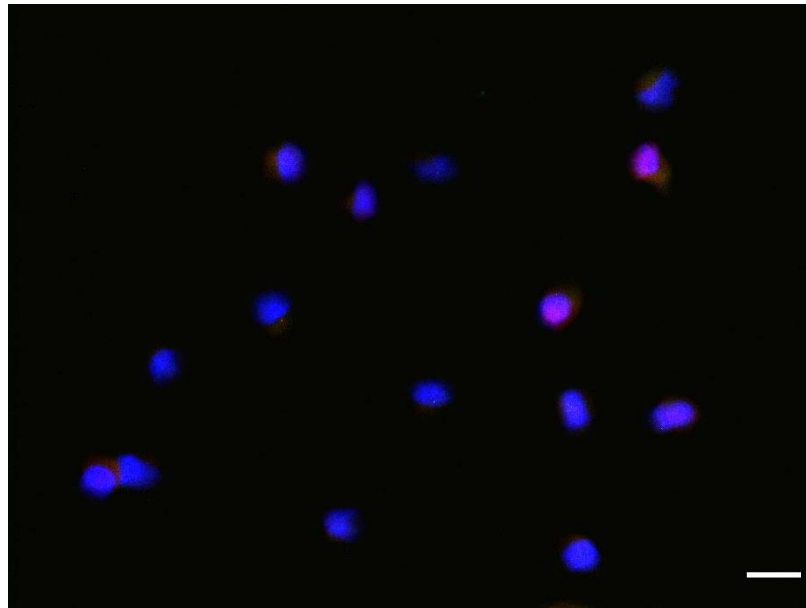


Figura 23. Macrófagos basales del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

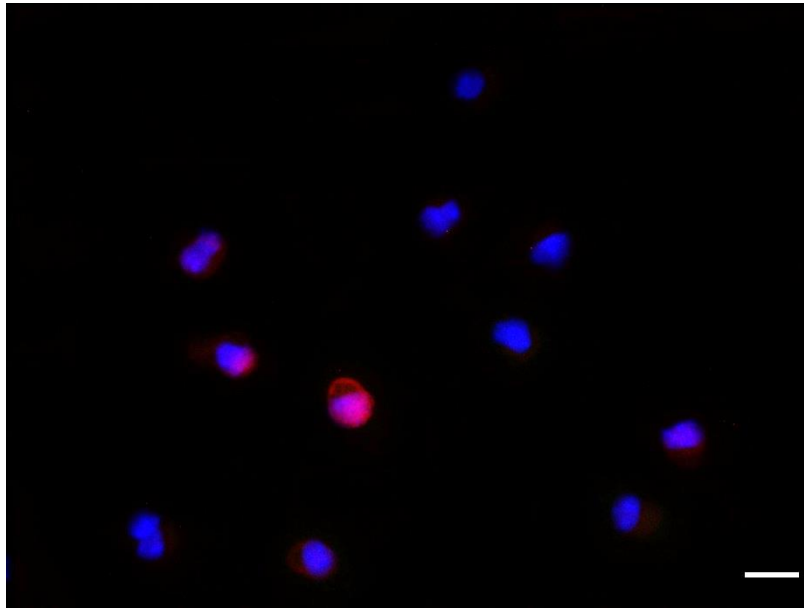


Figura 24. Macrófagos basales del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

La MFI más elevada ($P < 0.05$) fue para Arg-1 en $M\phi$ del grupo infectado luego de ser desafiados con EIF (11.00 MFI), mientras que para el resto de los desafíos la MFI no fue estadísticamente diferente ($P > 0.05$) a la del control sin espora. Para iNOS, la mayor intensidad se obtuvo tras el desafío con EIC (3.44 MFI), aunque estos valores permanecieron bajos ($P < 0.05$) en cualquiera de los desafíos (Fig. 25).

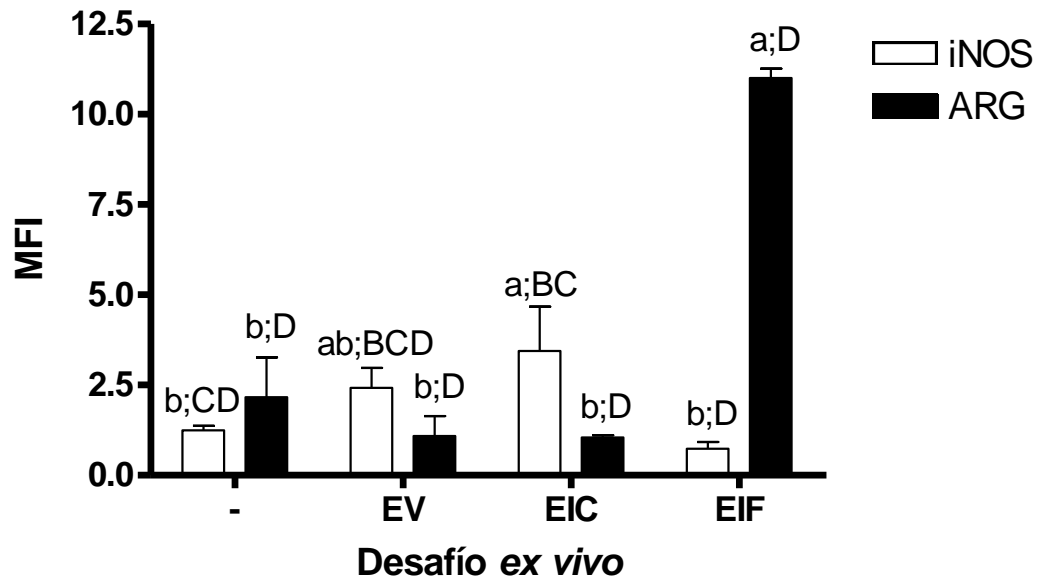


Figura 25. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos basales de ratones infectados *in vivo*. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media (MFI). Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo marcador dentro del grupo experimental. *A-D* señalan medias para el mismo marcador entre grupos.

4.2.1.2.2. Efecto de los desafíos con la espora sobre macrófagos M1

Los macrófagos polarizados hacia el fenotipo M1 (IFN- γ +LPS) del grupo infectado *in vivo* mostraron una repolarización hacia el fenotipo M2. Se observaron múltiples células donde existió positividad hacia ambos marcadores, aunque el marcaje para Arg-1 predominó en estas células en aparente transición del fenotipo M1 al M2. Su morfología era de redonda hasta fusiforme con pocas proyecciones, y extendida en las células con fenotipo M2 (Fig. 26). En el caso del desafío con la EV, predominó el fenotipo M2 en comparación con el control sin desafío, con morfología extendida y fusiforme (Fig. 27). El desafío *ex vivo* con EIC mostró un efecto más proinflamatorio que la EV por la presencia de macrófagos M1, aunque la mayoría de las células adoptaron el fenotipo M2 (Fig. 28). Un efecto similar sobre la positividad a Arg-1 se observó con la EIF, sin embargo, la morfología de las células con este desafío se asemejaba a la de los macrófagos M1, a pesar de no presentar gran positividad a iNOS (Fig. 29).

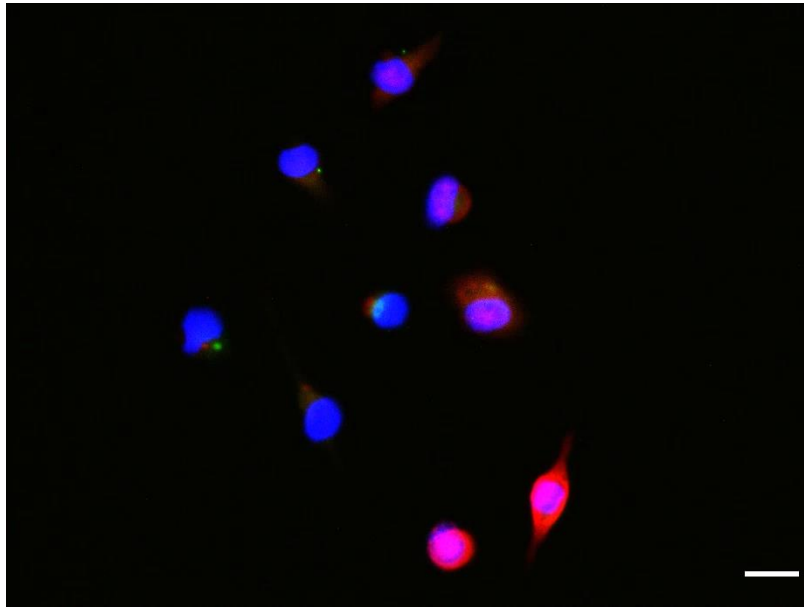


Figura 26. Macrófagos M1 del grupo experimentalmente infectado, sin desafío *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

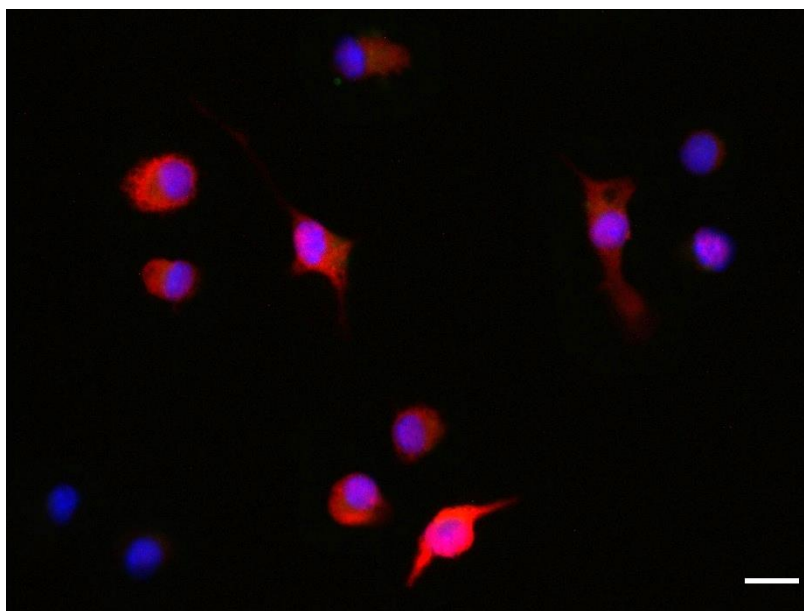


Figura 27. Macrófagos M1 del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

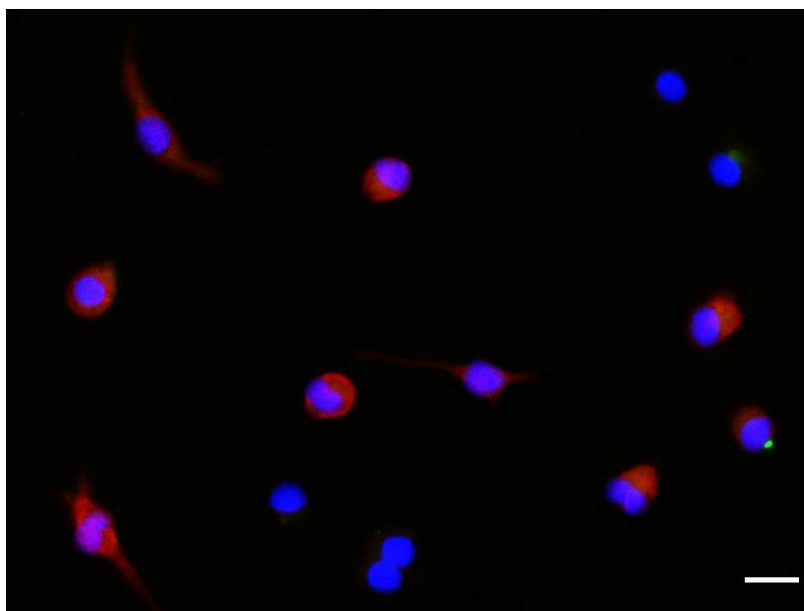


Figura 28. Macrófagos M1 del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

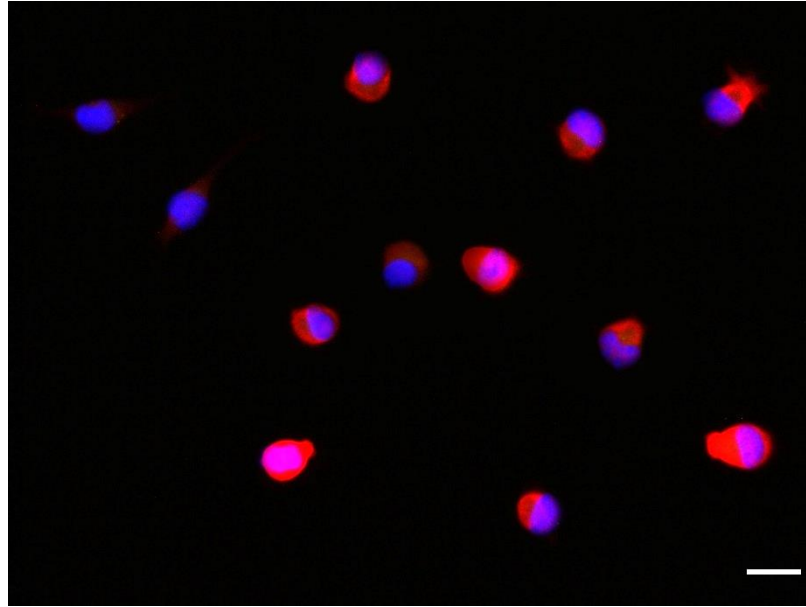


Figura 29. Macrófagos M1 del grupo experimentalmente infectado, desafiados con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

En macrófagos M1 del grupo infectado *in vivo*, todos los desafíos con la espora resultaron en niveles significativamente elevados ($P < 0.05$) de Arg-1 que con iNOS ($P < 0.05$), siendo la mayor intensidad ($P < 0.05$) de señal para Arg-1 con el desafío *ex vivo* de EV (66.75 MFI), por lo que las poblaciones se consideraron repolarizadas hacia M2. En cuanto a la MFI de iNOS, ésta fue la más elevada ($P < 0.05$) en los desafíos EV (8.12 MFI) y EIC (6.90 MFI) (Fig. 30).

