

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA



“Inmunolocalización de marcadores celulares en encéfalo de conejos Nueva Zelanda infectados experimentalmente con *Encephalitozoon cuniculi*”

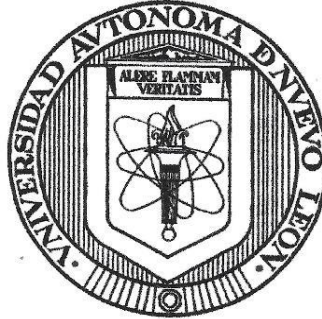
POR

MVZ. DANIEL JONÁS HERNÁNDEZ BARRERA

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

Junio, 2023

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“INMUNOLocalización de marcadores celulares en encéfalo de  
Conejos Nueva Zelanda infectados experimentalmente con  
*Encephalitozoon cuniculi*”

Aprobación de tesis por el comité particular de

*Daniel Jonás Hernández Barrera*

**DIRECCIÓN DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar  
Director

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Alicia Nevárez Garza  
Co-Director

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Adolfo Soto Domínguez  
Director Externo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Uziel Castillo Velázquez  
Co-Director

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Gerardo Méndez Zamora  
Co-Directo

General Escobedo, Nuevo León, a 8 Junio de 2023

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, Facultad de Medicina, UANL.

**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**

Dedico este trabajo con mucho amor a mi familia, a mis padres por todo su gran apoyo, a ti abuelito Chanito (en paz descansa) no te pude llevar a donde platicamos por última vez ni despedirme, pero nos veremos en la eternidad.

Con mucho amor y cariño a mis abuelitas Socorrito, Gloria, a toda mi familia de Hidalgo (ya pronto nos veremos), les ofrezco una disculpa a todos por todo el tiempo que estuve ausente en momentos importantes a toda la familia.

Te amo mucho Jade.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi asesor principal el Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar por transmitirme la pasión y gusto a la investigación, de igual forma a la Dra. Alicia Nevárez Garza.

A mis profesores/co-directores Dr. Uziel, Dr. Gerardo, Dr. Adolfo de quienes admiro su entrega y dedicación a la ciencia y porque este trabajo es un reflejo de cada uno de ellos, gracias por su disposición.

Al personal técnico y administrativo de las instituciones en donde se me brindó la oportunidad de trabajar y desarrollar este proyecto.

Agradezco a los hermanos con granulomas que me dejó este posgrado Argelia, Jenny y Kevin (ya tenía antes de entrar).

Muchas gracias, Jenny y Argelia me ayudaron a resolver muchas dudas, fueron mi guía y también hicimos un gran equipo.

A CONACYT por la beca para la realización de mis estudios de maestría.

Gracias Chaparrita, por enseñarme a ver el mundo de diferente manera.

“Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía.

Para terminar un gran proyecto,  
hace falta perseverancia”

## ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| Resumen.....  | 14     |
| Abstract.....   | 16     |
| Resumen gráfico.....  | 18     |
| 1. Introducción.....  | 19     |
| 1.1. Justificación.....   | 20     |
| 1.2. Hipótesis.....   | 20     |
| 1.3. Objetivo General.....  | 20     |
| 1.4. Objetivos específicos.....   | 20     |
| 2. Literatura revisada.....   | 23     |
| 2.1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....  | 23     |
| 2.1.1. Signología y lesiones causadas en encéfalo por <i>Encephalitozoon cuniculi</i> ..... | 23     |
| 2.1.2. Ciclo de vida y desarrollo de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en conejos.....        | 24     |
| 2.2. Características morfológicas de los granulomas.....                                    | 26     |
| 2.2.1. Granuloma nodular, tuberculoide o tipo Th1.....                                      | 26     |
| 2.2.2. Granuloma difuso, lepromatoso tipo Th2.....  | 28     |
| 2.2.3. Granuloma microsporidiano.....   | 28     |
| 2.3. Anatomía macroscópica del encéfalo.....  | 28     |
| 2.3.1. Cerebro.....   | 28     |
| 2.3.2. Telencéfalo.....   | 28     |
| 2.3.3. Diencefalo.....  | 29     |
| 2.3.4. Mesencefalo.....   | 28     |
| 2.3.5. Metencefalo.....   | 28     |
| 2.3.6. Mielencefalo.....  | 28     |
| 2.3.7. Sistema ventricular.....   | 28     |
| 2.3.8. Anatomía microscópica del encéfalo.....  | 32     |
| 2.4. Técnicas para la identificación de microsporidios.....                                 | 34     |
| 2.4.1. Azul de Tricromo Modificado.....   | 34     |
| 2.4.2. Tinción Calcoflúor White.....  | 34     |

|  |    |
|--|----|
| 2.5. Histoquímica para analizar la integridad del tejido nervioso.....               | 34 |
| 2.5.1. Tinción Tricrómico de Massón.....   | 34 |
| 2.5.2. Tinción Pentacrómico de Movat.....  | 35 |
| 2.5.3. Tinción Klüver-Barrera.....   | 35 |
| 2.5.4. Tinción de Nissl.....   | 35 |
| 2.6. Inmunohistoquímica.....   | 36 |
| 2.6.1. Inmunohistoquímica para la detección de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> ..... | 36 |
| 2.6.2. Marcador celular para GFAP.....   | 36 |
| 2.6.3. Marcador celular para TLR2.....   | 37 |
| 2.6.4. Marcador celular para TLR4.....   | 38 |
| 2.6.5. Marcador celular para CD11c.....  | 38 |
| 2.6.6. Marcador celular para CD20.....   | 39 |
| 2.6.7. Marcador celular para CD56.....   | 40 |
| 3. Materiales y Métodos.....   | 42 |
| 3.1.1. Animales de experimentación.....  | 42 |
| 3.1.2. Mantenimiento y alojamiento.....  | 42 |
| 3.1.3. Diseño experimental.....  | 42 |
| 3.1.4. Preparación del inóculo.....  | 44 |
| 3.1.5. Tranquilización, anestesia y sacrificio.....                                  | 44 |
| 3.1.6. Extracción de sangre.....   | 44 |
| 3.1.7. Necropsia y extracción del encéfalo.....                                      | 45 |
| 3.1.8. Muestras de heces y orina.....  | 45 |
| 3.1.9. Muestras cerebrales.....  | 46 |
| 3.2.1. Secciones sagitales.....  | 46 |
| 3.2.2. Secciones coronales.....  | 46 |
| 3.2.3. Hematoxilina y eosina para la observación de los granulomas.....              | 46 |
| 3.2.4. Observación de granulomas en encéfalo.....                                    | 49 |
| 3.2.5. Áreas muestreadas del encéfalo para la detección de los granulomas.....       | 53 |
| 3.2.6. Conteo de granulomas.....   | 54 |
| 3.3. Inmunohistoquímica para la detección de receptores y poblaciones celulares..... | 54 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.3.1. Conteo de células positivas para los marcadores celulares..... | 55  |
| 3.3.2. Análisis estadísticos.....                                     | 56  |
| 4. Resultados.....  | 57  |
| 4.1.1. Detección de los granulomas y lesiones adyacentes.....         | 57  |
| 4.1.2. Corteza cerebral.....  | 60  |
| 4.1.3. Hipocampo.....   | 63  |
| 4.1.4. Cuerpo estriado.....   | 66  |
| 4.1.5. Mesencéfalo.....   | 68  |
| 4.1.6. Cerebelo.....  | 71  |
| 4.1.7. Protuberancia.....   | 73  |
| 4.2. Distribución de los granulomas en encéfalo de conejos.....       | 76  |
| 4.3. Histoquímica.....  | 78  |
| 4.3.1. Tinción de Nissl.....  | 79  |
| 4.3.2. Tinción de Klüver-Barrera.....                                 | 81  |
| 4.3.3. Tinción con Tricrómico de Massón.....                          | 83  |
| 4.3.4. Tinción de Pentacrómico de Movat.....                          | 85  |
| 4.4. Inmunohistoquímica.....  | 88  |
| 4.4.1. Detección de <i>Encephalitzoon cuniculi</i> .....              | 88  |
| 4.4.2. Detección de GFAP.....   | 89  |
| 4.4.3. Detección de TRL2.....   | 93  |
| 4.4.4. Detección de TLR4.....   | 97  |
| 4.4.5. Detección de células dendríticas CD11c positivas.....          | 100 |
| 4.4.6. Detección de células B CD20 positivas.....                     | 103 |
| 4.4.7. Detección de células NK CD56 positivas.....                    | 106 |
| 5. Discusión.....   | 109 |
| 6. Conclusiones.....  | 125 |
| 7. Bibliografías.....   | 126 |
| Apéndice.....   | 139 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Ciclo de vida de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> .....  | 23     |
| Figura 2. Vista dorsal del cerebro de conejo Nueva Zelanda.....   | 30     |
| Figura 3. Vista ventral de cerebro de conejo Nueva Zelanda.....   | 31     |
| Figura 4. División del hemisferio izquierdo del encéfalo de conejo.....   | 47     |
| Figura 5. División del hemisferio derecho del encéfalo de conejo.....   | 48     |
| Figura 6. Seccionamiento de hemisferios.....  | 50     |
| Figura 7. Secciones sagitales del hemisferio izquierdo.....   | 51     |
| Figura 8. Secciones coronales del hemisferio derecho.....   | 52     |
| Figura 9. Representación gráfica de la vista sagital del encéfalo de conejo.....  | 53     |
| Figura 10. Cambios histopatológicos en los grupos experimentales.....   | 59     |
| Figura 11. Corteza cerebral, sección coronal 2.....   | 61     |
| Figura 12. Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de granulomas en la sección coronal 2..... | 62     |
| Figura 13. Hipocampo, sección coronal 4.....  | 64     |
| Figura 14. Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de granulomas en la sección coronal 4..... | 65     |
| Figura 15. Núcleos basales, sección coronal 4.....  | 67     |
| Figura 16. Mesencéfalo, sección coronal 6.....  | 69     |
| Figura 17. Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de granulomas en la sección coronal 6..... | 70     |
| Figura 18. Cerebelo, sección coronal 8.....   | 72     |
| Figura 19. Protuberancia, sección coronal 8.....  | 74     |
| Figura 20. Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de granulomas en la sección coronal 8..... | 75     |
| Figura 21. Modelo en tercera dimensión de la distribución de granulomas cerebrales.....   | 77     |
| Figura 22. Corteza cerebral. Tinción de Nissl.....  | 80     |
| Figura 23. Corteza cerebral. Tinción Klüver-Barrera.....  | 82     |
| Figura 24. Corteza cerebral. Tricrómico de Massón.....  | 84     |
| Figura 25. Corteza cerebral. Pentacrómico de Movat.....   | 86     |
| Figura 26. Corteza cerebral. Pentacrómico de Movat.....   | 87     |