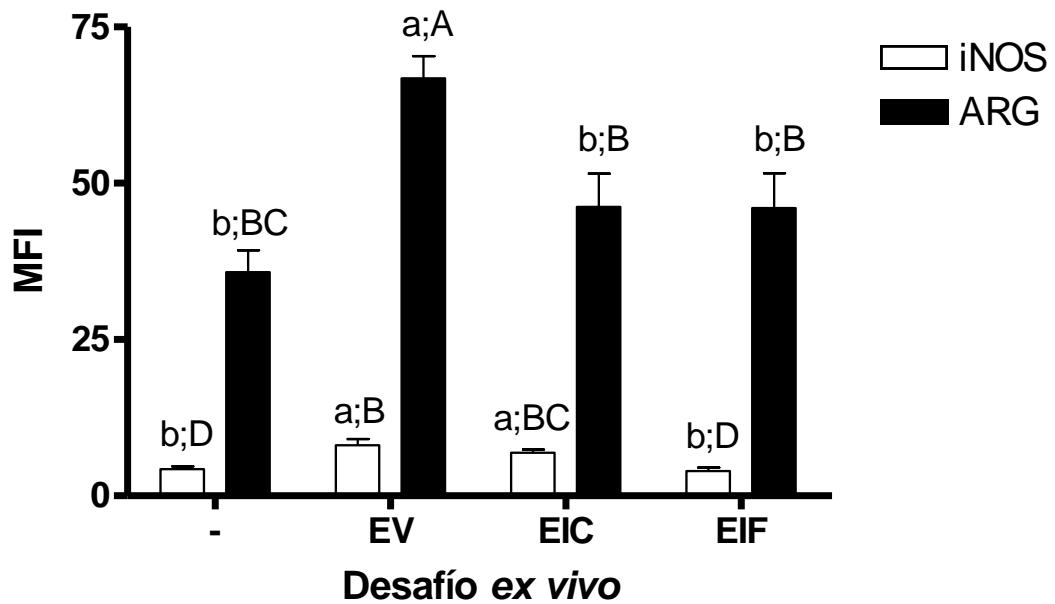


Figura 30. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M1 de ratones infectados *in vivo*. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media (MFI). Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo marcador dentro del grupo experimental. *A-D* señalan medias para el mismo marcador entre grupos.

4.2.1.2.3. Efecto de los desafíos con la espora sobre macrófagos M2

Los macrófagos del grupo infectado *in vivo* y polarizados para M2 (IL-4+), conservaron una alta positividad para Arg-1, sin expresión de iNOS al cabo de 72 h sin desafíos, con algunas células ampliamente extendidas (Fig. 31). Tanto la positividad para Arg-1 como para iNOS fueron incrementadas en todos los desafíos con la espora. Después del desafío con la EV, las células expresaron mayor positividad a iNOS que los macrófagos control (sin desafío), la cual fue detectable casi exclusivamente en células con positividad simultánea a Arg-1, siendo predominante el fenotipo M2 para este tratamiento. La morfología era extendida, similar a la observada en macrófagos M1, con pocas proyecciones y citoplasma redondo (Fig. 32). Por otro lado, el efecto del desafío con EIC tuvo un efecto menor sobre la expresión de iNOS, aunque la de Arg-1 se incrementó a niveles similares a los obtenidos con EV (Fig. 33). Un resultado comparable se obtuvo con EIF para ambos marcadores, aunque morfológicamente estos macrófagos presentaban dimensiones más pequeñas y citoplasmas poco extendidos (Fig. 34).

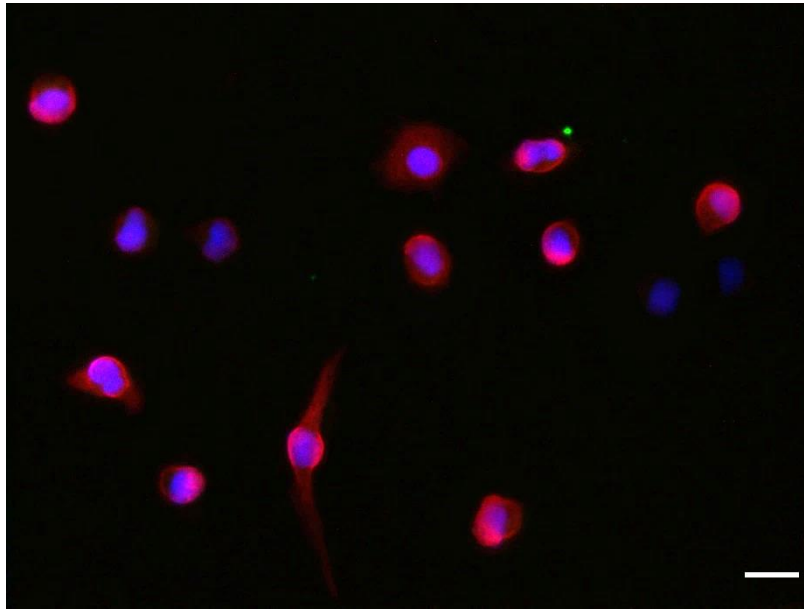


Figura 31. Macrófagos M2 del grupo experimentalmente infectado, sin desafío *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

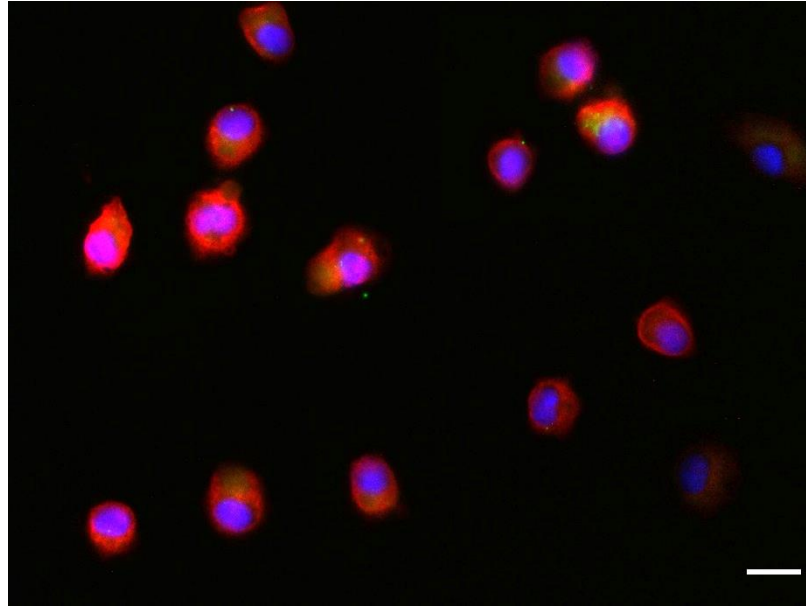


Figura 32. Macrófagos M2 del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μm .

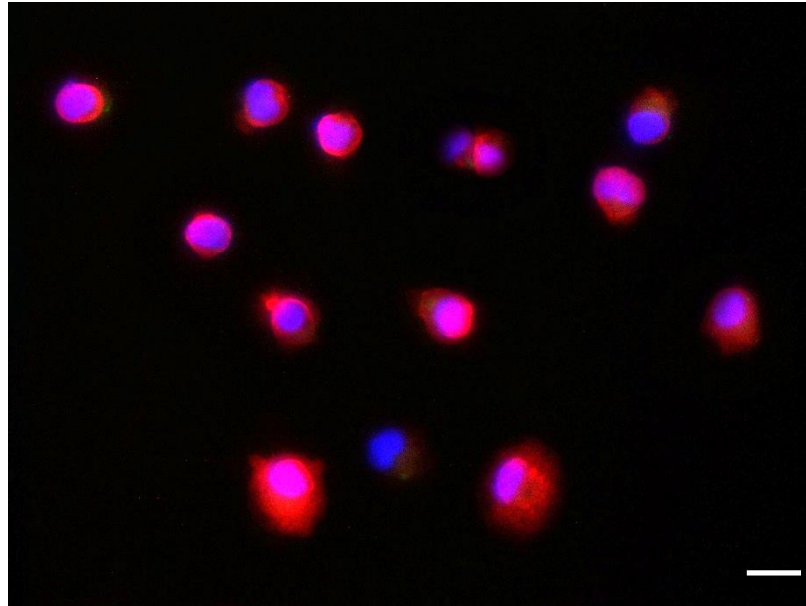


Figura 33. Macrófagos M2 del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

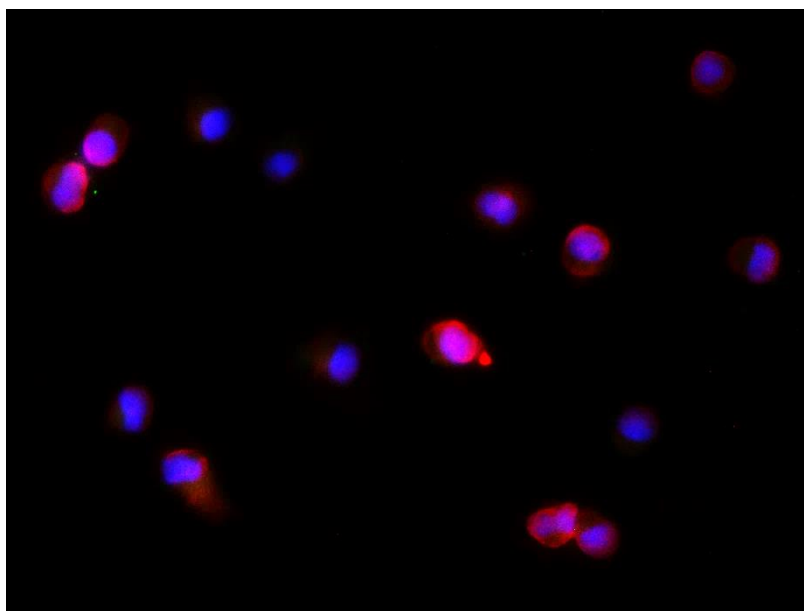


Figura 34. Macrófagos M2 del grupo experimentalmente infectado, desafiados *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina. IFA. Superposición del marcaje anti-iNOS (verde) y anti-Arg-1 (rojo); tinción con DAPI para núcleos (azul). 40X. Barra = 20 μ m.

En la figura 35 se grafica la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M2 del grupo infectado *in vivo* después de los diferentes desafíos *ex vivo* con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora. Para este tratamiento, la intensidad de señal para Arg-1 fue significativamente mayor ($P < 0.05$) a la de iNOS en todos los casos ($P < 0.05$), por lo que el fenotipo se conservó como M2-dominante. Los niveles de Arg-1 más elevados fueron aquellos obtenidos con la espora en sus tres diferentes versiones, sin diferencias estadísticas entre estos ($P > 0.05$), pero sí en comparación con el control sin espora ($P < 0.05$). En cuanto a iNOS, la mayor intensidad de señal ($P < 0.05$) fue expresada por macrófagos M2 desafiados con EV (25.44 MFI), seguida de EIC y EIF.

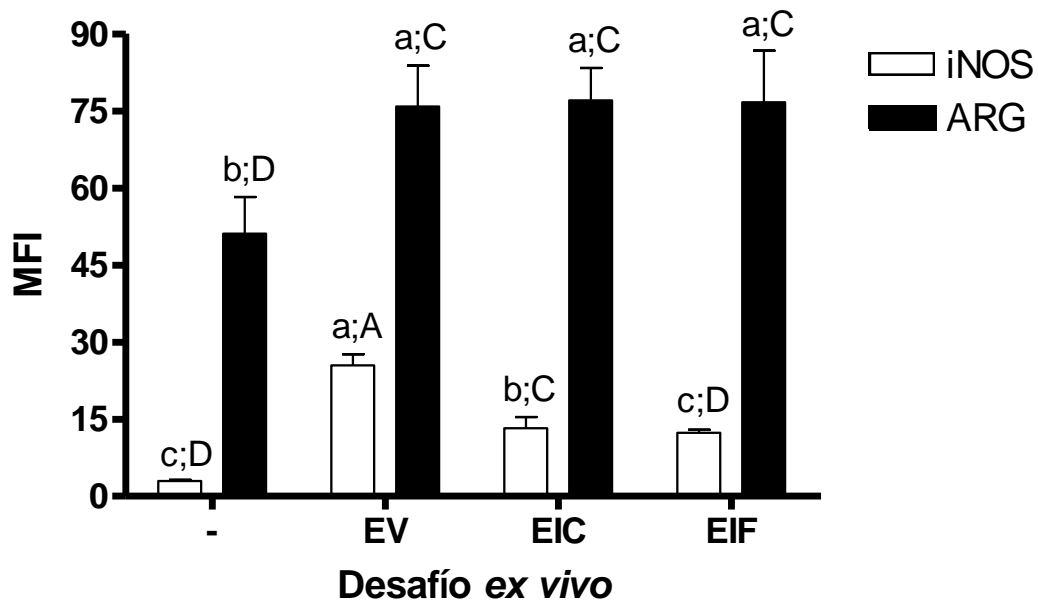


Figura 35. Efecto de los desafíos con las diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la MFI de iNOS y Arg-1 en macrófagos M2 de ratones infectados *in vivo*. Los datos se expresan en unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia media (MFI). Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-c* señalan medias para el mismo marcador dentro del grupo experimental. *A-D* señalan medias para el mismo marcador entre grupos.