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Figura 27. | Detección de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> mediante inmunohistoquímica.....                                       | 88  |
| Figura 28. | Detección de GFAP en encéfalo.....  | 91  |
| Figura 29. | Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de células GFAP positivas.....  | 92  |
| Figura 30. | Detección de TLR2 en encéfalo.....  | 95  |
| Figura 31. | Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de células TLR2 positivas.....  | 96  |
| Figura 32. | Detección de TLR4 en encéfalo.....  | 98  |
| Figura 33. | Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de células TLR4 positivas.....  | 99  |
| Figura 34. | Detección de CD11c en encéfalo.....   | 101 |
| Figura 35. | Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de células CD11c positivas..... | 102 |
| Figura 36. | Detección de CD20 en encéfalo.....  | 104 |
| Figura 37. | Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de células CD20 positivas.....  | 105 |
| Figura 38. | Detección de CD56 en encéfalo.....  | 107 |
| Figura 39. | Comparación entre los grupos experimentales para el análisis estadístico del conteo de células CD56 positivas.....  | 108 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   | Página |
|---|--------|
| Tabla 1. Diseño experimental.....                             | 43     |
| Tabla 2. Cambios histopatológicos en regiones cerebrales..... | 58     |

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

|                    |  |
|--------------------|--|
| Ac                 | Anticuerpo                                     |
| Ag                 | Antígeno                                       |
| BHE                | Barrera hematoencefálica                       |
| CPA                | Célula presentadora de antígeno                |
| CD                 | Célula dendrítica                              |
| CGMs               | Células gigantes multinucleadas                |
| CD4+               | Linfocito T cooperador (Célula T CD4+)         |
| CD8+               | Linfocito T citotóxico (Célula T CD8+)         |
| <i>E. cuniculi</i> | <i>Encephalitozoon cuniculi</i>                |
| GFAP               | Proteína ácida fibrilar glial                  |
| HE                 | Tinción de hematoxilina y eosina               |
| IHQ                | Inmunohistoquímica                             |
| IFN- $\gamma$      | Interferón gamma                               |
| MHC-I              | Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I   |
| MTB                | <i>Mycobacterium tuberculosis</i>              |
| NF- $\kappa\beta$  | Factor de transcripción nuclear kappa beta     |
| L&M                | Porcentaje de linfocitos y monocitos           |
| LCR                | Líquido cefalorraquídeo                        |
| K-B                | Tinción Klüver-Barrera                         |
| TNF- $\alpha$      | Factor de necrosis tumoral alfa                |
| MHC-II             | Complejo mayor de histocompatibilidad clase II |
| NO                 | Óxido nítrico                                  |
| PAMP               | Patrón molecular asociado a patógeno           |

|      |  |
|------|--|
| PFA  | Paraformaldehído   |
| PBS  | Fosfato bufferado salino                                   |
| SNC  | Sistema nervioso central                                   |
| SSF  | Solución salina fisiológica                                |
| SD   | Desviación estándar  |
| TLR2 | Receptor tipo Toll 2                                       |
| TLR4 | Receptor tipo Toll 4                                       |
| TA   | Temperatura ambiente                                       |
| TRS  | Solución recuperadora de antígenos                         |
| TBST | Solución salina tamponada con tris adicionada con Tween 20 |
| TB   | Tuberculosis   |

## RESUMEN

**Introducción.** *Encephalitozoon cuniculi* es un hongo intracelular obligado perteneciente al Filo Microspora, es un patógeno emergente y de distribución cosmopolita cuyo hospedero definitivo es el conejo (*Oryctolagus cuniculus*). La encephalitozoonosis se caracteriza por lesiones granulomatosas severas en sistema nervioso central que resultan en signos similares a síndrome vestibular central en conejos. El granuloma es un acumulo de macrófagos y células inmunes que intenta aislar al patógeno y eliminarlo. **Objetivo.** El propósito de este estudio fue describir la distribución de las lesiones granulomatosas en SNC en distintos tiempos de infección experimental, analizadas mediante técnicas de histoquímica el daño cortical y la composición del granuloma e identificar la participación de distintos tipos de células inmunes en el granuloma y receptores celulares asociados. **Material y métodos.** Cuatro grupos experimentales de conejos Nueva Zelanda: A) grupo control, B, C y D infectados por 15, 30 y 45 días con *Encephalitozoon cuniculi*, respectivamente. La distribución de las lesiones en SNC se evaluó mediante el seccionamiento en cortes coronales del hemisferio derecho y el análisis histoquímico se evaluó en cortes sagitales del hemisferio izquierdo en corteza cerebral. También, para investigar la participación de diferentes tipos de células inmunes se evaluaron las lesiones mediante inmunohistoquímica en cortes sagitales del hemisferio izquierdo. **Resultados.** La distribución de los granulomas en el grupo B es diseminada en regiones derivadas del prosencéfalo e incluso encontramos *E. cuniculi* libre en barrera hematoencefálica (BHE). A los 30 días de infección la distribución de los granulomas es diseminada en el sistema nervioso central y el cerebelo se encuentra gravemente afectado. A los 45 días no se granulomas en ninguna sección analizada. Las técnicas histoquímicas permitieron descartar la presencia de un granuloma encapsulado y participación de otros componentes de tejido conectivo. Para la evaluación de células neuronales la técnica de Nissl permitió identificar que se presenta pérdida neuronal en este proceso infeccioso crónico. También una desorganización se observó del neurópilo en los grupos infectados y desmielinización de la sustancia blanca en la región frontal de la corteza cerebral de los grupos B y C. Describimos la respuesta de inmunidad innata y adaptativa durante la formación de granulomas en distintos tiempos de infección experimental fue descrita. Este estudio

forma una base para futuras investigaciones en neuroinflamación y enfermedades infecciosas del tejido nervioso, como en la encefalitozoonosis.

**Conclusión.** El presente estudio demostró por primera vez la distribución de los granulomas cerebrales, y aunque la distribución sea diseminada en el parénquima cerebral los animales no presentaron signos clínicos. Respecto a los marcadores celulares en la infección experimental, se observó el punto medio entre la inmunidad innata y adaptativa en los encéfalos de los animales del grupo C, ya que los granulomas presentaron células dendríticas en la periferia y centro del granuloma, células B principalmente en la periferia, y células NK diseminadas en el granuloma o parénquima adyacente. Además, el proceso inflamatorio crónico persiste por la alta expresión de GFAP en astrocitos y la persistencia de la expresión de TLR4 en neuronas de los animales del grupo D.

**Palabras clave:** *Encephalitozoon cuniculi*, encéfalo, granuloma, histoquímica, inmunohistoquímica.

## ABSTRACT

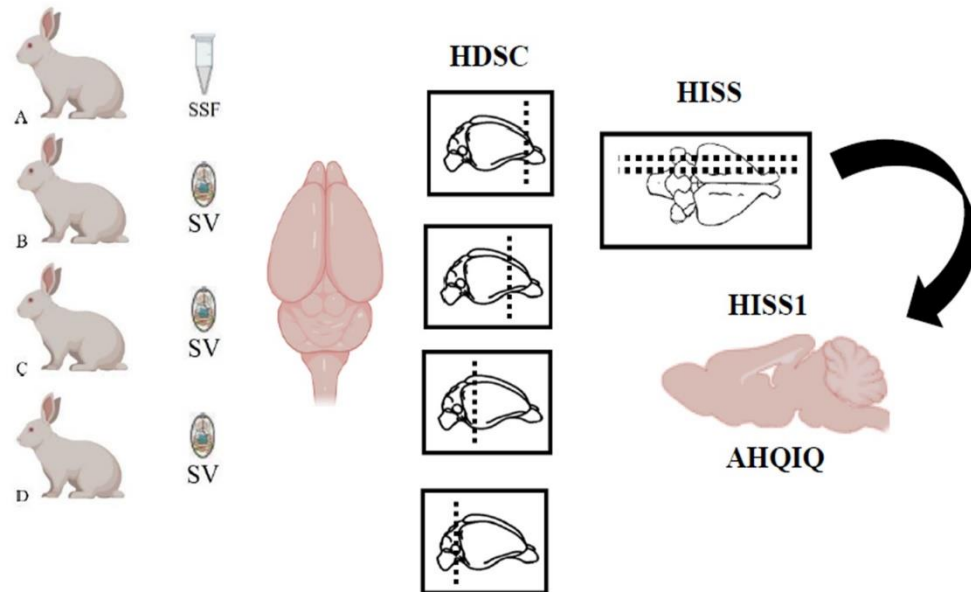
**Introduction.** Encephalitozoon cuniculi is an obligate intracellular fungus belonging to the phylum Microspora. It is an emerging pathogen of cosmopolitan distribution whose definitive host is the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Encephalitozoonosis is characterized by severe granulomatous lesions in the central nervous system (CNS) resulting in signs like central vestibular syndrome in rabbits with clinical presentation. A granuloma is an accumulation of macrophages and immune cells with the objective of isolating and eliminating the pathogen. **Objective.** The purpose of this study is to describe the distribution of granulomatous lesions in the CNS at different times of experimental infection, to analyze by histochemical techniques the cortical damage and the composition of the granuloma and to identify the participation of different types of immune cells in the granuloma and associated cell receptors. **Material and methods.** Four experimental groups of New Zealand rabbits were used: A) healthy rabbits negative to infection, B) infected for 15 days, C) infected for 30 days, and D) infected for 45 days with *E. cuniculi*. The distribution of lesions in CNS was evaluated by sectioning in coronal sections of the right hemisphere and histochemical analysis was evaluated in sagittal sections of the left hemisphere in cerebral cortex, to investigate the participation of different types of immune cells, lesions were evaluated by immunohistochemistry in sagittal sections of the left hemisphere. **Results.** We found that the distribution of granulomas in group B is disseminated in the regions derived from the prosencephalon and even *E. cuniculi* is found free in the blood brain barrier. At 30 days of infection the distribution of granulomas is disseminated in the regions derived from the prosencephalon, midbrain, and hindbrain. At 45 days, no granulomas were found and interestingly, the animals showed no neurological clinical signs. Histochemical techniques allowed ruling out the presence of an encapsulated granuloma and the involvement of other connective tissue components. For the qualitative evaluation of neuronal cells, the Nissl technique allowed us to identify the presence of neuronal loss in this chronic infectious process. We also observed demyelination, mainly in white matter in group C and D. Finally, it was possible to identify immune cells as in other granulomatous infections such as tuberculosis, by immunohistochemistry. **Conclusion.** The present study demonstrates for the first time by stereological methods the distribution of granulomas in the brain in order to see if the







cause of the presentation of the signs are granulomas, which is not the case and could be due to another pathological mechanism such as protein misfolding. Regarding the cellular markers in the experimental infection we observed the midpoint between innate and adaptive immunity in group C since the granulomas present dendritic cells in the periphery and center of the granulomas, B cells mainly in the periphery, and NK cells disseminated in the granuloma or adjacent parenchyma, in addition, the chronic inflammatory process continues high of GFAP in astrocytes of group D animal.