4.2.2. Cuantificación de la expresión génica

4.2.2.1. Respuesta de macrófagos peritoneales murinos a la polarización M1/M2 *ex vivo*

La expresión de iNOS y Arg-1 en respuesta a la estimulación por 24 horas para la activación del fenotipo M1 (IFN- γ +LPS) y M2 (+IL-4) en macrófagos peritoneales murinos de los grupos sano e infectado *in vivo* se muestra en la figura 36. Dentro del grupo sano hubo diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en la expresión tanto de iNOS como de Arg-1 ($P < 0.05$). Las células estimuladas hacia el fenotipo M1 expresaron el marcador iNOS, mientras que la estimulación hacia M2 resultó en un incremento significativo ($P < 0.05$) de Arg-1, en comparación con el grupo control basal sin estimulación *ex vivo*. Por otro lado, la estimulación hacia M1 en macrófagos del grupo infectado también resultó en un incremento ($P < 0.05$) en la expresión de iNOS, al igual que la Arg-1, la cual tuvo una diferencia significativamente mayor ($P < 0.05$) al compararlas con las células M2 y las células basales. Las diferencias en la expresión de Arg-1 fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre el grupo sano e infectado, tras la estimulación para M1 o M2, pero no existió diferencia significativa ($P > 0.05$) en la expresión de iNOS entre los grupos después del estímulo para M1.

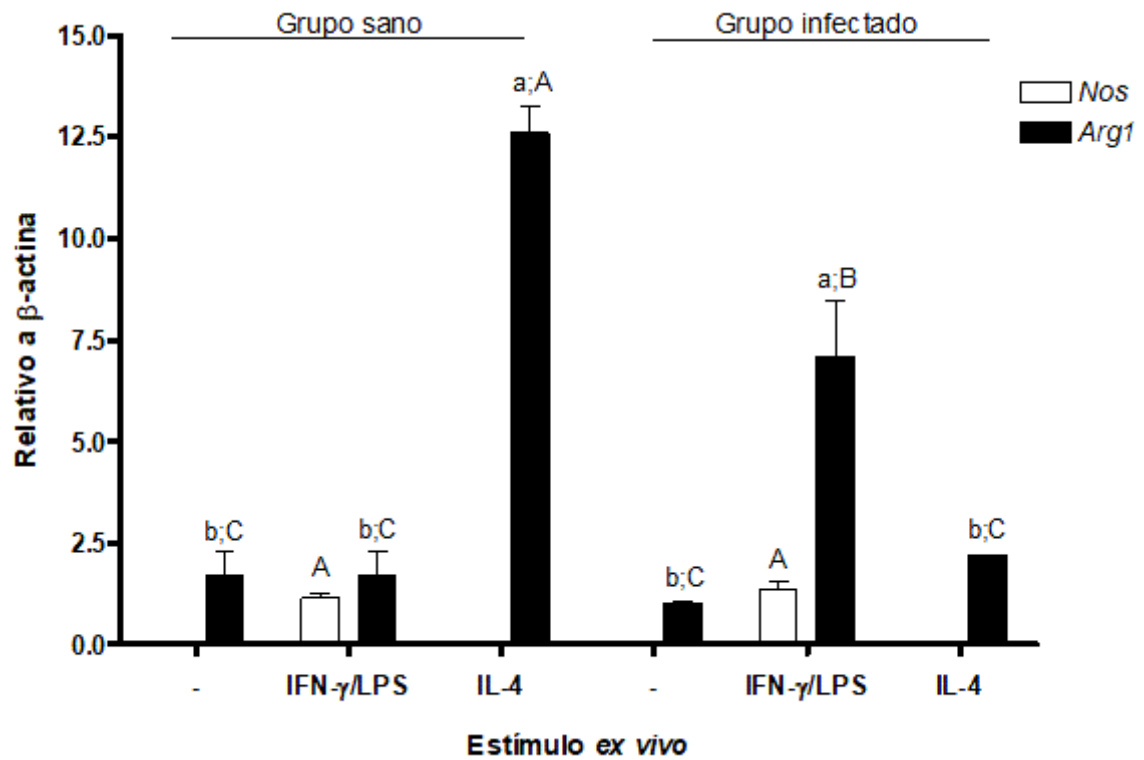


Figura 36. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos basales (-) y estimulados *ex vivo* para la polarización hacia M1 (IFN- γ +LPS) o M2 (IL-4), en los grupos experimentales clínicamente sano e infectado *in vivo* con *Encephalitozoon cuniculi*. Los datos se expresan en unidades de expresión relativa a β -actina como gen normalizador. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo gen dentro del grupo experimental. *A-C* señalan medias para el mismo gen entre grupos.

4.2.2.2. Respuesta de macrófagos M1 y M2 al desafío con la espora viva de *Encephalitozoon cuniculi*

La Fig. 37 muestra la expresión relativa de iNOS y Arg-1 en poblaciones de macrófagos previamente activados hacia M1 y M2, así como M ϕ , luego del desafío *ex vivo* con la EV de *E. cuniculi* en los grupos sano e infectado *in vivo*. Existió una diferencia estadística ($P < 0.05$) tanto en la expresión de iNOS como de Arg-1 dentro de cada grupo experimental, pero sólo de Arg-1 entre los grupos ($P < 0.05$). Los macrófagos M1 expresaron los niveles más altos ($P > 0.05$) de iNOS en respuesta a la EV ($P < 0.05$), aunque no existió diferencia estadística entre grupo sano e infectado. Los niveles más elevados ($P < 0.05$) de Arg-1 se observaron en macrófagos M2 del grupo infectado en comparación con el sano.

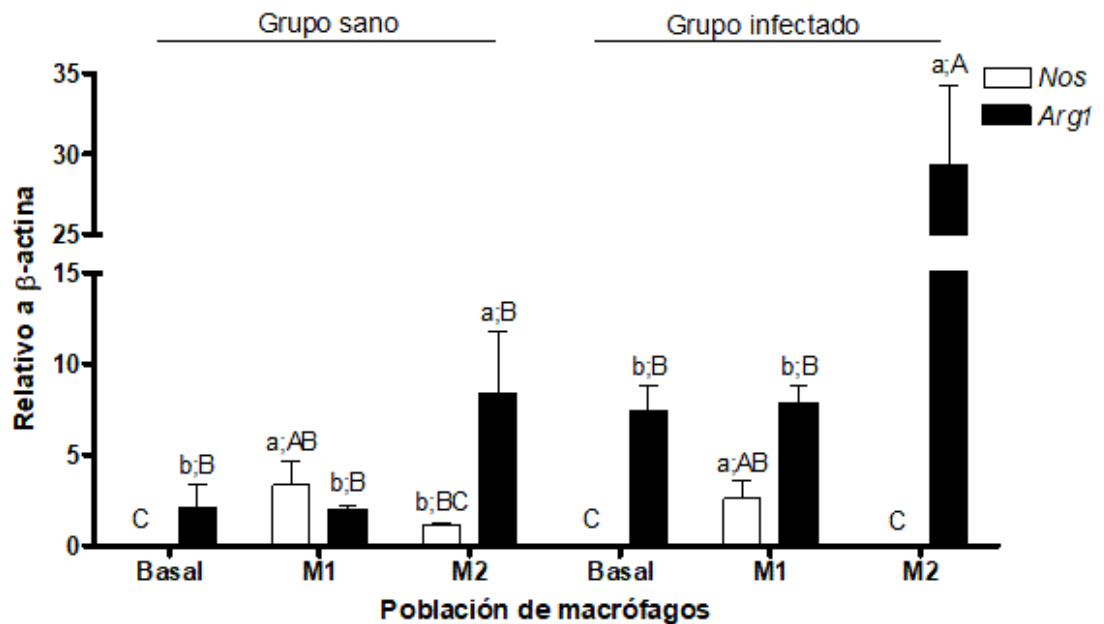


Figura 37. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, luego del desafío *ex vivo* con esporas viables de *Encephalitozoon cuniculi*, en los grupos experimentales clínicamente sano e infectado *in vivo*. Los datos se expresan en unidades de expresión relativa a β -actina como gen normalizador. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo gen dentro del grupo experimental. *A-C* señalan medias para el mismo gen entre grupos.

4.2.2.3. Respuesta de macrófagos M1 y M2 al desafío con la espora inactivada por calor

Los niveles de expresión de iNOS y Arg-1 fueron cuantificados en macrófagos M1, M2 y M ϕ de los grupos sano e infectado *in vivo* en respuesta al desafío *ex vivo* con la EIC (Fig. 38). Existió una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión de iNOS y Arg-1 dentro de cada grupo experimental. La expresión de iNOS fue significativamente diferente ($P < 0.05$) en los macrófagos M1 en respuesta a la EIC dentro de cada grupo experimental, aunque los niveles no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre grupos. El marcador para Arg-1 presentó los niveles más elevados ($P < 0.05$) de expresión génica relativa en los macrófagos M2 del grupo infectado. Además, fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al compararlo con las otras poblaciones de macrófagos en ambos grupos, en respuesta a la EIC, y fue el nivel más elevado observado para cualquiera de los desafíos. El único tratamiento en el que disminuyó la expresión de Arg-1 por debajo del control basal fue en macrófagos M2 del grupo clínicamente sano después del desafío con EIC. No se detectaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en la expresión de iNOS entre grupos, sino sólo de Arg-1 ($P < 0.05$).

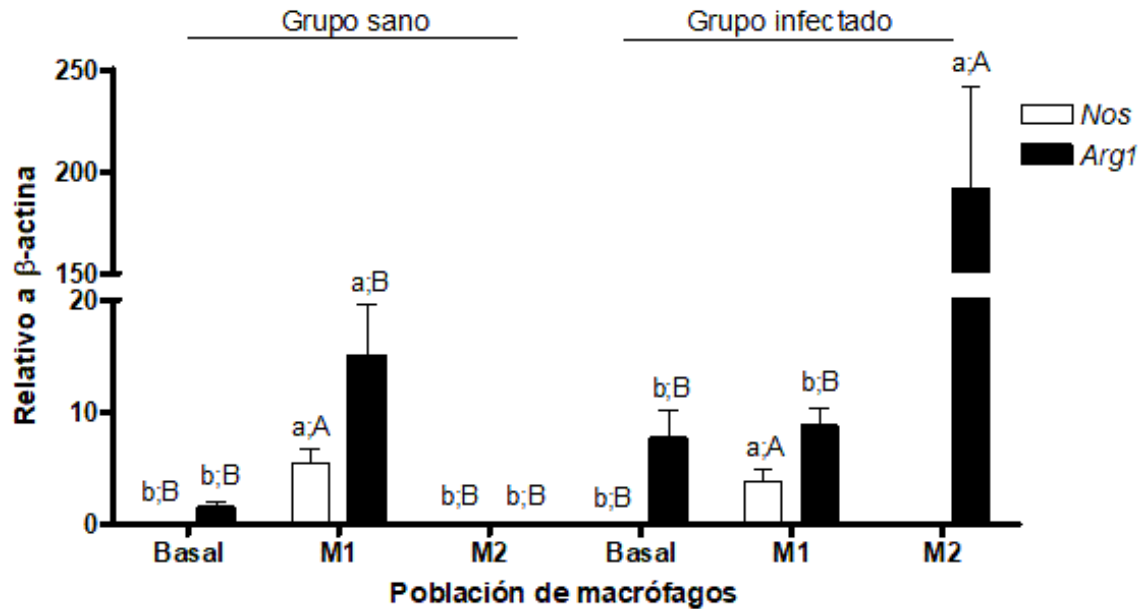


Figura 38. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, luego del desafío *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas por calor, en los grupos experimentales clínicamente sano e infectado *in vivo*. Los datos se expresan en unidades de expresión relativa a β -actina como gen normalizador. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-b* señalan medias para el mismo gen dentro del grupo experimental. *A-B* señalan medias para el mismo gen entre grupos.

4.2.2.4. Respuesta de macrófagos M1 y M2 al desafío con la espora inactivada con formalina

En la figura 39 se muestra la expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos M1, M2 y M ϕ de los grupos clínicamente sano e infectado *in vivo* luego del desafío *ex vivo* con la EIF. La expresión de iNOS y Arg-1 mostraron diferencias significativas ($P < 0.05$), dentro de los grupos sano e infectado, así como entre los grupos. Los niveles de iNOS mostraron incrementos significativos ($P < 0.05$) en macrófagos M1 ante el desafío con EIF, siendo mayor la expresión en el grupo infectado en comparación con el grupo control ($P < 0.05$). La expresión de Arg-1 fue mayor ($P < 0.05$) en macrófagos inicialmente polarizados a M1 *in vitro* del grupo sano después del desafío con EIF, mientras que en el grupo infectado este efecto se observó en macrófagos originalmente activados a M2 ($P < 0.05$).

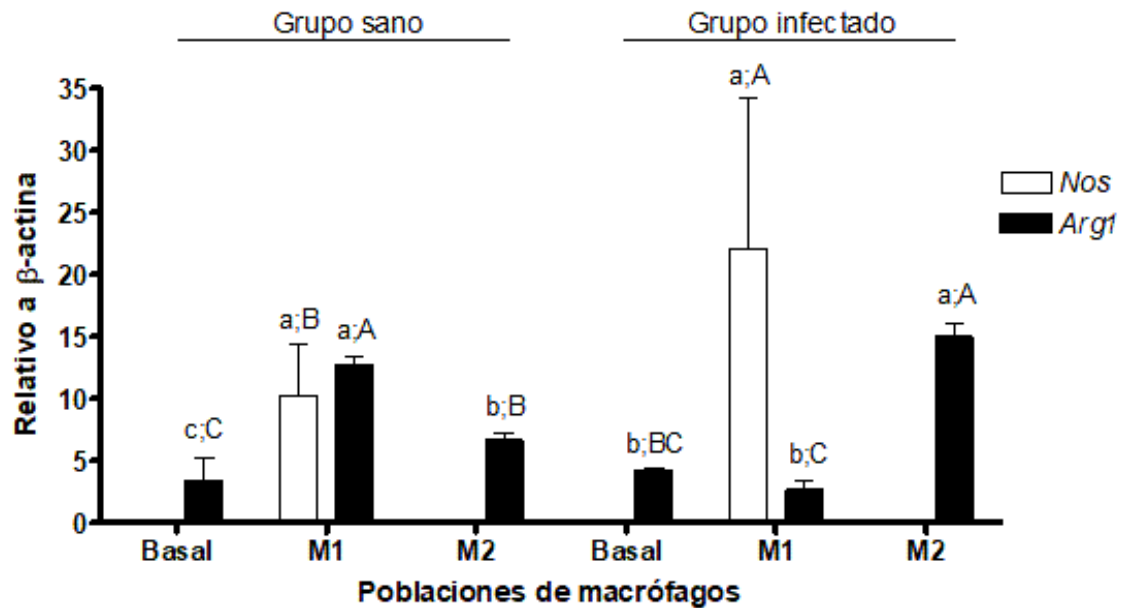


Figura 39. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales, luego del desafío *ex vivo* con esporas de *Encephalitozoon cuniculi* inactivadas con formalina, en los grupos experimentales clínicamente sano e infectado *in vivo*. Los datos se expresan en unidades de expresión relativa a β -actina como gen normalizador. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-c* señalan medias para el mismo gen dentro del grupo experimental. *A-C* señalan medias para el mismo gen entre grupos.

4.2.2.5. Controles sin desafío *ex vivo* con esporas

En ausencia de desafíos con la espora de *E. cuniculi*, todas las poblaciones de macrófagos expresaron una mayor tendencia hacia el fenotipo M2, siendo los niveles de expresión génica de Arg-1 más elevados ($P < 0.05$) en las poblaciones previamente estimuladas a M2 en ambos grupos experimentales en comparación con M ϕ y M1. Únicamente los macrófagos M1 del grupo infectado continuaron expresando débilmente ($P < 0.05$) el marcador iNOS en ausencia del desafío con la espora (Fig. 40).

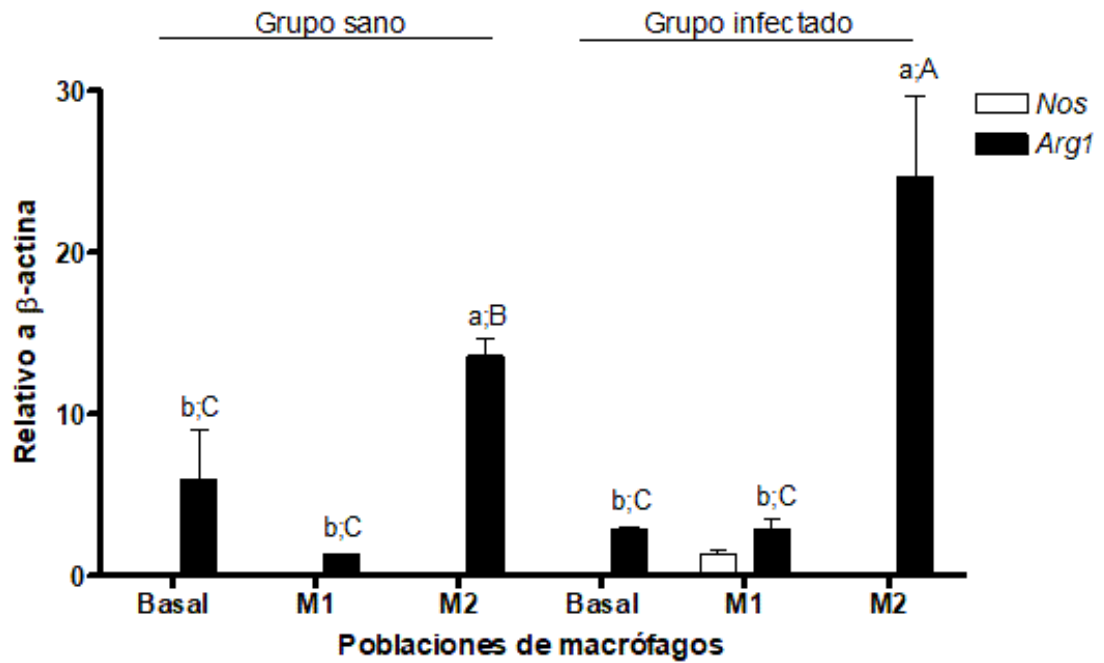


Figura 40. Expresión de iNOS y Arg-1 en macrófagos peritoneales murinos previamente polarizados a M1 o M2, así como basales en ausencia del desafío *ex vivo* con la espora, en los grupos experimentales clínicamente sano e infectado *in vivo*. Los datos se expresan en unidades de expresión relativa a β -actina como gen normalizador. Las barras de error representan la desviación estándar. Las barras que no comparten la misma literal son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$). *a-c* señalan medias para el mismo gen dentro del grupo experimental. *A-C* señalan medias para el mismo gen entre grupos.

5. DISCUSIÓN

Encephalitozoon cuniculi es un hongo intracelular estricto, esporulado, zoonótico, que causa una marcada signología nerviosa compatible con el síndrome vestibular central en diversos huéspedes mamíferos. Lo anterior es debido a que ocasiona severas lesiones granulomatosas de tipo tuberculoide en diversas zonas anatómicas del encéfalo. El granuloma microsporidiano está formado principalmente por esporas vivas y muertas en su parte central, seguido de células inflamatorias adyacentes, como linfocitos CD4⁺, CD8⁺, células B, células dendríticas, células gigantes y numerosos macrófagos (Dávila-Martínez *et al.*, 2020; Soto-Domínguez *et al.*, 2020; Soto-Domínguez *et al.*, 2022). Recientemente los macrófagos han sido considerados como células plásticas y polifuncionales, los cuales responden inmediatamente a las necesidades fisiológicas, así como a estados de perturbación de la homeostasis de los tejidos (A complex cell, 2020). El macrófago tiene la capacidad de adquirir tanto un estado de polarización proinflamatorio, también denominado célula M1, como uno antiinflamatorio y reparador, o célula M2 (Holguín-Salas, 2021). Este cambio adaptativo, continuo y dinámico ocurre en base a las necesidades que reciba de su microambiente tisular (Moghaddam *et al.*, 2017). En el caso de la infección por *E. cuniculi*, se ha reportado que los macrófagos, probablemente células M1, pueden promover la eliminación eficiente de la espora (González-Machorro *et al.*, 2019). Sin embargo, se ha visto también la presencia concomitante de la célula M2 durante la infección (Pereira *et al.*, 2019), sugiriendo la posibilidad de que este hongo pueda modular el fenotipo del macrófago. Esta polarización del macrófago representaría un estado más permisivo para la supervivencia y proliferación de *E. cuniculi* dentro del granuloma microsporidiano. El presente trabajo investigó el efecto modulador de la espora de *E. cuniculi* sobre el fenotipo de los macrófagos mediante la detección de los marcadores iNOS y Arg-1, para células M1 y M2, respectivamente. Tanto los macrófagos peritoneales de los animales clínicamente sanos como de los animales infectados *in vivo* tuvieron una respuesta similar a los desafíos *ex vivo* tanto con esporas vivas como inactivadas, independientemente del estado de activación previa con IFN- γ +LPS (M1) o IL-4 (M2).

En esta investigación se emplearon macrófagos peritoneales murinos, puesto que han sido ampliamente utilizados para este propósito, se encuentran bien caracterizados, se consideran completamente funcionales y maduros en comparación con los macrófagos derivados de la médula ósea (BMDM), de bazo, ganglios linfáticos o de sangre periférica (PBMC), y son ampliamente utilizados para el estudio de la respuesta inmune innata contra *E. cuniculi* (Zhao *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2020). Igualmente, la proporción de macrófagos peritoneales es mayor en comparación con otras técnicas de obtención de macrófagos y se requiere de menos manipulación *ex vivo* (Wang *et al.*, 2013).

El uso de esporas vivas e inactivadas por calor y formol para sensibilizar o desafiar tanto animales como células inmunes ha sido reportado previamente (Koudela *et al.*, 1999; Couzinet *et al.*, 2000). Estas presentaciones antigénicas de la espora fueron empleadas para el desafío *in vitro* de los macrófagos peritoneales, por la razón de mantener sin mayores cambios la estructura externa de la espora del microsporidio, en el caso de la inactivación por fijación, o por revelar nuevos sitios antigénicos o epítomos, en el caso de la inactivación térmica (González-Machorro *et al.*, 2019).

El fenotipo de los macrófagos peritoneales tanto del grupo sano como del infectado *in vivo* presentó una expresión basal de Arg-1 mayor que la de iNOS, un perfil característico de macrófagos M2 (Huang *et al.*, 2018). Para el grupo infectado, la predominancia de M2 fue contrario a lo esperado para una infección activa, en la cual la eficiencia en la eliminación de la espora está asociada generalmente con una actividad M1 del macrófago (Didier *et al.*, 2010; González-Machorro *et al.*, 2019). Estos resultados corroboran lo reportado por Holguín-Salas, 2021, donde la infección previa con *E. cuniculi* además promovió mayor producción de Arg-1 en macrófagos peritoneales. Esta relación M2>M1 es similar a lo observado durante las infecciones por *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania amazonensis* en ratones de la cepa BALB/c en contraste con C57BL/6, en los que primero existe un incremento balanceado en M1/M2 durante la infección aguda, seguido de la predominancia de M2 en fase crónica, posiblemente como un mecanismo de regulación de la inflamación (Medina-Buelvas *et al.*, 2021; Tomiotto-Pellissier, *et al.*, 2021). Sin embargo, esto también podría corresponder a la predisposición Th2-dominante de la cepa BALB/c (Watanabe *et al.*, 2004; Cassado *et al.*, 2015).

En respuesta a la polarización *ex vivo*, la estimulación pro-M1 (LPS+IFN- γ) indujo la expresión de iNOS en macrófagos peritoneales de animales sanos e infectados, tal como señalan otros estudios (Martin & Gordon, 2015). Sin embargo, la producción de iNOS fue relativamente baja, posiblemente debido a que los macrófagos de ratones BALB/c son menos responsivos a estímulos proinflamatorios como LPS e IFN- γ en comparación con las cepas murinas Th1 como la C57BL/6 (Soudi *et al.*, 2012). Esta falta de respuesta se ha asociado a defectos en la señalización dependiente de TLR-4, así como a una menor eficiencia de traducción de iNOS inducida por IFN- γ (Santos *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2014). Asimismo, se ha demostrado que la estimulación con LPS puede resultar en la utilización concomitante de ambas vías enzimáticas, iNOS y Arg-1, en macrófagos peritoneales murinos (Bronte *et al.*, 2003).

En macrófagos de los animales infectados *in vivo*, la respuesta a la estimulación pro-M1 resultó en niveles de expresión génica más elevados para Arg-1. Es posible que el estado crónico de la inflamación favoreciera la generación de macrófagos tolerantes a inmunógenos o citocinas presentes durante la infección (Zubair *et al.*, 2021). Igualmente, *E. cuniculi* quizá promovió una modulación a su favor, impidiendo la polarización o el *switch* fenotípico hacia macrófagos M1 (Wang *et al.*, 2014). Tal resistencia a la inflamación se ha observado en modelos de tolerancia a endotoxina por sepsis, colitis e incluso en tumores *in vivo*, donde los macrófagos tolerantes comparten características fenotípicas M2 y participan como agentes inmunosupresores (Porta *et al.*, 2009; Luzina *et al.*, 2012). El cambio de fenotipo hacia macrófagos M2 también pudo haber sido influenciado a través de la vía de activación del IRF4 (contrario al IRF5 responsivo en macrófagos M1), que depende de IFN- γ (en este caso exógeno) e IL-4 (autocrina en M2) (Oishi *et al.*, 2016; Endo *et al.*, 2021). Una vez retirados los estímulos pro-M1, la expresión de Arg-1 retornó a niveles basales en poblaciones no desafiadas, demostrando que la plasticidad del macrófago se conservó incluso después de condiciones inflamatorias, como lo reportado por Davis *et al.* (2013).

Por otro lado, la polarización hacia el fenotipo M2 mediante IL-4 promovió una mayor expresión de Arg-1 en ambos grupos experimentales, en correspondencia con lo ya descrito (Martin & Gordon, 2015). Los macrófagos M2 no desafiados del grupo infectado

in vivo expresaron el doble de los niveles de Arg-1, en comparación con el grupo control clínicamente sano al final del experimento. Un fenómeno similar fue descrito en un modelo de aterosclerosis, donde se encontró que la estimulación previa de la actividad M1 en el macrófago aumenta la expresión de marcadores para el fenotipo M2 una vez que la célula se repolariza hacia M2 (O'Brien & Spiller, 2021). Es posible que estos macrófagos hayan estado expuestos a antígenos de la espora *in vivo* en la cavidad peritoneal durante el periodo de distribución sistémica de *E. cuniculi*, desarrollando un fenotipo inicialmente M1 que eventualmente se modificó para retornar al fenotipo M2, los cuales fueron más responsivos a IL-4 (Wang *et al.*, 2014; Kotková *et al.*, 2017).