**Key words.** *Encephalitozoon cuniculi*, encephalon, granuloma, histochemistry, immunohistochemistry, TLR's.

## RESUMEN GRÁFICO



| A-D   | Grupos experimentales                     |  | Encéfalo                                    |
|---|---|--|---|
|  | Espora viable (SV)                        | <b>HDSC</b>  | Hemisferio derecho<br>secciones coronales   |
|  | Solución salina fisiológica (SSF)         | <b>HISS</b>  | Hemisferio izquierdo<br>secciones sagitales |
| <b>AHQIQ</b>  | Análisis histológico e inmunohistoquímico |  | Sección sagital 1                           |

## 1. INTRODUCCIÓN

*Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) pertenece al filo Microsporidia, clase Microsporea y orden Microsporidia. Es un patógeno intracelular obligado, esporulado, emergente, zoonótico, y oportunista. El conejo (*Oryctolagus cuniculus*) es su huésped natural; sin embargo, todos los mamíferos pueden infectarse e incluso los seres humanos (Santaniello *et al.*, 2021). La infección causada por *E. cuniculi* se conoce por el término encefalitozoonosis, la cual puede ser mortal, especialmente en hospederos inmunodeprimidos (Magalhães *et al.*, 2022). En el conejo se observa comúnmente en el SNC, en donde se genera una inflamación crónica granulomatosa tanto en el parénquima nervioso como en las meninges. Los signos neurológicos que se presentan debido a esas lesiones son tortícolis, ataxia, paresia, rodamiento longitudinal, nistagmo y convulsiones.

Los granulomas cerebrales se caracterizan por ser microscópicos, formados por un infiltrado de células mononucleares, como macrófagos, linfocitos, células de la glía, células plasmáticas y un centro necrótico. El propósito del granuloma es limitar el crecimiento o diseminación del agente causal (Ehlers *et al.*, 2013). Las lesiones granulomatosas han sido clasificadas, descritas y evaluadas ampliamente (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016; Leipzig *et al.*, 2013). Sin embargo, aún falta por determinar el fenotipo de varias poblaciones celulares inmunes que participan activamente dentro y fuera del granuloma microsporidiano. Se han identificado células CD4+, CD8+, moléculas MHCII, macrófagos M1 y M2 se han identificado en los granulomas conejos infectados naturalmente mediante inmunohistoquímica (Soto-Domínguez, *et al.*, 2020; 2022). En el presente trabajo se observó la distribución de los granulomas en SNC de conejos infectados con experimentalmente con distintos tiempos de infección con *E. cuniculi*. Cabe destacar que la distribución de los granulomas en encéfalo a los 30 días de infección se presenta en todas las regiones analizadas del SNC. Es interesante mencionar que el granuloma causado por *E. cuniculi* en el encéfalo no presenta una cápsula fibrosa. Por último, mediante inmunohistoquímica se observó la participación de células B, células dendríticas, células NK, como componentes celulares importantes del granuloma microsporidiano, además de astrogliosis en la región frontal y la identificación de células TLR-2 y TLR-4 positivas, quizá participando como mediadores en la identificación de PAMP's de *E. cuniculi*.

### **1.1. Justificación**

El estudio de la distribución anatómica de los granulomas en encéfalo permitirá comprender la presentación de la signología nerviosa en la Encefalitozoonosis en el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), como también la expresión de los receptores en respuesta a la interacción contra la espora de *Encephalitozoon cuniculi* y la determinación de cambios morfológicos tisulares permitirá identificar el microambiente celular involucrado durante la infección en un modelo de conejo infectado experimentalmente.

### **1.2. Hipótesis**

La espora de *Encephalitozoon cuniculi* promueve una respuesta inmune asociada a procesos inflamatorios en encéfalo.

### **1.3. Objetivo general**

Identificar poblaciones celulares y receptores asociados que participan en el ambiente inmunológico externo e interno del granuloma microsporidiano en encéfalo.

### **1.4. Objetivos específicos**

- Desarrollar el modelo de infección experimental con *Encephalitozoon cuniculi* en conejos Nueva Zelanda.
- Identificar la distribución de las lesiones causadas por *Encephalitozoon cuniculi* en encéfalo de conejos Nueva Zelanda.
- Analizar la interacción entre los tipos celulares del microambiente externo e interno del granuloma y la espora de *Encephalitozoon cuniculi*.

## 2. LITERATURA REVISADA

### 2.1. *Encephalitozoon cuniculi*

#### 2.1.1. Signología y lesiones en encéfalo causadas por *Encephalitozoon cuniculi*.

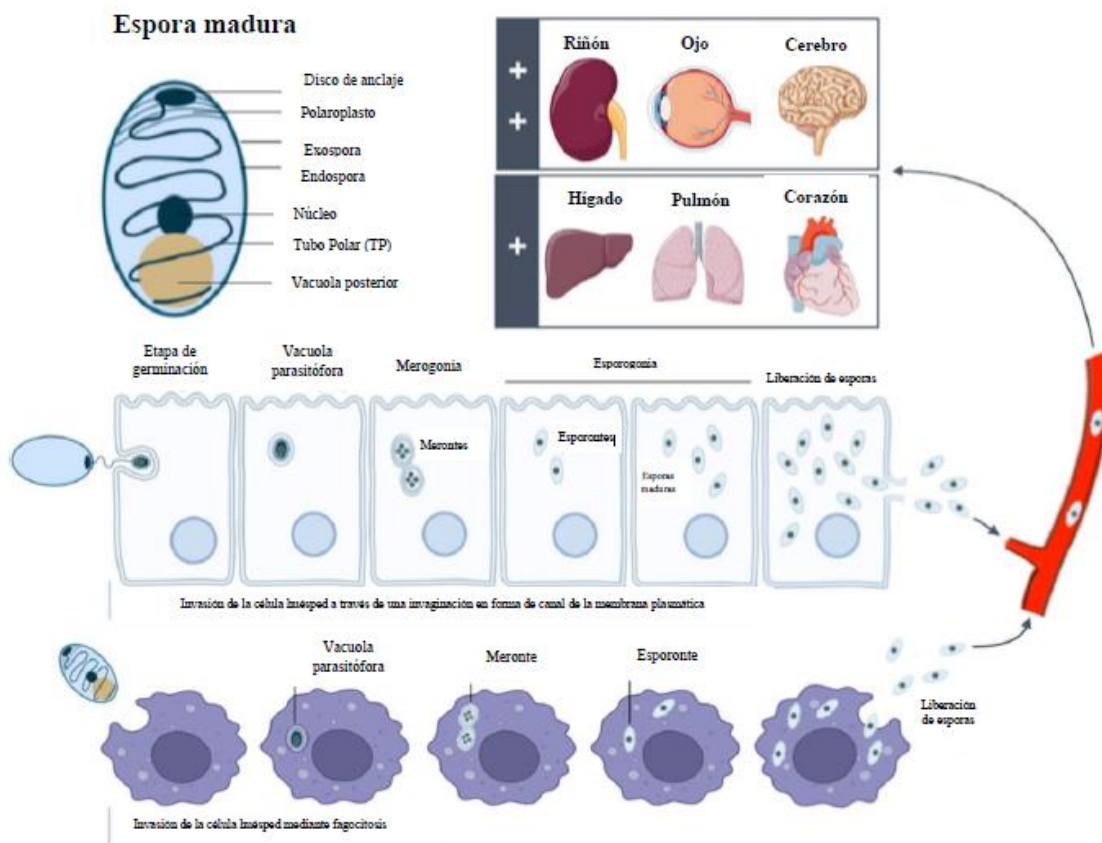
La enfermedad neurológica clínica es un sello distintivo en esta patología y las presentaciones neurológicas incluyen enfermedad vestibular central, ataxia, cambios en el comportamiento, nistagmos, y convulsiones. La infección suele ser crónica y latente en animales inmunocompetentes que desarrollan un estado de portador asintomático (Künzel & Joachim., 2010; V. Latney *et al.*, 2014).

*Encephalitozoon cuniculi* presenta un especial tropismo por el sistema nervioso y riñón, generando una severa meningoencefalitis granulomatosa y una nefritis intersticial crónica con fibrosis, respectivamente (Kotklová *et al.*, 2018; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). Histológicamente se observa una infiltración de células mononucleares, como macrófagos, células epitelioides, histiocitos y células gigantes multinucleadas, linfocitos y otras células efectoras, cuyo fenotipo se puede inclinar hacia una respuesta tipo Th1 o Th2 en los granulomas de conejos inmunocompetentes e inmunosuprimidos (Soto-Domínguez *et al.*, 2020). En conejos infectados naturalmente, las lesiones se distribuyen en la corteza cerebral, tallo cerebral y médula oblongada, y con menos frecuencia en cerebelo y médula espinal (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2017; Maestrini *et al.*, 2017). Las lesiones leves presentan una congestión vascular, edema perivascular y perineural, y discretos manguitos perivasculares linfocíticos. La reacción puede consistir en pequeños y poco definidos agregados de linfocitos y astrogliosis temprana, pero si la severidad evoluciona, se observa una encefalitis no supurativa, aumentando la infiltración linfocítica perivascular, focos de reacción glial, astrocitosis, astrogliosis, algunas células plasmáticas. La encefalomielitis granulomatosa no supurativa severa involucra abundantes focos de reacción glial con centro necrótico, severo infiltrado linfocítico perivascular e infiltrado leptomeníngeo, sateliosis, hemorragia, necrosis neuronal y malacia. Asimismo, quistes parasitarios se pueden observar al centro o adyacentes al granuloma, aunque pueden encontrarse también sin la presencia de lesiones inflamatorias (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016).