Todas las poblaciones de macrófagos (M1, M2 y M ϕ) mostraron una tendencia a hacia el fenotipo M2 luego del desafío con EV *ex vivo*. La expresión de M2 > M1 fue más notoria en el grupo infectado *in vivo*, excepto para M ϕ , donde la activación fue menos evidente y más cercana a un balance, como fue reportado por Holguín-Salas (2021). Similarmente, la generación de una respuesta tolerante tipo M2 resultó en una menor respuesta hacia el cambio de fenotipo a M1, que pudiera estar ocurriendo tras la exposición a la espora infectante de *E. cuniculi*. La generación de tolerancia o parálisis inmune está asociada a la activación de factores de transcripción tolerogénicos como IRF, ISGF3 y AP1 (Platanitis & Decker, 2018). Esto contrasta con lo observado en infecciones con el bacilo de Calmette-Guérin, donde se reportó una menor respuesta de macrófagos M1 o inmunidad entrenada (Covián *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2020).

Existen otras posibilidades que conllevan a la persistencia del fenotipo M2 (Arg-1>iNOS) durante un proceso infeccioso. Una de ellas es la inducción del marcador Arg-1 a través de TLRs, a diferencia de la activación típicamente dependiente de IL4/IL-13. Esta vía es activada por otros patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* y *Toxoplasma gondii*, en donde la expresión de Arg-1 que promueven se correlaciona positivamente con su supervivencia dentro de la célula (El Kasmi *et al.*, 2008; Guler *et al.*, 2015). En nuestro estudio, este mecanismo pudo verse a su vez potencializado en los macrófagos preprogramados a M2, por la estimulación con IL-4, incrementando la susceptibilidad de la célula a ser infectada por *E. cuniculi*, como ocurre en infecciones por *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* y *M. tuberculosis* (Mosser, 2003;

Subramanian *et al.*, 2016). Otro marcador M2 involucrado en la respuesta a *E. cuniculi* parece ser CD206, un marcador de superficie de macrófagos M2, que se ve sobreexpresado durante la infección (Pereira *et al.*, 2019; Dalboni *et al.*, 2021). La activación de CD206 está asociada a la regulación negativa de NF- κ B y la promoción de un estado antiinflamatorio, un efecto modulador que es aprovechado, por ejemplo, por *M. tuberculosis* (Rajaram *et al.*, 2014; van der Zande *et al.*, 2021). Dado que la manosa de proteínas O-glucosiladas y la quitina abundan de la pared de la espora microsporidiana y son ligandos reconocidos por CD206, es posible que represente una vía importante en la inducción del fenotipo M2 durante la infección por *E. cuniculi* (Taupin *et al.*, 2007; Azad *et al.*, 2014).

Por otro lado, los bajos niveles de iNOS observados en respuesta a la EV son consistentes con la baja producción de NO reportada durante la infección (Franzen *et al.*, 2005; Holguín-Salas, 2021). Únicamente en ausencia de la infección *in vivo*, los macrófagos M1 presentaron niveles de iNOS > Arg-1, a nivel de mRNA luego del desafío con EV. Estos resultados sugieren que un perfil M1 continuó siendo promovido durante la infección temprana en respuesta a la estimulación de PRRs, como TLR-2/4, y a la pre-sensibilización con IFN- γ y LPS (Fischer *et al.*, 2008; Lawlor *et al.*, 2010; González-Machorro *et al.*, 2019). Quizás la producción eficiente de la enzima iNOS fue comprometida a nivel postranscripcional (Kleinert *et al.*, 2010). Esto podría deberse a la interferencia directa de la espora con la expresión de iNOS, similar a lo que se ha observado en macrófagos infectados con *Leishmania major*, donde el parásito es capaz de ejercer un mecanismo de apagado del sistema de traducción de genes inducidos por IFN- γ necesarios para el control de la infección (Jaramillo *et al.*, 2011). Otra posibilidad es la inhibición a nivel traslacional del mRNA de iNOS cuando existe deprivación de la L-arginina intracelular por Arg-1, un mecanismo empleado en la atenuación de respuestas M1 (Lee *et al.*, 2003; Martí I Líndez & Reith, 2021).

Tanto en macrófagos M1 como M2 se observó la expresión concomitante de iNOS y Arg-1 en la mayoría de las células desafiadas con EV, lo cual fue interesante observar, manteniendo un perfil M2 > M1 a nivel poblacional. La co-expresión de marcadores M1 y M2 en la misma célula también fue reportada por Pereira y colaboradores, 2019, en

donde la presentación con esporas vivas resultó en la expresión simultánea de marcadores M2 (CD206 e IL-10) y M1 (TNF- α e IL-1 β), al menos durante las primeras horas de infección en ratones no sensibilizados *in vivo*. En relación con esto, nuestros resultados sugieren que, durante la primoinfección, la espora promueve una respuesta proinflamatoria por parte del macrófago, que progresivamente modula hacia M2, imposibilitando la eliminación eficiente del hongo y resultando en infecciones crónicas (Matthews *et al.*, 2010; Jarkass y Reinke, 2020). Esto explicaría por qué la relación M2 > M1 fue más evidente en el grupo infectado, similar a lo reportado en infecciones por *Leishmania* spp. y *M. tuberculosis* (Refai *et al.*, 2018; Saunders & McCoville, 2020).

Cabe mencionar que la modulación del macrófago por agentes infecciosos también depende parcialmente de los antecedentes genéticos del modelo (Sellers *et al.*, 2011). Esto se ha demostrado en infecciones por *Yersinia enterocolitica*, *M. tuberculosis*, *T. cruzii* y *L. major*, las cuales inducen la modulación hacia el fenotipo M1 en la cepa C57BL/6, pero hacia macrófagos M2, en ratones en BALB/c, asociado a mayor susceptibilidad a la infección crónica, (Tumitan *et al.*, 2008; Bertolini *et al.*, 2016; Aoki *et al.*, 2020; Medina-Buelvas *et al.*, 2021). No obstante, se ha reportado que el cambio en el fenotipo de macrófagos M1 a M2 en ratones BALB/c ocurre durante infecciones con BCG o con huevos viables de *Schistosoma japonicum* (Arkipov *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014) En este caso se atribuye a diferentes grados de compartimentalización del sistema fagocítico mononuclear o por un incremento en la estimulación de ROS, respectivamente, en el granuloma durante la estimulación con el antígeno (Yu *et al.*, 2021). Esto también pudo haber ocurrido en nuestro caso, ya que previamente se reportó la presencia de macrófagos M2 adyacentes a esporas de *E. cuniculi*, mismas que estimulan la producción de ROS (Didier *et al.*, 2010; Soto-Domínguez *et al.*, 2022).

En respuesta al desafío con la EIC, los macrófagos previamente estimulados a M1 tuvieron una repolarización a M2 en ambos grupos experimentales, aunque en comparación con la EV, existió un mayor efecto proinflamatorio a nivel génico por el incremento en la expresión de iNOS. Un resultado similar fue reportado por Holguín-Salas (2021), con el mismo desafío, sugiriendo que la inactivación del hongo permite la activación del fenotipo M1, el cual es suprimido cuando la espora se encuentra viable.

La conformación de las proteínas es un factor inmunológicamente dominante, y es factible que la desnaturalización de los antígenos de la espora, como las SWPs y otras proteínas de la pared celular limitara su inmunogenicidad en comparación con la proteína nativa (Leiro *et al.*, 2000; Ohkuri *et al.*, 2010). La inactivación también imposibilita la liberación del tubo polar y la exposición de otros sitios antigénicos de PTP1, disminuyendo aún más la estimulación de la respuesta proinflamatoria dependiente de la infección (Hayman *et al.*, 2001; Moretto *et al.*, 2010). No obstante, un leve efecto proinflamatorio que se reflejó en la expresión de iNOS en estas células pudo haber sido estimulado por nuevos epítomos lineares que generalmente no son accesibles. Si bien de esta manera la desnaturalización puede aumentar la inmunogenicidad, la respuesta inflamatoria montada contra estos epítomos puede no ser la misma que aquella contra la versión nativa del mismo antígeno (Greenfield *et al.*, 2018). Aunque reacciones cruzadas contra proteínas tanto nativas como desnaturalizadas se ha reportado en ensayos con *E. coli* y algunos virus (Paus & Winter, 2006; Wang *et al.*, 2013), es probable que este no sea el caso para *E. cuniculi*, puesto los macrófagos M1 del grupo infectado no tuvieron mejor respuesta en iNOS que aquellos del grupo sano y el fenotipo predominante fue M2. Esto coincide con lo observado para *Salmonella* serovariente Tiphya inactivada por calor, en donde se promueve un fenotipo M2 en un modelo murino (Pham *et al.*, 2020).

La repolarización a M2 de estas células también podría explicarse por el efecto inmunomodulador de la quitina (Vasconcelos *et al.*, 2013), la cual mantiene su estabilidad estructural incluso después de la exposición a altas temperaturas (Deguchi *et al.*, 2015). Se ha demostrado la quitina puede ser un agente inmunoestimulante pero también modulador hacia el fenotipo M2, cuando el macrófago fagocita partículas de >10 µm de diámetro o altas cantidades de partículas de igual o menor tamaño (Li *et al.*, 2013; Davis *et al.*, 2018). Asimismo, la administración intraperitoneal de quitina permite reclutar macrófagos peritoneales programados hacia M2 *in vivo* en ratones C57BL/6 (Foldi *et al.*, 2016).

En el caso de los macrófagos M2, el efecto fue opuesto entre el grupo sano e infectado. En el grupo sano, los niveles iNOS y Arg-1 fueron muy disminuidos o no medibles. Este fenómeno podría representar un estado de desactivación del macrófago, el cual ocurre por

la estimulación de este con IL-10 y TGF- β , ambos producidos por los macrófagos M2 (Moore *et al.*, 2001; De-Sousa *et al.*, 2019). Altos niveles de estas citocinas “desactivan” los estados funcionales de M1 y M2, resultando en una menor expresión de Arg-1, iNOS, MHC II y citocinas del tipo Th1, así como una mayor inmunosupresión (Mantovani *et al.*, 2004; Chawla, 2010). Tomando en cuenta que la polarización a M2 fue inmediata en el grupo sano, y dado que la EIC también demostró un efecto modulador hacia M2 en el resto de las poblaciones celulares, es posible que estas células fueran más susceptibles a la reprogramación a M ϕ desactivados (o M2c) producto de su propio estado funcional. Paradójicamente, en el grupo infectado *in vivo*, los macrófagos M2 desafiados con EIC presentaron una mayor expresión de Arg-1 que la obtenida en cualquiera de los tratamientos. Debido a que la única diferencia entre ambos grupos fue la previa exposición *in vivo* a la espora, es posible que la sensibilización derivara en una respuesta tolerogénica, es decir, a un fenotipo M2 más sostenible y resistente a la inactivación, tal y como ha sido reportado por otros autores (Pynaert *et al.*, 2003; Netea *et al.*, 2020). Estas células también demostraron un incremento en la expresión génica de iNOS con respecto al grupo control, probablemente debido a un efecto similar al observado en macrófagos M1 para este mismo desafío.

En cuanto al desafío con la EIF, el efecto resultó en una mayor expresión de mRNA de iNOS para los macrófagos M1; sin embargo, el fenotipo M2 fue el más predominante detectado mediante IFA. En el grupo sano, los niveles de iNOS se mantuvieron balanceados con respecto a los de Arg-1, coincidiendo con lo reportado para macrófagos basales (Holguín-Salas, 2021). Por el contrario, en el grupo infectado, este fue el único desafío que promovió una expresión génica de iNOS más elevada que la de Arg-1, correspondiente con el fenotipo M1, aunque este efecto no fue observado a nivel de proteína.

La estimulación del macrófago hacia M1 pudo ser promovida por inmunógenos conservados o generados durante la inactivación de la espora, ya que la formalinización de antígenos ha sido ampliamente utilizada en la manufactura de biológicos dado que la formación de enlaces intra e intermoleculares de metileno incrementa la estabilidad estructural en ciertas proteínas. Esto parece proteger a las proteínas de la degradación

proteolítica una vez que son internalizadas por las células fagocíticas (Metz *et al.*, 2003; Michiels *et al.*, 2020). Los macrófagos M2 muestran escasa expresión de MHC II, son menos eficientes en el procesamiento de antígenos exógenos, y tienden a degradar los péptidos excesivamente (Canton, 2014). La formalización pudo haber conservado sitios inmunogénicos o epítopos importantes que se perdieron durante la inactivación térmica, siendo las EIF mejor reconocidas que las EIC por los macrófagos sensibilizados a la espora durante la infección *in vivo*. Asimismo, se ha reportado que la fagocitosis de EIF es comparable con la de la EV, y más eficiente que la de EIC (Couzinet *et al.*, 2000; González-Machorro *et al.*, 2019), permitiendo cierta producción de iNOS. Sin embargo, similar a lo observado con la EV, el cambio de fenotipo hacia M2 de estas poblaciones que a nivel génico se comportaron como M1 parece ser resultado de la inhibición de la traducción del transcripto de iNOS vía la competencia por arginina por Arg-1, causando la discrepancia observada entre la expresión génica y la producción de la proteína de iNOS (Lee *et al.*, 2003).

6. CONCLUSIONES

Los macrófagos peritoneales de ratones de la cepa Th2-dominante BALB/c clínicamente sanos presentaron una tendencia hacia el fenotipo M2.

El periodo de infección crónica por *Encephalitozoon cuniculi* promovió el mantenimiento del fenotipo M2 en macrófagos basales y resistencia a los estímulos pro-M1.

Encephalitozoon cuniculi moduló el fenotipo de macrófagos peritoneales murinos hacia M2 independientemente del estado previo de infección *in vivo* y la activación *in vitro*. La modulación del fenotipo M2 se mantuvo incluso al desafiar a los macrófagos con esporas inactivadas tanto por calor como con formalina.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. A complex cell. 2016. Nat Immunol., 17, 1. doi: [10.1038/ni.3351](https://doi.org/10.1038/ni.3351)
2. Al-Sadi, H.I. & Al-Mahmood, S.S. 2014. Pathology of Experimental *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunocompetent and Immunosuppressed Mice in Iraq. Patholog Res Int., 2014:857036. doi: [10.1155/2014/857036](https://doi.org/10.1155/2014/857036)
3. Aoki, J.I., Muxel, S.M., Zampieri, R.A., Müller, K.E., Nerland, A.H., Floeter-Winter, L.M. 2020. Differential immune response modulation in early *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c and C57BL/6 macrophages based on transcriptome profiles. Sci Rep., 10(1):4365. doi: [10.1038/s41598-020-61225-6](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61225-6)
4. Arkhipov, S.A., Shkurupy, V.A., Akhramenko, E.S., Solomatina, M.V., Iljine, D.A. 2013. *In vitro* study of phenotypical characteristics of BCG granuloma macrophages over the course of granuloma development. Bull Exp Biol Med., 155(5):655-658. doi: [10.1007/s10517-013-2218-x](https://doi.org/10.1007/s10517-013-2218-x)
5. Atri, C., Guerfali, F., & Laouini, D. 2018. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. Int J Mol Sci., 19(6):1–15. [10.3390/ijms19061801](https://doi.org/10.3390/ijms19061801)
6. Azad, A.K., Rajaram, M.V., Schlesinger, L.S. 2014. Exploitation of the Macrophage Mannose Receptor (CD206) in Infectious Disease Diagnostics and Therapeutics. J Cytol Mol Biol., 1(1):1000003. doi: [10.13188/2325-4653.1000003](https://doi.org/10.13188/2325-4653.1000003)
7. Bando, H., Lee, Y., Sakaguchi, N., Pradipta, A., Ma, J., Tanaka, S., Cai, Y., Liu, J., Nishikawa, Y., Sasai, M., Yamamoto, M. Inducible Nitric Oxide Synthase Is a Key Host Factor for *Toxoplasma* GRA15-Dependent Disruption of the Gamma Interferon-Induced Antiparasitic Human Response. 2018. mBio, 9(5):e01738-18. doi: [10.1128/mBio.01738-18](https://doi.org/10.1128/mBio.01738-18)
8. Baneux P.J. & Pognan, F. 2003. *In utero* transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. Lab Anim., 37(2):132-138. doi: [10.1258/00236770360563778](https://doi.org/10.1258/00236770360563778)

9. Bertolini, T.B., de Souza, A.I., Gembre, A.F., Piñeros, A.R., Prado, Q., Silva, J.S., Ramalho, L.N., Bonato, V.L. 2016. Genetic background affects the expansion of macrophage subsets in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected hosts. *Immunology.*, 148(1):102-13. doi: [10.1111/imm.12591](https://doi.org/10.1111/imm.12591)
10. Bigliardi, E., Selmi, M., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M., y Sacchi, L. 1996. Microsporidian Spore Wall: Ultrastructural Findings on *Encephalitozoon hellem* Exospore. *J. Euk. Microbiol.* 43(3): 181-186. doi: [10.1111/j.1550-7408.1996.tb01388.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1996.tb01388.x)
11. Bohne, W., Böttcher, K., Gross, U. 2011. The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *Int J Med Microbiol.*, 301(5):395-9. doi: [10.1016/j.ijmm.2011.04.006](https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.006)
12. Bouzahzah, B., Nagajyothi, F., Ghosh, K., Takvorian, P.M., Cali, A., Tanowitz, H.B., Weiss, L.M. 2010. Interactions of *Encephalitozoon cuniculi* polar tube proteins. *Infect Immun.*, 78(6):2745-2753. doi: [10.1128/IAI.01205-09](https://doi.org/10.1128/IAI.01205-09)
13. Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D.M., Zanovello, P. 2003. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol.*, 24(6):302-6. doi: [10.1016/s1471-4906\(03\)00c132-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00c132-7)
14. Cali, A. & Takvorian, P.M. 2014. Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. En Weiss, L. M. y Becnel, J. J., *Microsporidia: Pathogens of Opportunity.* (pp. 71-134). Oxford, UK: Wiley Blackwell.
15. Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T. 2012. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. *BMC Biology.* 10:47. doi: [10.1186/1741-7007-10-47](https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-47)
16. Cassado, A., D'Império, M.R., Bortoluci, K.R. 2015. Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol.*, 6:225. doi: [10.3389/fimmu.2015.00225](https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00225)

17. Couzinet S, Cejas E, Schittny J, Deplazes P, Weber R, Zimmerli S. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. 2000. Infect Immun., 68(12):6939-6945. doi: [10.1128/IAI.68.12.6939-6945.2000](https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6939-6945.2000)
18. Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R. & Zimmerli, S. 2000. Phagocytic Uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by Nonprofessional Phagocytes. Infect Immun., 68(12): 6939-6945. doi: [10.1128/iai.68.12.6939-6945.2000](https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6939-6945.2000)
19. Covián, C., Fernández-Fierro, A., Retamal-Díaz, A., Díaz, F., Vasquez, A., Lay, M., Riedel, C., González, P., Bueno, S., Kalergis, A. 2019. BCG-induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design. Front Immunol., 10:2806. doi: [10.3389/fimmu.2019.02806](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02806)
20. Da Silva, C.A., Chalouni, C., Williams, A., Hartl, D., Lee, C.G., Elias, J.A. 2009. Chitin is a size-dependent regulator of macrophage TNF and IL-10 production. J Immunol., 182(6):3573-82. doi: [10.4049/jimmunol.0802113](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802113)
21. Dalboni, L., Alvares-Saraiva, A., Konno, F., Perez, E., Codeceira, J., Spadacci-Morena, D., Lallo, M. 2021. *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. PLoS One, 5;16(3):e0247658. doi: [10.1371/journal.pone.0247658](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247658)
22. Dávila-Martínez, C., Castillo-Velázquez, U., Soto-Domínguez, A., Nevárez-Garza, A.M., Arce-Mendoza, A.Y., Hernández-Vidal, G., Zamora-Avila, D.E., Rodríguez-Tovar, L.E. 2020. Immunohistochemical localization of TNF- α and IL-4 in granulomas of immunocompetent and immunosuppressed New Zealand white rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi*. Cytokine, 130:155055. doi: [10.1016/j.cyto.2020.155055](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155055)
23. Davis, M. J., Tsang, T. M., Qiu, Y., Dayrit, J. K., Freij, J. B., Huffnagle, G. B., & Olszewski, M. A. 2013. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. MBio, 4(3), e00264-13. doi: [10.1128/mBio.00264-13](https://doi.org/10.1128/mBio.00264-13)

24. DeGroot, M.A., Vivesvara, G., Wilson, M.L., Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., DaSilva, A.J., Leitch, G.J., Bryan, R.T., Reeves, R. 1995. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J Infect Dis*, 171(5):1375-8. doi: [10.1093/infdis/171.5.1375](https://doi.org/10.1093/infdis/171.5.1375)
25. DeSousa, J., DaCosta, P., Simoes, J. 2019. Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *Infect Drug Resist.*, 12: 2589–2611. doi: [10.2147/IDR.S208576](https://doi.org/10.2147/IDR.S208576)
26. Didier, E.S. 2014. Mammalian Animal Models of Human Microsporidiosis. En Weiss, L. M. y Becnel, J. J., *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. (pp. 327-339). Oxford, UK: Wiley Blackwell.
27. Didier, E.S., Bowers, L.C., Martin, A.D., Kuroda, M.J., Khan, I.A., Didier, P.J. 2010. Reactive nitrogen and oxygen species, and iron sequestration contribute to macrophage-mediated control of *Encephalitozoon cuniculi* (Phylum Microsporidia) infection *in vitro* and *in vivo*. *Microbes Infect*, 12(14-15):1244-1251. doi: [10.1016/j.micinf.2010.09.010](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.010)
28. El Kasmi, K.C., Qualls, J.E., Pesce, J.T., Smith, A.M., Thompson, R.W., Henao-Tamayo, M., Basaraba, R.J., König, T., Schleicher, U., Koo, M.S., Kaplan, G., Fitzgerald, K.A., Tuomanen, E.I., Orme, I.M., Kanneganti, T.D., Bogdan, C., Wynn, T.A., Murray, P.J. 2008. Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol.*, 9(12):1399-406. doi: [10.1038/ni.1671](https://doi.org/10.1038/ni.1671)
29. Fasshauer, V., Gross, U., y Bohne, W. 2005. The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukariot Cell.*, 4(1):221-224. doi: [10.1128/EC.4.1.221-224.2005](https://doi.org/10.1128/EC.4.1.221-224.2005)
30. Fischer, J., Suire, C., Hale-Donze, H. 2008. Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF-kappaB

- and subsequent inflammatory responses. *Infect Immun.*, 76(10):4737-44. doi: [10.1128/IAI.00733-08](https://doi.org/10.1128/IAI.00733-08)
31. Fischer, J., Tran, D., Janeau, R., y Hale-Donze, H. 2008. Kinetics of *Encephalitozoon* spp. Infection of Human Macrophages. *J. Parasitol.* 94(1): 169-175. doi: [10.1645/GE-1303.1](https://doi.org/10.1645/GE-1303.1)
 32. Fischer, J., West, J., Agochukwu, N., Suire, C., Hale-Donze, H. 2007. Induction of host chemotactic response by *Encephalitozoon* spp. *Infect Immun*, 75(4):1619-1625. doi: [10.1128/IAI.01535-06](https://doi.org/10.1128/IAI.01535-06)
 33. Foldi, J., Shang, Y., Zhao, B., Ivashkiv, L., Hu, X. 2016. RBP-J is required for M2 macrophage polarization in response to chitin and mediates expression of a subset of M2 genes. *Protein Cell*, 7(3):201-209. doi: [10.1007/s13238-016-0248-7](https://doi.org/10.1007/s13238-016-0248-7)
 34. Franzen, C. 2005. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol.*, 52(1-2):36-40. doi: [10.14411/fp.2005.005](https://doi.org/10.14411/fp.2005.005)
 35. Franzen, C., Müller, A., Hartmann, P., Salzberger, B. 2004. Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology*, 130:285-292. doi: [10.1017/s003118200400633x](https://doi.org/10.1017/s003118200400633x)
 36. Gannon, J. 1980. A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. 14(2):91-94. doi: [10.1258/002367780780942917](https://doi.org/10.1258/002367780780942917)
 37. González-Machorro, J.R., Rodríguez-Tovar, L.E., Gómez-Flores, R., Soto-Domínguez, A., García-García, A., Tamez-Guerra, P., Castillo-Velázquez, U. 2019. Increased phagocytosis and growth inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* by LPS-activated J774A.1 murine macrophages. *Parasitology Research*, 118(6): 1841-1848. doi: [10.1007/s00436-019-06310-0](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06310-0)
 38. Greenfield, E.A., DeCaprio, J., Brahmandam, M. 2018. Making Weak Antigens Strong: Modifying Protein Antigens by Denaturation. *Cold Spring Harb Protoc.*, 2018(5). doi: [10.1101/pdb.prot099960](https://doi.org/10.1101/pdb.prot099960)

39. Guler, R., Parihar, S.P., Savvi, S., Logan, E., Schwegmann, A., Roy, S., Nieuwenhuizen, N.E., Ozturk, M., Schmeier, S., Suzuki, H., Brombacher, F. 2015. IL-4R α -dependent alternative activation of macrophages is not decisive for *Mycobacterium tuberculosis* pathology and bacterial burden in mice. PLoS One, 10(3):e0121070. doi: [10.1371/journal.pone.0121070](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121070)
40. Hacker, C., Howell, M., Bhella, D., Lucocq, J. 2014. Strategies for maximizing ATP supply in the microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*: direct binding of mitochondria to the parasitophorous vacuole and clustering of the mitochondrial porin VDAC. Cell Microbiol. 16(4), 565-579. doi: [10.1111/cmi.12240](https://doi.org/10.1111/cmi.12240)
41. Han, B., Moretto, M., Weiss, L.M. 2018. *Encephalitozoon*: Tissue Culture, Cryopreservation, and Murine Infection. Curr Protoc Microbiol., 52(1):e72. doi: [10.1002/cpmc.72](https://doi.org/10.1002/cpmc.72)
42. Han, B., Pan, G., Weiss, L.M. 2021. Microsporidiosis in Humans. Clin. Microbiol. Rev., 34(4):e0001020. doi: [10.1128/CMR.00010-20](https://doi.org/10.1128/CMR.00010-20)
43. Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., Tanowitz, H., Pan, G., Delbac, F., Zhou, Z., Weiss, L. 2017. The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. PLoS Pathog. 13(4): e1006341. doi: [10.1371/journal.ppat.1006341](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006341)
44. Han, B., Takvorian, P., Weiss, L. 2020. Invasion of Host Cell by Microsporidia. Front. Immunol. 11:172. doi: [10.3389/fmicb.2020.00172](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00172)
45. Hernández-Rodríguez, O.X., Alvarez-Torres, O., Uribe-Urbe, N.O. 2012. Microsporidia Infection in a Mexican Kidney Transplant Recipient. Case Rep Nephrol., 2012:928083. doi: [10.1155/2012/928083](https://doi.org/10.1155/2012/928083)
46. Holguín-Salas, A. 2021. Determinación del efecto de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* sobre el fenotipo del macrófago en respuesta a la infección. (Maestría en Ciencia Animal). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.