### **2.1.2. Ciclo de vida y desarrollo de *Encephalitozoon cuniculi* en conejos**

El ciclo biológico se divide en tres fases: 1) fase infectiva o ambiental, 2) fase proliferativa intracelular o merogonia, y 3) fase de esporogonia. El ciclo biológico es directo con transmisión tanto horizontal como vertical (transplacentaria). Puede infectar a un amplio espectro de mamíferos como roedores, carnívoros, herbívoros, aves, reptiles, e incluso el hombre (Didier *et al.*, 2014; Doshi *et al.*, 2019). La ingesta accidental o inhalación de la espora representan las vías de transmisión más frecuentes (Kotková *et al.*, 2018) y los órganos principalmente afectados incluyen aquellos con flujo sanguíneo elevado como pulmones, hígado, riñones y tejido nervioso (Figura 1).

Los merontes (fase proliferativa) se diferencian en esporontes, y más tarde en esporas maduras, lo que da como resultado el desarrollo del filamento polar y de la pared celular de las esporas. Todos estos cambios ocurren dentro de la vacuola parasitófora en la célula huésped, la cual se rompe, resultando en la liberación de esporas. Esta ruptura celular se asocia con una respuesta inflamatoria e infecciones subclínicas crónicas (Künzel & Fisher *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi*: desde la invasión de la célula huésped a la diseminación sistémica. (Modificado de: Magalhães T. 2022. A multidisciplinary review about *Encephalitozoon cuniculi* in a One Health perspective).

## **2.2. Características morfológicas de los granulomas**

El granuloma es un complejo mecanismo de defensa del huésped que se define como un conjunto organizado de células inflamatorias donde predominan las células del sistema fagocítico mononuclear, que se diferencian a macrófagos maduros, macrófagos epitelioides, células espumosas o células gigantes multinucleadas (Ehlers *et al.*, 2012). Es un proceso crónico que tiene como fin aislar, eliminar o evitar la diseminación de un antígeno. Es un proceso gradual caracterizado por una serie de activaciones y transformaciones de macrófagos que van reclutando células adicionales como neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos y poblaciones de linfocitos que incluyen células T, células B, células NK y células no hematopoyéticas como fibroblastos, células endoteliales y epiteliales (Cronan *et al.*, 2022). La respuesta granulomatosa contra patógenos intracelulares involucra la actividad de la inmunidad celular, activación de células endoteliales, participación de moléculas de adhesión, secreción de citocinas y quimiocinas, localización de linfocitos, macrófagos y efectores microbicidas mediados por macrófagos. Un número limitado de macrófagos tisulares se involucran en la respuesta inflamatoria crónica inicial, mientras que la mayor parte del granuloma se compone de fagocitos transportados por la sangre que se extravasan de la circulación y convergen alrededor del foco inflamatorio. La agregación celular es facilitada por la matriz extracelular depositada compuesta por fibronectina, vitronectina, osteopontina, colágeno, elastina que proporcionan la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular. El microambiente celular compacto dentro del granuloma es necesario para la emisión y recepción de señales transmitidas a corta distancia o de membrana a membrana. Esta disposición compacta es la que ayuda a aislar a patógenos y evitar la diseminación. Pero cuando no se logra la eliminación total del antígeno, ocasiona una latencia a largo plazo, y en ausencia de otras manifestaciones de la enfermedad, la respuesta granulomatosa exitosa temprana podría terminar efectivamente con la invasión (Boros *et al.*, 2003).

### **2.2.1. Granuloma nodular, tuberculoide o tipo Th1**



El granuloma prototipo de esta clasificación es el causado por *M. tuberculosis*, aunque también se ha descrito en infecciones por *Coccidioides* spp., *Nocardia* spp. Macroscópicamente, estos granulomas son de color blanco a grisáceo, firmes a sólidos, pudiendo presentar un centro necrótico caseoso o mineralizado.

El macrófago comprende la mayor parte de la población celular del granuloma y forman las capas internas del granuloma, sirviendo como andamio central para las otras poblaciones celulares. Los macrófagos experimentan diferenciaciones morfológicas denominado como “diferenciación epitelioides” que se caracterizan entremezclándose, y a estos macrófagos se les unen otras poblaciones de macrófagos como macrófagos convencionales, macrófagos espumosos cargados de lípidos y células gigantes multinucleadas (CGM) (Remakrishnan, 2012; Ackermann, 2017). En este tipo de granuloma además del macrófago se reclutan muchos tipos de células como neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, poblaciones de linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, fibroblastos, etc. Este granuloma presenta tres zonas bien definidas: la más interna (puede estar el agente infeccioso), macrófagos espumosos y CGMs, puede existir un centro necrótico; la zona intermedia conformada por macrófagos, células epitelioides y CGMs; y, por último, la zona más externa que consiste en linfocitos B y T, células dendríticas, células plasmáticas, y una cápsula fibrosa que delimita la lesión (Ackermann, 2017). Los linfocitos T CD4+ como CD8+ se localizan dentro del granuloma, al igual que células polimorfonucleares con gránulos eosinofílicos y con el tiempo el granuloma aumenta el número de linfocitos, pero hay un predominio de macrófagos (Turner *et al.*, 2003).

### **2.2.2. Granuloma difuso, lepromatoso tipo Th2**

*Mycobacterium leprae* es un ejemplo típico de patógeno que provoca el desarrollo de este granuloma difuso, en donde predomina la reacción del tipo Th2, como en la que se observa en la enfermedad de Johne en bovinos y ovinos causada por *M. avium subesp. paratuberculosis*. Macroscópicamente las lesiones se observan grisáceas a blancas, firmes y con límites poco definidos (Ackermann, 2017). Es variada la composición celular, dependiendo del agente infeccioso, o la predisposición genética del huésped a la susceptibilidad del patógeno. En el caso de un grado más leve de las lesiones se presenta

una mínima acumulación de linfocitos alrededor de nervios dermales. Esta enfermedad puede progresar a lepra tuberculoide en cuyo caso los granulomas cutáneos se componen de células epitelioides y células de Langerhans gigantes, rodeadas por un gran cúmulo de linfocitos (Adams & Kragenbuhl, 2003). La enfermedad multibacilar presenta granulomas más desorganizados, predominan bacilos en el tejido, dominan los macrófagos caracterizados por ser granulares, espumosos o vacuolados, pueden presentar alta carga bacilar en el citoplasma. Se localizan infiltrados de linfocitos Th2, células B y plasmáticas. Esta organización del granuloma varía con el estado inmunitario pudiendo presentar características tuberculoides (Wang *et al.*, 2013).

### **2.2.3. Granuloma microsporidiano**

El granuloma microsporidiano causado por *E. cuniculi* en conejos es frecuentemente reportado en encéfalo. Las lesiones en el encéfalo son generalmente multifocales, nodulares no supurativas, con una conformación nodular, y con un diámetro que va desde 50  $\mu\text{m}$  hasta  $\geq 100 \mu\text{m}$ . Estos granulomas contienen macrófagos, linfocitos, células de la glía, células plasmáticas y un centro necrótico, presentándose en las lesiones más graves un aumento en el número de macrófagos, células epitelioides e histiocitos (Leipig *et al.*, 2013; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016).

## **2.3. Anatomía macroscópica del encéfalo**

El encéfalo se encuentra situado dentro de la cavidad craneal y puede ser dividido en cerebro, cerebelo y tronco encefálico. La cavidad craneal se divide en tres fosas: la fosa rostral que contiene los bulbos olfatorios y partes rostrales que presentan los hemisferios cerebrales. La fosa media que tiene los lóbulos temporal y parietal de los hemisferios cerebrales y, por último, la fosa caudal que posee en su parte ventral al mesencéfalo, puente, médula oblongada y dorsalmente al cerebelo.

### **2.3.1. Cerebro**

Es la mayor parte del encéfalo y se subdivide en dos mitades simétricas, los hemisferios cerebrales, mediante la fisura cerebral longitudinal. Los hemisferios cerebrales se pueden dividir en lóbulos que se denominan según su proximidad a los

huesos que los cubren. Las subdivisiones macroscópicas del cerebro adulto incluyen cerebro, cerebelo y tronco encefálico.

### **2.3.2. Telencéfalo**

También conocido como cerebro, comprende los dos hemisferios cerebrales, que incluyen la corteza cerebral, núcleos basales, núcleos subcorticales, y el rinencéfalo. El telencéfalo encierra las cavidades de los ventrículos laterales. En mamíferos domésticos la superficie del encéfalo está aumentada por numerosos pliegues que forman crestas convexas, denominadas giros, separadas por surcos denominados fisuras o surcos, pero la corteza cerebral de lagomorfos y roedores carece de estas estructuras denominándose lisencefálica (Osofsky *et al.*, 2007). La fisura longitudinal se encuentra en el plano medio y separa el cerebro en sus hemisferios derecho e izquierdo (Figura 3). La corteza cerebral se divide en regiones anatómicas que se definen por giros y surcos con funciones sensoriales y motoras específicas. En la corteza se inician los movimientos voluntarios, las sensaciones que se llevan con conciencia y tienen lugar las funciones superiores, como razonamiento y planificación. Los núcleos basales son agregados de materia gris subcortical, los cuales son importantes para el inicio y mantenimiento de la actividad motora. El rinencéfalo comprende una serie de estructuras corticales ventrales y profundas asociadas principalmente al sentido del olfato, también, tiene conexiones con regiones del cerebro (Frandsen *et al.*, 2009).

### **2.3.3. Diencéfalo**

Esta región deriva del prosencéfalo e incluye el tálamo, epitálamo, hipotálamo y el tercer ventrículo. El tálamo es un centro de transmisión para las fibras nerviosas que conectan los hemisferios cerebrales con el tronco encefálico, cerebelo y médula espinal. El epitálamo, dorsal al tálamo, incluye la glándula pineal, que es un órgano endocrino en los mamíferos, secreta melatonina que tiene funciones importantes en ritmos circadianos y ciclos del sueño. El hipotálamo, ventral al tálamo rodea la parte ventral del tercer ventrículo y comprende muchos núcleos que funcionan en las actividades autónomas y el comportamiento. La hipófisis se encuentra en la parte ventral del hipotálamo, es una glándula endocrina muy (Frandsen *et al.*, 2009).