47. Huang, X., Li, Y., Fu, M., Xin, H. 2018. Polarizing macrophages *in vitro*. En Rousset, G., Macrophages: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1784. (pp. 119-126). Springer Nature.
48. Huang, Z., Luo, Q., Guo, Y., Chen, J., Xiong, G., Peng, Y., Ye, J., Li, J. 2015. *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Polarization of Human Macrophage Orchestrates the Formation and Development of Tuberculous Granulomas *In Vitro*. PLoS One, 10(6):e0129744. doi: [10.1371/journal.pone.0129744](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129744)
49. Italiani, P. & Boraschi, D. 2014. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs Functional Differentiation. Frontiers in Immunology, 5:514. doi: [10.3389/fimmu.2014.00514](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514)
50. Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J.D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., Guerau-de-Arellano, M. 2015. Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages. PLoS ONE 10(12) e0145342. doi: [10.1371/journal.pone.0145342](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342)
51. Jaramillo, M., Gomez, M.A., Larsson, O., Shio, M.T., Topisirovic, I., Contreras, I., Luxenburg, R., Rosenfeld, A., Colina, R., McMaster, R.W., Olivier, M., Costa-Mattioli, M., Sonenberg, N. 2011. Leishmania repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. Cell Host Microbe., 9(4):331-41. doi: [10.1016/j.chom.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.008)
52. Jaroenlak, P., Cammer, M., Davydov, A., Sall, J., Usmani, M., Liang, F.X., Ekiert, D.C., Bhabha, G. 2020. 3-Dimensional organization and dynamics of the microsporidian polar tube invasion machinery. PLoS Pathog., 16(9): e1008738. doi: [10.1371/journal.ppat.1008738](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008738)
53. Jeklová, E., Leva, L., Matiasovic, J., Ondrackova, P., Kummer, V., Faldyna, M. 2020. Characterization of humoral and cell-mediated immunity in rabbits orally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. Vet Res., 15;51(1):79. doi: [10.1186/s13567-020-00806-9](https://doi.org/10.1186/s13567-020-00806-9)

54. Khan, I.A. & Didier, E.S. 2004. Insights into the immune responses to microsporidia. En Lindsay, D.S. y Weiss, L.M., World Class Parasites: Volume 9, Opportunistic Infections: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia. Boston, E.U.A.: Kluwer Academic Publishers.
55. Kleinert, H., Pautz, A., Linker, K., Schwarz, P.M. 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. Eur J Pharmacol. 500(1-3):255-66. doi: [10.1016/j.ejphar.2004.07.030](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.030)
56. Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Kvetonová, D., Kvác, M. 2018. Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model. Experimental Parasitology, 193: 51-57. doi: [10.1016/j.exppara.2018.09.001](https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.001)
57. Koudela, B., Kucerová, S., Hudcovic, T. 1999. Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. Folia parasitologica, 46(3), 171–174. PMID: 10553650.
58. Künzel, F. & Joachim, A. 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. Parasitol Res., 106:299-309. doi: [10.1007/s00436-009-1679-3](https://doi.org/10.1007/s00436-009-1679-3)
59. Latney, L.V., Bradley, C.W., Wyre, N.R. 2014. *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits: diagnosis and optimal management. Vet Med, 5:169-180. doi: [10.2147/VMRR.S49842](https://doi.org/10.2147/VMRR.S49842)
60. Lawlor, E.M., Moretto, M.M., Khan, I.A. 2010. Optimal CD8 T-cell response against *Encephalitozoon cuniculi* is mediated by Toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. Infect Immun., 78(7):3097-102. doi: [10.1128/IAI.00181-10](https://doi.org/10.1128/IAI.00181-10)
61. Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R. 1923. Etiology of epizootic rabbit encephalitis in reports with experimental studies of encephalitis lethargica, *Encephalitozoon cuniculi* (nov spec). Ann Inst Pasteur, 38: 675-711. doi: [10.1016/j.micinf.2010.09.010](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.09.010)

62. Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M., Chen, D., Nordquist, R.E., Chen, W.R. Chitin, chitosan, and glycosylated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clin Dev Immunol.*, 2013:387023. doi: [10.1155/2013/387023](https://doi.org/10.1155/2013/387023)
63. Liu, Y., Liang, S., Ding, R., Hou, Y., Deng, F., Ma, X., Song, T., Yan, D. 2020. BCG-induced trained immunity in macrophage: reprogramming of glucose metabolism. *Int Rev Immunol.*, 39(3):83-96. doi: [10.1080/08830185.2020.1712379](https://doi.org/10.1080/08830185.2020.1712379)
64. Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A., Shea-Donohue, T., Atamas, S.P. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives." *J Leukoc Biol.*, 92(4):753-64. doi: [10.1189/jlb.0412214](https://doi.org/10.1189/jlb.0412214)
65. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 25(12):677-86. doi: [10.1016/j.it.2004.09.015](https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.015)
66. Martí I Líndez, A., Reith, W. (2021). Arginine-dependent immune responses. *CMLS*, 78(13), 5303–5324. doi: [10.1007/s00018-021-03828-4](https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4)
67. Martinez, F.O. & Gordon, S. 2014. The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment. *F1000Prime Reports*, 6:13. doi: [10.12703/2FP6-13](https://doi.org/10.12703/2FP6-13)
68. Matthews, A., Horard, A., Hale-Donze, H. 2005. Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes and Infection*, 11:905-911. doi: [10.1016/j.micinf.2009.06.004](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.06.004)
69. Mattila, J.T., Ojo, O.O., Kepka-Lenhart, D., Marino, S., Kim, J.H., Eum, S.Y., Barry, C.E., Klein, E., Kirschner, D.E., Morris, S.M., Lin, P.L., Flynn, J.L. 2013. Microenvironments in Tuberculous Granulomas are Delineated by Distinct Populations of Macrophage Subsets and Expression of Nitric Oxide Synthase and Arginase Isoforms. *Journal of Immunology*, 191(2): 773-784. doi: [10.4049/jimmunol.1300113](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300113)

70. Medina-Buelvas, D.M., Rodríguez-Sosa, M., Vega, L. 2021. Characterisation of Macrophage Polarisation in Mice Infected with Ninoa Strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathogens*, 10(11):1444. doi: [10.3390/pathogens10111444](https://doi.org/10.3390/pathogens10111444)
71. Michiels, T., Schöneich, C., Hamzink, M., Meiring, H., Kersten, G., Jiskoot, W., Metz, B. 2020. Novel Formaldehyde-Induced Modifications of Lysine Residue Pairs in Peptides and Proteins: Identification and Relevance to Vaccine Development. *Mol Pharm.*, 17(11):4375-4385. doi: [10.1021/acs.molpharmaceut.0c00851](https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00851)
72. Mills, C.D. 2012. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 32(06):463-488. doi: [10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10](https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v32.i6.10)
73. Moore, K.W., de Waal, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.*, 19:683-765. doi: [10.1146/annurev.immunol.19.1.683](https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.683)
74. Mosser DM. 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.*, 73(2):209-12. doi: [10.1189/jlb.0602325](https://doi.org/10.1189/jlb.0602325)
75. Muraille, E., Leo, O., Moser, M. 2014. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol.*, 26;5:603. doi: [10.3389/fimmu.2014.00603](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603)
76. Oh, C.K., Geba, G.P., Molfino, N. 2010. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. *Eur Respir Rev.*, 19(115):46-54. doi: [10.1183/09059180.00007609](https://doi.org/10.1183/09059180.00007609)
77. Ohkuri, T., Nagatomo, S., Oda, K., So, T., Imoto, T., Ueda, T. 2010. A protein's conformational stability is an immunologically dominant factor: evidence that free-energy barriers for protein unfolding limit the immunogenicity of foreign proteins. *J Immunol.*, 185(7):4199-205. doi: [10.4049/jimmunol.0902249](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902249)

78. Oishi, S., Takano, R., Tamura, S., Tani, S., Iwaizumi, M., Hamaya, Y., Takagaki, K., Nagata, T., Seto, S., Horii, T., Osawa, S., Furuta, T., Miyajima, H., Sugimoto, K. 2016. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology*, 149: 320-328. doi: [10.1111/imm.12647](https://doi.org/10.1111/imm.12647)
79. Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., Mortara, L. 2018. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res.*, 14;2018:8917804. doi: [10.1155/2018/8917804](https://doi.org/10.1155/2018/8917804)
80. Paus, D., Winter, G. 2006. Mapping epitopes and antigenicity by site-directed masking. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(24):9172-7. doi: [10.1073/pnas.0600263103](https://doi.org/10.1073/pnas.0600263103)
81. Pereira, A., Alvares-Saraiva, A., De-Camargo, F., Spadacci-Morena, D., Perez, E., Mariano, M., Lallo, M. 2019. B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13(9):e0007674. doi: [10.1371/journal.pntd.0007674](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007674)
82. Pham, T., Brewer, S., Thurston, T., Massis, L., Honeycutt, J., Lugo, K., Jacobson, A., Vilches-Moure, J., Hamblin, M., Helaine, S., Monack, D. 2020. *Salmonella*-Driven Polarization of Granuloma Macrophages Antagonizes TNF-Mediated Pathogen Restriction during Persistent Infection. *Cell Host Microbe*, 27(1):54-67.e5. doi: [10.1016/j.chom.2019.11.011](https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.11.011)
83. Platanitis, E., Decker, T. 2018. Regulatory Networks Involving STATs, IRFs, and NFκB in Inflammation. *Front Immunol.*, 9:2542. doi: [10.3389/fimmu.2018.02542](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02542)
84. Pombert, J., Xu, J., Smith, D., Heiman, D., Young, S., Cuomo, C., Weiss, L., Keeling, P. 2013. Complete Genome Sequences from Three Genetically Distinct Strains Reveal High Intraspecies Genetic Diversity in the Microsporidian

- Encephalitozoon cuniculi*. Eukaryot. Cell. 12(4): 503-511. doi: [10.1128/EC.00312-12](https://doi.org/10.1128/EC.00312-12)
85. Porta, C., Rimoldi, M., Sica, A. 2009. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor $\kappa\beta$. PNAS, 106(35):14978–14983. doi: [10.1073/pnas.0809784106](https://doi.org/10.1073/pnas.0809784106)
86. Rajaram, M.V., Ni, B., Dodd, C.E., Schlesinger, L.S. 2014. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. Semin Immunol., 26(6):471-85. doi: [10.1016/j.smim.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.010)
87. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M. 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. Front Immunol., 5:532. doi: [10.3389/fimmu.2014.00532](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532)
88. Refai, A., Gritli, S., Barbouche, M., Essafi, M. 2018. *Mycobacterium tuberculosis* Virulent Factor ESAT-6 Drives Macrophage Differentiation Toward the Pro-inflammatory M1 Phenotype and Subsequently Switches It to the Anti-inflammatory M2 Phenotype. Front Cell Infect Microbiol., 8:327. doi: [10.3389/fcimb.2018.00327](https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00327)
89. Rex, J., Albrecht, U., Ehling, C., Thomas, M., Zanger, U., Sawodny, O., Häussinger, D., Ederer, M., Feuer, R., Bode, J. 2016. Model-Based Characterization of Inflammatory Gene Expression Patterns of Activated Macrophages. PLoS Comput Biol., 27;12(7):e1005018. doi: [10.1371/journal.pcbi.1005018](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005018)
90. Rodriguez, P., Ochoa, A., Al-Khami, A. 2017. Arginine Metabolism in Myeloid Cells Shapes Innate and Adaptive Immunity. Front. Immunol. 8:93. doi: [10.3389/fimmu.2017.00093](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00093)
91. Rodríguez-Tovar, L. E., Nevárez-Garza, A. M., Trejo-Chávez, A., Hernández-Martínez, C. A., Hernández-Vidal, G., Zárate-Ramos, J. J., Castillo-Velázquez, U. 2016. *Encephalitozoon cuniculi*: Grading the Histological Lesions in Brain,

- Kidney and Liver during Primoinfection Outbreak in Rabbits. *J Pathog.*, 2016:5768428. doi: [10.1155/2016/5768428](https://doi.org/10.1155/2016/5768428)
92. Rönnebauer, K., Gross, U., Bohne, W. 2008. The Nascent Parasitophorous Vacuole Membrane of *Encephalitozoon cuniculi* Is Formed by Host Cell Lipids and Contains Pores Which Allow Nutrient Uptake. *Eukariot Cell.*, 7(6): 1001-1008. doi: [10.1128/EC.00004-08](https://doi.org/10.1128/EC.00004-08)
 93. Röszer, T. 2015. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015:816460. doi: [10.1155/2015/816460](https://doi.org/10.1155/2015/816460)
 94. Saunders, E., McConville, M. 2020. Immunometabolism of *Leishmania* granulomas. *Immunol Cell Biol.*, 98:832-844. doi: [10.1111/imcb.12394](https://doi.org/10.1111/imcb.12394)
 95. Seeley, J., Ghosh, S. 2017. Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.*, 101(1):107-119. doi: [10.1189/jlb.3MR0316-118RR](https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0316-118RR)
 96. Sellers, R.S., Clifford, C.B., Treuting, P.M., Brayton, C. 2012. Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice. *Vet Pathol.*, 49(1):32-43. doi: [10.1177/0300985811429314](https://doi.org/10.1177/0300985811429314)
 97. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J., Sahebkar, A. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.*, 233(9):6425-6440. doi: [10.1002/jcp.26429](https://doi.org/10.1002/jcp.26429)
 98. Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaili, S.A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., Sahebkar, A. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.*, 233(9):6425-6440. doi: [10.1002/jcp.26429](https://doi.org/10.1002/jcp.26429)
 99. Soto-Domínguez, A., González-Castillo, J.A., Castillo-Velázquez, U., Rodríguez-Tovar, L.E., Méndez-Zamora, G., Zamora-Avila, D.E., Nevárez-Garza, A.M. 2022. Distribution of M1 and M2 macrophages in cerebral granulomas caused by