#### **2.3.4. Mesencéfalo**

Este se ubica caudal al diencéfalo y rostral a la protuberancia. En su porción dorsal se encuentran los dos pedúnculos cerebrales y cuatro colículos, son las características más prominentes del mesencéfalo. Los dos pedúnculos cerebrales son grandes haces de fibras nerviosas que conectan la médula espinal y el tronco encefálico con los hemisferios cerebrales. Se forman principalmente por tractos motores descendentes. Los colículos son cuatro pequeñas protuberancias en la cara dorsal del mesencéfalo, formados por dos colículos rostrales (coordinan reflejos visuales) y dos colículos caudales (núcleos de relevo para la audición) (Figura 2) (Frandsen *et al.*, 2009).

#### **2.3.5. Metencéfalo**

Incluye el cerebelo dorsalmente y la protuberancia ventralmente. El cerebelo presenta dos hemisferios laterales y una cresta media denominada vermis, la superficie del cerebelo está formada por muchas láminas denominadas folias. Al igual que en el cerebro, la materia blanca es central y la materia gris es periférica en la corteza cerebelosa. Sus funciones son la sincronización y ejecución precisas de los movimientos, actúa para suavizar y coordinar la actividad muscular. La protuberancia se ubica ventral al cerebelo, su superficie posee fibras transversales que forman un puente de un hemisferio del cerebelo al otro. Muchos tractos de fibras y núcleos de nervios craneales conforman el resto de la protuberancia (Frandsen *et al.*, 2009).

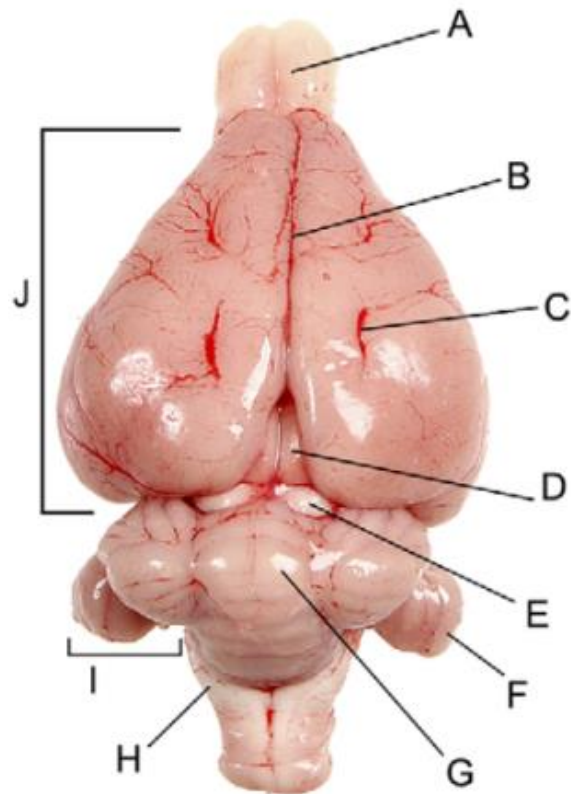
#### **2.3.6. Mielencéfalo**

En el adulto el mielencéfalo procede de la médula oblongada, la cual es una continuación craneal de la médula espinal, contiene importantes centros autonómicos y núcleos para los nervios craneales (Frandsen *et al.*, 2009).

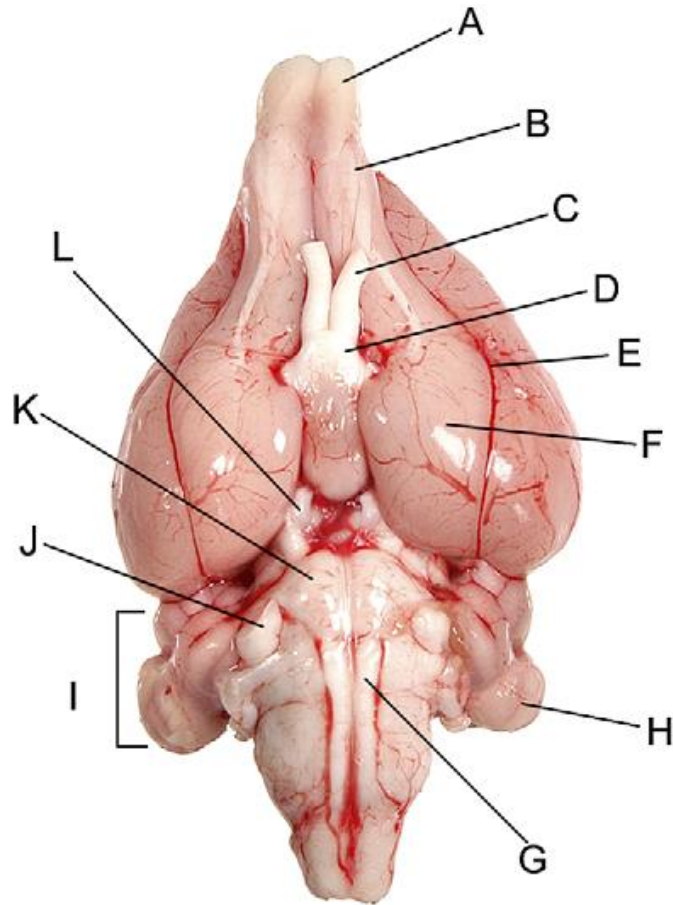
#### **2.3.7. Sistema Ventricular**

Los ventrículos laterales derecho e izquierdo se encuentran dentro de los hemisferios cerebrales respectivos. Se comunican con el tercer ventrículo de la línea media a través de dos agujeros interventriculares, el tercer ventrículo rodeado por el diencéfalo se comunica con el cuarto ventrículo a través del estrecho acueducto

mesencefálico (acueducto cerebral) que atraviesa el mesencéfalo. El cuarto ventrículo, situado entre el cerebelo por encima y la protuberancia y médula por debajo, se comunica con el espacio subaracnoideo que rodea el SNC. Cada ventrículo presenta un plexo coroideo, cubierto por una capa de células ependimarias continua con la membrana de revestimiento de los ventrículos, responsable de la formación de la mayor parte del LCR que recubre el sistema ventricular y rodea el SNC (Frandsen *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Vista dorsal de cerebro de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) no fijado. A- bulbo olfatorio, B- fisura longitudinal, C- sulco marginal, D- colículo rostral, E- colículo caudal, F- Paraflocculus cerebelar, G- Vermis cerebelar, H- Médula, I- hemisferio cerebelar, J- Corteza cerebral, K- *Sulco rhinal* lateral, L- Pedúnculo olfatorio, M- Lóbulo, N- Lóbulo occipital, O- Lóbulo piriforme. Modificado de: Osofsky A. 2007. Functional Neuroanatomy of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Clin Exotic Animal. 713-730.



**Figura 3.** Vista ventral de cerebro de conejo Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) no fijado. A- Bulbo olfatorio, B- pedúnculo olfatorio, C- nervio óptico II, D- Quiasma óptico, E- Sulcu rhinal lateral, F- lóbulo piriforme, G- Pirámides, H- paraflocculus cerebelar, I- hemisferio cerebelar, J- nervio trigémino, K- puente, L- nervio oculomotor III. Modificado de: Osofsky A. 2007. Functional Neuroanatomy of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Vet Clin Exot Anim. 713-730.

### **2.3.8. Anatomía microscópica del encéfalo**

El tejido nervioso se compone por dos tipos principales de células: neuronas y neuroglia o células gliales. La neurona comprende la unidad funcional del sistema nervioso, son células especializadas en recibir estímulos por otras células y conducir impulsos eléctricos hacia otras partes del organismo. Para la transmisión de impulsos desde una parte del organismo hacia otra participan varias neuronas bien organizadas formando redes de comunicaciones. Existen diferentes clasificaciones de las neuronas de acuerdo con la morfología basado en el número de procesos celulares (unipolar, bipolar, pseudo-unipolar o células nerviosas multipolares). Las neuronas unipolares tienen un único proceso (axón) y se encuentran en la primera capa de la retina (conos y bastones), las neuronas bipolares, tienen 2 procesos (una dendrita y un axón) que surgen de lados opuestos del pericarion, constituyen la capa neuronal media de la retina, células sensoriales de la mucosa olfatoria y células de ganglios espinal y vestibular del oído interno. Los cuerpos de neuronas pseudo-unipolares se encuentran en los ganglios sensoriales de nervios craneales y espinales. Las neuronas multipolares son el tipo más común, tienen una red de dendritas y un axón largo, incluyendo neuronas motoras inferiores, células de Purkinje del cerebelo, células piramidales del cerebro, conocidas como neuronas de Golgi tipo I. las neuronas de Golgi tipo II son interneuronas dentro del SNC, sus procesos son celulares son cortos, pero densamente elaborados, se encuentran principalmente en la corteza cerebral y cerebelosa, y en el bulbo olfatorio.

Las células gliales son un componente esencial del tejido nervioso porque sirven como soporte metabólico, físico y nutricional para las neuronas, facilitan la conducción de impulsos nerviosos, contribuyen a la inmunidad innata y regeneración neuronal. Las células gliales no transmiten impulsos nerviosos. En el sistema nervioso central existen cuatro tipos de células gliales: oligodendrocitos, astrocitos, microglía y endoteliales, denominándose en conjunto glía central. En el sistema nervioso periférico las células gliales se denominan glía periférica e incluyen células de Schwann que producen la mielina, células satélites, que se encuentran cercanas a las neuronas (Liebich *et al.*, 2019).

Las células gliales se consideran como el pegamento que proporciona apoyo estructural y funcional de los elementos neuronales, por ejemplo, las funciones de los astrocitos en el



SNC son regular, reparar y dar soporte y todas las regiones cerebrales contienen astrocitos, su clasificación general se basa en dos tipos de acuerdo con sus características morfológicas: astrocitos protoplasmáticos localizados en la materia gris y astrocitos fibrosos localizados en la materia blanca. La expresión de GFAP es el marcador estándar para la identificación de astrocitos que puede ser usado para caracterizar cualitativa o cuantitativamente los desórdenes en los que los astrocitos proliferan o se vuelven reactivos, cabe destacar el papel de los astrocitos en el proceso reparativo siendo los análogos a los fibroblastos en el resto del cuerpo (Zachary *et al.*, 2021).

Otro tipo de célula glial son los oligodendrocitos que también existen dos tipos: interfasciculares y oligodendrocitos peri neuronales o satélite. Las funciones de los oligodendrocitos interfasciculares es mielinizar axones en áreas donde los oligodendrocitos satélites regulan el microambiente peri neuronal. Los primeros ubicados en sustancia blanca y satélites en sustancia gris, principalmente. La microglía son las células inmunitarias que cumplen funciones de inmunoregulación, vigilancia y fagocitosis después de lesión o muerte neuronal, también desempeñan un papel muy importante en infecciones e inflamaciones cerebrales. Pueden responder rápidamente a agresiones patológicas para inducir una variedad de efectos que pueden contribuir tanto a la patogénesis como a brindar protección neuronal (Zachary *et al.*, 2021).

## **2.4. Técnicas de tinción para la identificación de microsporidios**

### **2.4.1. Azul de tricromo modificado**

Esta técnica se basa en el uso de un agente cromotrópico para el examen microscópico de muestras de heces, orina, aspiración duodenal y tejido (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2017). Las muestras de fluidos pueden utilizarse frescas o conservadas en formaldehído amortiguado en PBS a pH. 7.4. Esta tinción tiene una alta afinidad hacia la quitina, la cual es un componente de la pared interna de la cápsula de la espora. Para la identificación de la espora es necesario un aumento de 100x, se tiñen rojas o rosa pálido, evidenciando el tubo polar en el plano ecuatorial o de manera oblicua de polo a polo de la espora.

### **2.4.2. Tinción de Calcoflúor White**

Es un agente quimiofluorescente que tiene una extrema afinidad hacia la quitina, se requiere un microscopio con luz ultravioleta para detectar la señal (Maestrini *et al.*, 2017). Es necesario una longitud de onda de incidencia de 395 a 415 nm, con una absorbancia de 455 nm. Las paredes de la espora aparecen como halos ovalados de color azulado o turquesa brillante. Otros hongos y artefactos presentes en las muestras de heces pueden teñirse. Cuando se utiliza esta técnica con muestras de orina o esporas obtenidas de cultivo son más fáciles de identificar (Didier, 1995).

## **2.5. Histoquímica para analizar la integridad tejido nervioso**

### **2.5.1. Tinción Tricrómico de Masson**

Esta tinción ofrece la posibilidad de diferenciar las fibras de colágeno de la matriz extracelular del resto de tipos de estructuras (tejido epitelial, músculos, parénquima, etc). El Tricrómico de Masson es el método más común en patología e histología muscular, también se usa para el análisis histológico de nervios periféricos. La mayoría de los estudios utilizan esta técnica para el diagnóstico de abscesos cerebrales por la visualización de una cápsula fibrosa o en experimentación con modelos *in vivo* de lesión cerebral traumática (Krajewska *et al.*, 2011; Niesman *et al.*, 2014). Con base a lo anterior

se decidió utilizar esta técnica para la evaluación histológica del granuloma cerebral causado por *E. cuniculi*.

### **2.5.2. Tinción Pentacrómico de Movat**

Esta técnica se utiliza para la visualización histológica de tejidos conectivos y la mayoría de los estudios utilizan esta técnica para analizar enfermedades vasculares, como aterosclerosis, injertos vasculares, o enfermedades hepáticas y tumores (Liu *et al.*, 2021; Dokuchaeva *et al.*, 2022). Por lo anterior, se decidió utilizar esta técnica con el propósito de estudiar la composición del granuloma cerebral causado por la infección por *E. cuniculi* y analizar cómo se comporta el tejido conectivo en este proceso inflamatorio.

### **2.5.3. Tinción Klüver-Barrera**

Esta técnica permite identificar la mielina normal o degenerativa, con el colorante azul rápido de Luxol que tiene un cromógeno de ftalocianina de cobre que tiñe intensamente de color azul la mielina, además esta técnica contrasta con violeta de Cresilo los núcleos, nucleolos y cuerpos de Nissl de células neuronales en tejido nervioso (Survana *et al.*, 2019). En experimentos *in vivo* con ratas intoxicadas experimentalmente con el fruto de *Karwinskia humboldtiana* observaron un aumento de espacios vacuolados en los haces de axones, hinchazón axonal o desorganización del neuropilo mediante la técnica de Klüver-Barrera. Con base en lo anterior, esta técnica se consideró para analizar los haces de axones y el neuropilo enfocándonos en la región frontal de la corteza cerebral (Díaz-Pérez *et al.*, 2016).

### **2.5.4. Tinción de Nissl**

El violeta de Cresilo es un colorante catiónico que tiñe la sustancia de Nissl y sirve para la evaluación de células neuronales y gliales en tejido nervioso, por permitir la visualización del núcleo, nucleolo y soma de las neuronas. En otras enfermedades infecciosas como en meningitis experimental por *Streptococcus pneumoniae* utilizaron esta técnica para analizar el daño cortical en ratones knockout del factor neurotrófico derivado del cerebro observando pérdida de neuronas corticales (Zhao *et al.*, 2020), por lo anterior, al ser la encefalitozoonosis una enfermedad con signología nerviosa, es

importante la evaluación de neuronas corticales en la infección experimental por *E. cuniculi*.

## **2.6. Inmunohistoquímica.**

### **2.6.1. Inmunohistoquímica para la detección de *Encephalitozoon cuniculi*.**

En el encéfalo la encefalitozoonosis causa una severa respuesta granulomatosa caracterizada por el reclutamiento de macrófagos, linfocitos, células dendríticas y células NK. Es necesario confirmar la infección por *E. cuniculi* observando quistes de esporas como se ha visto en trabajos previos en conejos infectados natural o experimentalmente (Dávila-Martínez *et al.*, 2020; Soto-Domínguez *et al.*, 2022) y así confirmando la infección por *E. cuniculi*. La técnica de inmunohistoquímica se utilizó para la identificación de *E. cuniculi* en tejido nervioso en los grupos experimentales.

### **2.6.2. Marcador celular para GFAP**

Los astrocitos son células gliales especializadas que recubren todo el SNC, ejerciendo múltiples funciones complejas esenciales como la regulación de iones, concentración de antioxidantes, metabolismo de neurotransmisores, y contacto con los vasos sanguíneos. En lesiones cerebrales los astrocitos pueden secretar factores de crecimiento, moléculas de matriz extracelular para la reparación del SNC. Responden a las lesiones del SNC mediante astrogliosis reactiva, donde se producen cambios reversibles en la expresión génica e hipertrofia celular, hasta la formación de cicatrices duraderas con reordenamiento de la estructura tisular. En el tejido nervioso lesionado los astrocitos pueden cumplir el rol análogo de fibroblastos en el resto del cuerpo, pero no sintetizan fibras de colágeno (Zachary *et al.*, 2021).

La expresión de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP; por sus siglas en inglés), se ha convertido en un marcador prototípico para la identificación inmunohistoquímica de astrocitos sanos o intactos. GFAP se aisló por primera vez como una proteína altamente concentrada en placas desmielinizadas crónicas de pacientes con esclerosis múltiple y se descubrió que se asocia con astrocitos reactivos en dichas placas (Eng *et al.*, 1970). Por lo tanto, la detección de GFAP se considera como un marcador sensible y confiable para la mayoría de los astrocitos, que responden a las lesiones del SNC. GFAP pertenece a una

familia de proteínas de filamentos intermedios, que incluyen vimentina, nestina y otras, que sirven principalmente para funciones cito-arquitectónicas. Las alteraciones en astrocitos o microglía se han usado como el sello patológico en tejido nervioso lesionado en una variedad de infecciones y enfermedades neurodegenerativas (Chen *et al.*, 2019; Rauf *et al.*, 2022). La literatura describe el uso de este marcador para el análisis de cambios morfológicos en infecciones o el papel de la neuroinflamación por parte de los astrocitos. Según lo anterior, el papel de los astrocitos en el granuloma cerebral se analizó mediante inmunohistoquímica.

### **2.6.3. Marcador celular para TLR2.**

Los receptores tipo Toll (TLR) son la familia más importante de receptores de reconocimiento de patrones, algunos de los cuales se localizan en la membrana celular donde pueden unirse a PAMP's de patógenos como hongos y bacterias. Otros se encuentran en el interior de las células donde se unen a PAMP's de invasores intracelulares como los virus y ciertos hongos. Los TLR se encuentran en las células centinela del sistema inmune innato, como macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células dendríticas (Tizard *et al.*, 2019). Igualmente, en linfocitos T y B del sistema inmunitario adaptativo, así como en células no inmunitarias, como células epiteliales que recubren los tractos respiratorio e intestinal y células de tejido nervioso. En encéfalo TLR2 es un elemento importante del sistema de respuesta inmune innata que se expresa en microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales. En el SNC se ha descrito la participación de TLR2 en meningitis por *Streptococcus meningitidis*, en conjunto la pérdida del factor neurotrófico derivado del cerebro, activación de TLR2 y NOD2 median el flujo del factor nuclear kappa B y son vías asociadas con la infección por esta bacteria (Shao *et al.*, 2020). En pacientes infectados de esquistosomiasis se ha visto que células B y células dendríticas expresan altos niveles de TLR2 y suprimieron la expresión de citocinas Th1 y Th17 al ser tratados con ligandos de TLR2. En otras enfermedades granulomatosas como la tuberculosis por *M. tuberculosis*, la bacteria contiene ligandos en particular para TLR2 y en la sarcoidosis otra enfermedad granulomatosa, si una bacteria es el agente que inicia la enfermedad la función de los TLR puede contribuir a la patogenia (Wiken *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios se centran en enfermedades granulomatosas como la

tuberculosis, esquistosomiasis, criptococosis, lepromatosis (Boros *et al.*, 2003), por lo anterior se consideró importante analizar el papel de receptores tipo Toll en la inflamación causada por *E. cuniculi* en encéfalos de conejos Nueva Zelanda.