- Encephalitozoon cuniculi*. Vet Immunol Immunopathol., 252:110481. doi: [10.1016/j.vetimm.2022.110481](https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2022.110481)
100. Sprague, V. & Vernick, S.H. 1971. The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia, Nosematidae) and its taxonomic significance. J Protozool., 18(4): 560-569. doi: [10.1111/j.1550-7408.1971.tb03376.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1971.tb03376.x)
 101. Subramanian, K., Landero, J.A., Porollo, A., Divanovic, S., Caruso, J.A., Deepe, G.S. 2016. IL-4 Induces Metallothionein 3- and SLC30A4-Dependent Increase in Intracellular Zn(2+) that Promotes Pathogen Persistence in Macrophages. Cell Reports, 16(12):3232–3246. Doi: [10.1016/j.celrep.2016.08.057](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.057)
 102. Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M., Silva, T., da Silva-Bortoleti, B., Gonçalves, M., Concato, V., Rodrigues, A., Detoni, M., Costa, I., Panis, C., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., Pavanelli, W. 2021. Murine susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection is influenced by arginase-1 and macrophages at the lesion site. Front. Cell. Infect. Microbiol., 11:687633. doi: [10.3389/fcimb.2021.687633](https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.687633)
 103. Tumitan, A.R., Monnazzi, L.G., Ghiraldi, F.R., Cilli, E.M., Machado, B.M. 2007. Pattern of macrophage activation in *Yersinia*-resistant and *Yersinia*-susceptible strains of mice. Microbiol Immunol., 51(10):1021-8. doi: [10.1111/j.1348-0421.2007.tb03986.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2007.tb03986.x)
 104. van der Zande, H., Nitsche, D., Schlautmann, L., Guigas, B., Burgdorf, S. 2021. The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of (Meta)Inflammation. Front Immunol., 12:765034. doi: [10.3389/fimmu.2021.765034](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.765034)
 105. Vasconcelos, D., Fonseca, A., Costa, M., Amaral, I., Barbosa, M., Águas, A., Barbosa, J. 2013. Macrophage polarization following chitosan implantation. Biomaterials, 34(38): 9952-9959. doi: [10.1016/j.biomaterials.2013.09.012](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.012)

106. Vávra, J. & Larsson, J. I. 2014. Structure of Microsporidia. En Weiss, L. M. y Becnel, J. J., *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. (pp. 1-70). Oxford, UK: Wiley Blackwell.
107. Wang, J., Barker, K., Steel, J., Park, J., Saul, J., Festa, F., Wallstrom, G., Yu, X., Bian, X., Anderson, K.S., Figueroa, J.D., LaBaer, J., Qiu, J. 2013. A versatile protein microarray platform enabling antibody profiling against denatured proteins. *Proteomics Clin Appl.*, 7(5-6):378-83. doi: [10.1002/prca.201200062](https://doi.org/10.1002/prca.201200062)
108. Wang, N., Liang, H., Zen, K. 2014. Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol.*, 5:614. doi: [10.3389/fimmu.2014.00614](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00614)
109. Weiser, J. 1964. On the Taxonomic Position of the Genus *Encephalitozoon* Levaditi, Nicolau y Schoen, 1923 (Protozoa: Microsporidia). *Parasitology*, 54: 749-751. doi: [10.1017/S0031182000082755](https://doi.org/10.1017/S0031182000082755)
110. Williams, B., Cali, A., Takvorian, P., Keeling, P. 2008. Distinct Localization Patterns of Two Putative Mitochondrial Proteins in the Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*. *J. Eukariot. Microbiol.* 55(2): 131-133. doi: [10.1111/j.1550-7408.2008.00315.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00315.x)
111. Wright, J. H. & Craighead, E. M. 1922. Infectious Motor Paralysis in Young Rabbits. *J. Exp. Med.*, 36:135-140. doi: [10.1084/jem.36.1.135](https://doi.org/10.1084/jem.36.1.135)
112. Xiang, H., Zhang, R., De Koeyer, D., Pan, G., Li, T., Liu, T., Zhou, Z. 2019. New evidence on the relationship between Microsporidia and Fungi: a genome-wide analysis by DarkHorse software. *Can J M Microbiol.*, 60(9): 557-568. doi: [10.1139/cjm-2014-0209](https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0209)
113. Xu. Y. & Weiss, L.M. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialized invasion organelle. *Int J Parasitol.*, 35:941-953. [10.1016%2Fj.ijpara.2005.04.003](https://doi.org/10.1016%2Fj.ijpara.2005.04.003)

114. Yang, Z. & Ming, X. 2014. Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders. *Front Immunol.*, 5:533. doi: [10.3389/fimmu.2014.00533](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533)
115. Yu, Y., Wang, J., Wang, X., Gu, P., Lei, Z., Tang, R., Wei, C., Xu, L., Wang, C., Chen, Y., Pu, Y., Qi, X., Yu, B., Chen, X., Zhu, J., Li, Y., Zhang, Z., Zhou, S., Su, C. 2021. *PLoS Negl Trop Dis.*, 15(8):e0009696. doi: [10.1371/journal.pntd.0009696](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009696)
116. Zhu, J., Xu, Z., Chen, X., Zhang, W., Chi, Y., Li, W., Song, X., Liu, F., Su, C. 2014. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasit Vectors*, 25(7):122. doi: [10.1186/1756-3305-7-122](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-122)
117. Zhu, W., Li, J., Pappoe, F., Shen, J., Yu, L. 2019. Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to Survive in the Host. *Front. Microbiol.*, 10:899. doi: [10.3389/fmicb.2019.00899](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00899)
118. Zubair, K., You, C., Kwon, G., Kang, K. 2021. Two Faces of Macrophages: Training and Tolerance. *Biomedicines*, 9(11):1596. doi: [10.3390/biomedicines9111596](https://doi.org/10.3390/biomedicines9111596)

APÉNDICE

A. TÉCNICAS Y MÉTODOS

A.1. Inmunocitofluorescencia indirecta en microcámara de 8 pozos

1. Remover medio de cultivo de cada pozo.
2. Realizar 2 lavados con PBS.
3. Agregar 300 μ l de metanol absoluto y fijar las células por 20 minutos a 4°C.
4. Desechar el fijador y realizar 2 lavados con PBST por 5 minutos cada uno.
5. Depositar 200 μ l de suero de caballo al 10% en PBST e incubar por 1 hora a TA.
6. Retirar el suero (sin enjuagar), agregar el anticuerpo primario a la dilución seleccionada e incubar durante toda la noche a 4°C.

Nota: El volumen mínimo necesario para cubrir la superficie del pozo es de 200 μ l.

7. Remover el anticuerpo primario y realizar 2 lavados con PBST de 5 minutos cada uno.
8. Agregar anticuerpo secundario e incubar por 2 h a TA y en oscuridad.
9. Retirar anticuerpo secundario y realizar 2 lavados con PBS de 5 minutos cada uno, protegiendo de la luz.
10. Desmontar la microcámara del portaobjetos y agregar una gota de medio de montaje con DAPI sobre cada una de las divisiones.
11. Colocar un cubreobjetos.
12. Mantener a 4°C o -20°C hasta su observación.
13. Visualizar el marcaje en un microscopio de epifluorescencia.

A.2. Tinción de Calcoflúor White M2R en orina y heces

1. Preparar frotis de orina y heces utilizando un asa bacteriológica, en proximidad de un mechero de Bunsen.
2. Fijar los frotis por calor.
3. Fijar en metanol absoluto por 5 minutos.
4. Dejar secar por 3 – 5 minutos.
5. Colocar laminillas dentro de una cámara húmeda.

Nota: Realizar el resto de la técnica en oscuridad.

6. Añadir el fluorocromo sobre toda la extensión del frotis.
7. Teñir por 5 minutos a TA.
8. Enjuagar con agua destilada.
9. Colocar 1 gota de resina sintética y montar con un cubreobjetos.
10. Observar en microscopio de epifluorescencia a una longitud de onda de 395 – 415 nm con el objetivo 100X (usar aceite de inmersión).

A.3. Propagación de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en cultivo celular Vero

Cultivo de células Vero:

1. Descongelar criovial y temperar a 37°C.
2. Sembrar células en cajas de cultivo de 25 cm².
3. Mantener en RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y 1% antibiótico-antimicótico, a 37°C en una incubadora con 5% CO₂.
4. Realizar subcultivos por raspado o tripsinización (tripsina 0.25%-EDTA).

Establecimiento de cultivo infectado:

5. Utilizar cultivos con confluencia del 80 – 90%.
6. Infectar con 6 x 10⁶ esporas diluidas en RPMI temperado.
7. Incubar a las condiciones especificadas en el paso 4.
8. Recolectar el sobrenadante cada 3 días y almacenarlo a 4°C.
9. Realizar subcultivo de células infectadas una vez que la confluencia alcance el 95%.

Cosecha de esporas:

10. Raspar cultivos una vez que el índice de infección sea del 90 – 100%.
11. Recolectar el contenido en tubo de centrifuga.
12. Centrifugar a 200 xg por 10 minutos a 4°C.
13. Decantar sobrenadante y resuspender pellet en 1 ml de RPMI.
14. Realizar 3 pasajes por aguja de 27G.
15. Depositar el lisado celular en un tubo de microcentrifuga de 1 ml.
16. Centrifugar a 1500 xg por 30 minutos a 4°C.
17. Desechar sobrenadante.
18. Resuspender pellet en 1 ml de PBS.
19. Almacenar a 4°C hasta su uso.

A.4. Inactivación de esporas

Esporas inactivadas por calor:

1. Colocar la dilución de esporas requerida en un tubo de microcentrífuga de 1 ml.
2. Incubar el tubo a 90°C por 30 minutos en un bloque térmico.
3. Dejar enfriar.
1. Centrifugar a 1500 xg por 30 min a 4°C.
4. Resuspender en 1 ml de RPMI.
5. Almacenar a 4°C.

Esporas inactivadas con formalina:

2. Centrifugar el tubo de microcentrífuga con esporas en PBS a 1500 xg por 10 minutos a 4°C.
3. Descartar sobrenadante.
4. Agregar 1 ml de NBF 10% y homogeneizar.
5. Fijar por 30 minutos a TA.
6. Centrifugar a 1500 xg por 30 min a 4°C.
7. Retirar el sobrenadante y agregar 1 ml de PBS.
8. Repetir los pasos 5 y 6 hasta completar 3 lavados.
9. Resuspender en RPMI y almacenar a 4°C.

A.5. Establecimiento de cultivo primario de macrófagos de cavidad peritoneal

1. Inyectar por vía peritoneal 1 ml de RPMI frío (4°C).
2. Incubar por 20 minutos.
3. Anestesiarse al ratón.
4. Aplicar la eutanasia por dislocación cervical.
5. Rocíar al animal con etanol al 70% y secar.
6. Posicionar al ratón sobre una placa de poliestireno cerca de un mechero de Bunsen.
7. Diseccionar la piel del abdomen y exponer la cavidad sin escindir el peritoneo.
8. Utilizar un catéter del 24G para depositar 5 ml de RPMI frío dentro de la cavidad.
9. Masajear la cavidad peritoneal suavemente.
10. Extraer el medio de cultivo con una jeringa.
11. Depositar el contenido en un tubo de centrifuga de 50 ml y mantenerlo frío.
12. Repetir el lavado de cavidad peritoneal con 5 ml más de RPMI nuevo.
13. Tomar 10 µl de la solución de células y agregar 10 µl de azul tripano.
14. Realizar el recuento de células en una cámara de Neubauer.
15. Centrifugar la solución de células y resuspender en RPMI nuevo.
1. Nota: Ajustar el volumen de la suspensión de acuerdo con la concentración necesaria para el cultivo.
16. Sembrar las células en microcámaras o microplacas.
17. Incubar durante 24 horas.
18. Descartar células no adherentes mediante un lavado con PBS temperado.
19. Colocar medio de cultivo nuevo e incubar.

A.6. Extracción de RNA total a partir de cultivo celular

1. Retirar medio de cultivo.
2. Lavar con PBS y retirar la mayor cantidad de líquido posible.
3. Agregar 1 ml de TRIzol e incubar por 5 minutos a TA agitando levemente la placa de cultivo.
4. Recolectar el lisado celular en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
5. Homogeneizar por pipeteo.

Separación de fases:

6. Agregar 200 μ l de cloroformo frío por cada 1 ml de TRIzol.
7. Agitar vigorosamente (o utilizar vórtex) por 15 segundos.
8. Incubar por 5 – 15 minutos a TA.
9. Centrifugar a 12000 xg por 15 minutos a 4°C.

Precipitación:

10. Transferir la fase acuosa a un tubo de microcentrífuga nuevo.
11. Agregar 500 μ l de isopropanol frío.
12. Mezclar por inversión.
13. Incubar por 5 – 10 minutos a TA.
14. Centrifugar a 12000 xg por 10 minutos a 4°C.

Lavado:

15. Decantar sobrenadante.
16. Agregar 1 ml de etanol al 75% y mezclar en vórtex.
17. Centrifugar a 7500 xg por 5 minutos a 4°C.
18. Decantar sobrenadante.
19. Repetir el lavado 2 veces más.
20. Retirar sobrenadante con micropipeta.

Disolución:

21. Secar pellet al aire libre o en bloque térmico a 37°C por 15 – 20 minutos.
22. Resuspender en 30 µl de agua libre de nucleasas.
23. Incubar a 60°C por 10 – 15 minutos.
24. Pasar a hielo.

Cuantificación:

25. Realizar la lectura de absorbancia en espectrofotómetro a 260 nm.