#### **2.6.4. Marcador celular para TLR4**

La mayoría de los estudios sobre el receptor tipo Toll 4 (TLR4) se enfocan en modelos murinos observando un papel importante en la activación de células dendríticas esplénicas durante la infección por *E. cuniculi* que resulta en el inicio de una respuesta inmune protectora y la expresión de otros TLR se mantuvo igual. También se ha demostrado que la fuerte activación por parte de células presentadoras de antígeno es dependiente de TLR4 mencionando que este receptor está fuertemente activado por parte de células presentadoras de antígeno dependiente de TLR4, involucrando este receptor en la inmunidad de las células T CD8+ contra *E. cuniculi*. TLR4 puede reconocer patógenos fúngicos a través y O-mananos, sugiriendo que los O-mananos pueden actuar como PAMP (Herrera., 2019). En cerebro el receptor tipo Toll TLR4 se expresa principalmente en células gliales del parénquima, microglía, astrocitos y neuronas (Rolls *et al.*, 2007). Este receptor regula algunos procesos fisiológicos como neurogénesis y también se ha reportado su participación en desordenes neurodegenerativos como en la enfermedad de Alzheimer (Trotta *et al.*, 2014). En la tuberculosis se reconocen antígenos en humanos y ratones donde se involucra el papel de TLR4 (Reiling *et al.*, 2002). No existe aún estudios que involucren analizar el papel de TLR4 en sistema nervioso central por lo que fue relevante estudiarlo en esta enfermedad.

#### **2.6.5. Marcador celular para CD11c.**

Las células dendríticas (DC) son células presentadoras de antígeno profesionales que controlan la generación de inmunidad adaptativa, en consecuencia, tienen un papel central en la inducción de inmunidad protectora frente a patógenos y también en la respuesta inmune patógena responsable del desarrollo y progresión de la enfermedad. Controlan la activación y polarización de las células T en SNC secretando quimiocinas que promueven el reclutamiento y reactivación de células T, en consecuencia, la generación de respuestas

de células T y anticuerpos específicos de antígeno. Las DC tienen un papel central en el control de la respuesta inmune adaptativa a patógenos y tejidos propios (Quintana *et al.*, 2015). Los espacios perivasculares de Virchow-Robin, leptomeninges y plexos coroideos contienen células fagocíticas, las cuales han sido identificadas como macrófagos o células dendríticas y en circunstancias patológicas incrementan su número por períodos prolongados, presentan una morfología dendrítica característica y son células altamente fagocíticas que expresan altos niveles del MHC-II. Su posición estratégica influye de manera sustancial en el tráfico celular dentro del parénquima del SNC, son la principal fuente de TNF- $\alpha$  e inducen la producción glial de quimiocinas, las cuales desencadenan el reclutamiento de linfocitos que median a su vez la respuesta inflamatoria en el parénquima del SNC (Correale *et al.*, 2011), en observaciones publicadas de granulomas cerebrales en conejos Nueva Zelanda infectados naturalmente por *E. cuniculi* observaron células positivas para la molécula MHC-II (Soto-Domínguez *et al.*, 2020). CD11c es un marcador ampliamente reconocido para identificar células dendríticas, es una glicoproteína transmembranal tipo I de 150 kDa, pertenece a la familia de moléculas de adhesión de las integrinas  $\beta 2$ . Por lo cual, es de interés ver su participación en la formación granulomatosa como en otras enfermedades granulomatosas como tuberculosis, leishmaniasis, sarcoidosis (Boros *et al.*, 2003).

#### **2.6.6. Marcador celular para CD20.**

El tráfico de células B dentro del SNC está determinado por tres grupos de moléculas: a) la liberación de metaloproteinasas, las cuales degradan la membrana basal de la BHE, b) la expresión de moléculas de adhesión en las células B, c) la liberación de quimiocinas que se ocuparían de la migración de las células B dentro del SNC. Dentro del SNC los astrocitos reactivos han sido identificados como la mayor fuente de CCL2 y CCL12, si bien los linfocitos B que ingresan en el parénquima cerebral pueden expresar una variedad importante de quimiocinas, CCR1, CCR2, CCR4 presentan una mayor expresión en las células infiltrantes del SNC en comparación con las células B circulantes en la sangre periférica, lo que sugiere que son reclutadas luego de un estímulo específico. El SNC está equipado con un panel de factores que favorecen la migración y supervivencia de las células B y que su producción favorece la producción de anticuerpos en el parénquima

cerebral durante fenómenos inflamatorios. La acumulación de células B en SNC pueden participar en la patogenia de las enfermedades inflamatorias por diferentes mecanismos como producción de anticuerpos, fijación del complemento, presentación antigénica, producción de citocinas proinflamatorias. La identificación de estructuras linfoides ectópicas en el SNC como fuente de generación de células B y células plasmáticas refuerza el concepto de que la inmunidad humoral desempeña un papel importante en la patogenia de diferentes enfermedades (Correale *et al.*, 2011).

La literatura menciona que CD20 es una proteína transmembrana que se encuentra en las células B maduras en todas las etapas de su desarrollo. Se ha utilizado para la identificación de linfocitos B. En cuanto a enfermedades granulomatosas causadas por patógenos se ha visto la participación en la esquistosomiasis inducida por helmintos, donde los antígenos secretados por los huevos del parásito inducen granulomas peri ovales que protegen el hígado de las secreciones tóxicas de los huevos, siendo la inflamación inicial de tipo Th1 y con la cronicidad se modula a una respuesta Th2 reduciendo. En ratones (Xid) se presenta una severa deficiencia de células B CD5+ demostrando que este subtipo celular tiene un rol en la regulación de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-5 por las células T influyendo en el tamaño del granuloma (Boros *et al.*, 2013). Por otra parte, en tuberculosis pulmonar murina, las células B entran en grandes cantidades y pueden tener una función principal induciendo una fuerte respuesta de anticuerpos, de hecho, la IL-10 derivada de células B1 controla la homeostasis de células T colaboradoras y las citocinas producidas por estos linfocitos forman focos de células B en ratones infectados y se correlaciona con la infiltración de células B en pacientes con tuberculosis (Boros *et al.*, 2003). No hay información disponible sobre el papel de células B en el granuloma cerebral causado por *E. cuniculi*, por lo cual se identificó la participación de este tipo celular en granulomas cerebrales causados por la infección experimental de *E. cuniculi*.

#### **2.6.7. Marcador celular para CD56.**

Las células NK comprenden entre el 5 y 15% de los linfocitos de sangre periférica desarrollándose dentro del microambiente de la médula ósea. Fenotípicamente, dos subpoblaciones se han definido en la sangre periférica; por un lado, se destacan las células que expresan altos niveles de CD16 y niveles intermedios de CD56 que comprenden del



90 a 95% presentando actividad citotóxica predominante, y la otra subpoblación no expresa CD16, pero produce niveles altos de CD56. Estas últimas comprenden el 10% en la sangre periférica y son una fuente primaria de producción de citocinas inmunorreguladoras. Cabe destacar que un perfil diferencial de tráfico y adhesión celular le confiere a esta última población la capacidad de migrar a diferentes órganos incluyendo el encéfalo. Las células NK son un componente prominente del sistema inmunitario innato que responden rápidamente a una variedad de agresiones a través de la secreción de citocinas y la actividad citolítica. En circunstancias patológicas se alojan fácilmente en los tejidos del SNC para combatir la infección, al igual que en otros tejidos, las células NK actúan en conjunto con las células T y otros linfocitos responsables de la patología del SNC y la regulación inmunitaria. En infecciones virales la citotoxicidad celular en particular de las células NK y células T es fundamental para la respuesta inmunitaria contra virus y varios estudios demuestran el reclutamiento y activación de células NK después de la infección con una amplia gama de virus (Shi & Ransohoff., 2010).

Los roles de las células NK en el SNC como efectores y reguladores de la inmunidad innata son la producción de factores de crecimiento, producción de citocinas pro y antiinflamatorias, su potente citotoxicidad y vigilancia inmunitaria. En cuanto a infecciones granulomatosas como la tuberculosis pulmonar las células NK promueven la inflamación y remodelación de tejidos, en la sarcoidosis pulmonar intervienen en la fusión y agregación celular para la formación de granulomas por la producción de INF- $\gamma$  (Boros et al., 2013).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1. Animales de experimentación**

En total, 18 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Nueva Zelanda se utilizaron, tanto hembras como machos, de 1 mes de edad y con un peso de 300 g aproximadamente. Los animales fueron proporcionados por el Departamento de Cunicultura de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UANL). Se examinaron clínicamente para descartar algún signo de enfermedad, se les realizó análisis urológico y coprológico mediante tinción con Calcoflúor White y azul de tricromo modificado para descartar una infección previa con microsporidios.

#### **3.1.2. Mantenimiento y alojamiento**

Los animales fueron alojados en las instalaciones de Unidad de Modelos Biológicos del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS-UANL). Se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h, a una temperatura ambiente de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Previó al experimento, los animales tuvieron un periodo de aclimatación de 10 d y se llevó a cabo el manejo de los animales de acuerdo con lo establecido de la normativa mexicana vigente para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ, UANL.

#### **3.1.3. Diseño experimental**

Los animales fueron divididos en cuatro grupos: grupo A (control) (n=3), grupo B (15 días postinfección) (n=5), grupo C (30 días post infección) (n=5), grupo D (45 días post infección) (n=5), infectados experimentalmente con esporas de *E. cuniculi*. Todos los tratamientos iniciaron en el día 0: al grupo control se le administró 1 mL de solución salina fisiológica (SSF) al 0.9%, los demás grupos se inocularon con una dosis infectiva de  $1\times 10^6$  esporas diluidas en 1 mL de PBS. La administración del inóculo fue única y se realizó con una sonda orogástrica de 15 cm de longitud, calibre 5 Fr (DIP-MAC, México). Para la tranquilización de los animales utilizamos 5 mg/kg de Xilacina (Procin®, PiSA

Agropecuaria, México) por vía intramuscular. Se realizó la obtención de muestras en los tiempos establecidos (Cuadro 2).

**Tabla 1.** Diseño experimental. Distribución de los grupos y sus tratamientos. Todas las administraciones se realizaron únicamente al día 0.

| <b>Grupo</b>                        | <b>n</b> | <b>Tratamiento</b>                      |
|-------------------------------------|----------|---|
| A grupo control                     | 3        | 1 ml SSF/ por animal                    |
| B infección experimental<br>15 días | 5        | 1x10 <sup>6</sup> esporas por<br>animal |
| C infección experimental<br>30 días | 5        | 1x10 <sup>6</sup> esporas por<br>animal |
| D infección experimental<br>45 días | 5        | 1x10 <sup>6</sup> esporas por<br>animal |

### **3.1.4. Preparación del inóculo**

Para obtener las esporas necesarias para la infección experimental se utilizó la cepa CDC:V283 de *E. cuniculi* (ATCC®, 50789TM), propagada en la línea celular Vero C1008 (clon E6, ATCC®, CRL-1586TM, EUA). Los cultivos se mantuvieron durante 3 semanas en DMEM (Sigma-Aldrich, EUA), con penicilina-estreptomicina-anfotericina B (Sigma-Aldrich, EUA), en una atmósfera con 4% CO<sub>2</sub> a 37°C (Forma™ Series II Water Jacket Incubator, Thermo Scientific, EUA). A las 3 semanas posinoculación o al alcanzar entre el 90-100% de índice de infección, los cultivos se rasparon con scrappers (CELLTREAT®, EUA) y la suspensión celular fue lisada mecánicamente por pasajes a través de aguja fina calibre 27G con el uso de jeringas estériles (Terumo™, Japón). El lisado celular y el sobrenadante recolectado se centrifugaron a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en PBS (pH 7.4), y luego se realizó el conteo de esporas en una cámara de Neubauer (Marienfeld Superior, Alemania). Lo que se obtuvo se almacenó en alícuotas de 10x10<sup>6</sup> esporas/mL a 4°C hasta su uso. Para la inoculación experimental se ajustó la dosis a la concentración de 1x10<sup>6</sup> esporas/ml en PBS (Salas-Holguín et al., 2021).

### **3.1.5. Tranquilización, anestesia y sacrificio**

Los animales fueron anestesiados con 5 mg/kg de xilacina (Procin®, PiSA Agropecuaria, México), en combinación con 15 mg/kg de clorhidrato de zolacepam/tiletamina (Zoletil® 100, Virbac, México) por vía intramuscular. Después de realizar la toma de muestra sanguínea, la eutanasia se llevó a cabo por una sobredosis de anestésico, administrando 180 mg/kg de pentobarbital sódico (Laboratorios Aranda, México), por vía intraperitoneal.

### **3.1.6. Extracción de sangre**

La extracción se realizó mediante punción cardiaca en los animales anestesiados, previo a la eutanasia. En total 3 mL de sangre se obtuvieron por animal y se depositaron en tubos al vacío y sin anticoagulante (EDTA K2) (BD Vacutainer®, México). Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C durante su traslado y hasta su uso. A partir

de la sangre con anticoagulante se obtuvieron los parámetros correspondientes a la biometría hemática y el conteo leucocitario, utilizando un analizador automático (Hemograms Analyzer BC Vet®, Kontrolab, Italia) en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la FMVZ. La sangre sin anticoagulante se centrifugó a 2500 rpm por 15 min a 4°C (Universal 320 R, Hettich Zentrifugen, Alemania) para separar el suero del coágulo. El suero recuperado fue almacenado a -20°C.

### **3.1.7. Necropsia y extracción del encéfalo**

Después de la eutanasia se procedió con la necropsia de los grupos experimentales iniciando con la obtención del encéfalo. Un corte a la altura de la articulación atlanto-occipital se realizó, diseccionando la piel de la cabeza desde las ramas de la mandíbula hasta el hueso orbital. El cráneo se expuso y se realizó un corte para unir los dos anteriores, a la altura de la sutura parietal. El hueso se retiró para exponer el encéfalo. Finalmente, el encéfalo se expuso y se disecciono. El encéfalo completo se depositó en 400 ml de paraformaldehído (PFA) al 4 % (Sigma-Aldrich, EUA), amortiguado en PBS (pH. 7.4), para su fijación por 48 h antes de su procesamiento. El resto de las muestras: ojo, músculo, timo, pulmón, corazón, hígado, riñones, bazo, intestino delgado y grueso se colectaron de manera rutinaria y se fijaron en PFA al 4% para su posterior uso en otras investigaciones.

### **3.1.8. Muestras de orina y heces**

La orina se obtuvo directamente de la vejiga mediante cistocentesis, utilizando jeringas estériles de 5 mL (Terumo™, Japón) y el contenido se depositó en tubos cónicos de 15 mL. Las muestras de orina se almacenaron a -20°C hasta su uso. Las heces se obtuvieron directamente de duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto; y se depositaron en tubos de ensayo individuales con 3 mL de formalina neutra tamponada (NBF) al 10% sellados y almacenados a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

### **3.2. Muestras cerebrales**

Dos tipos de muestreo por secciones cerebrales se realizaron de acuerdo con el propósito de este: 1) secciones sagitales del hemisferio izquierdo para los análisis de inmunohistoquímica e histoquímica (figura 4) y, 2) secciones coronales del hemisferio derecho para la detección y mapeo de los granulomas cerebrales y lesiones asociadas (figura 5). Para la identificación anatómica de las secciones cerebrales analizadas se utilizó la literatura disponible del cerebro de conejo (Shek *et al.*, 1986; Osofsky *et al.*, 2007).

#### **3.2.1. Secciones sagitales**

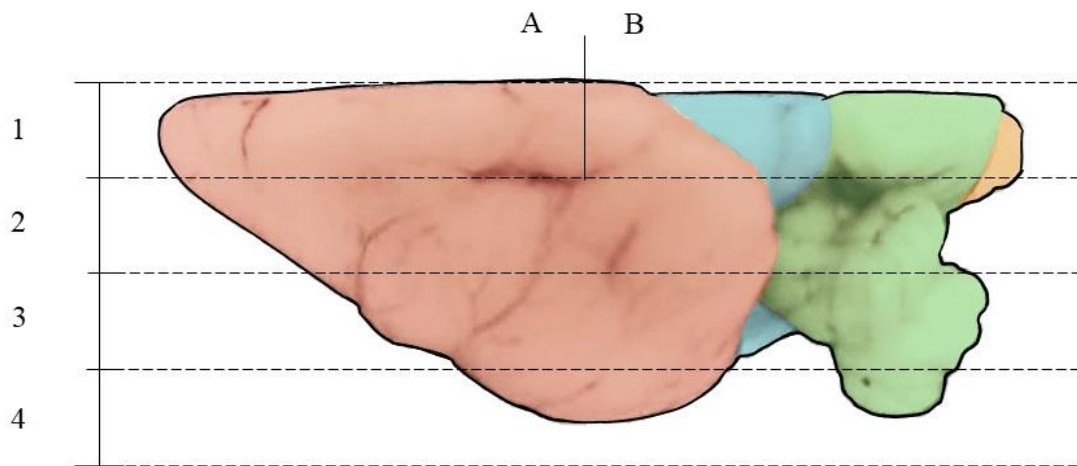
Después de la fijación del encéfalo se procedió al seccionamiento del hemisferio izquierdo en secciones sagitales utilizando como guía una hoja de acetato cuadriculada. El encéfalo se cortó obteniendo secciones paralelas de 5 mm de grosor. Tres secciones sagitales se obtuvieron del hemisferio izquierdo. La sección sagital 1 comprende desde el bulbo olfatorio hasta la médula oblongada por lo cual se dividió la sección en 2 para ajustarse al tamaño de las capsulas de inclusión (Figura 4).

#### **3.2.2. Secciones coronales**

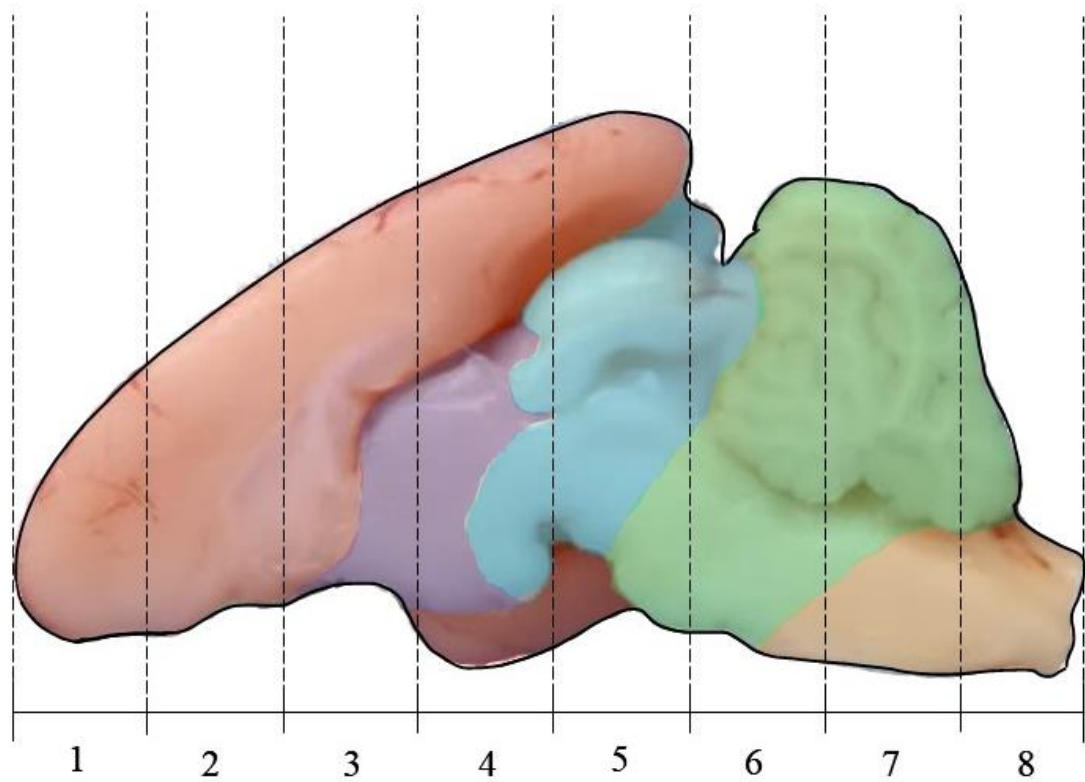
El hemisferio cerebral derecho se colocó en una hoja de acetato cuadriculada para realizar el seccionamiento de los cortes coronales y obtener regiones cerebrales del prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo para la búsqueda de los granulomas. Las secciones obtenidas midieron 5 mm de grosor y el seccionamiento incluyó desde la región frontal hasta la médula oblongada y obtuvimos ocho secciones coronales (Figura 5).

#### **3.2.3. Hematoxilina y eosina para la observación de los granulomas**

Las laminillas se revisaron por microscopia de luz simple para identificar cambios histopatológicos en el encéfalo y localizar lesiones compatibles con encefalitozoonosis según lo descrito por Rodríguez-Tovar *et al.* (2016). Los cambios histopatológicos en encéfalo comprenden desde infiltrados linfocitarios perivasculares, áreas de reacción glial, quistes parasitarios, hasta la observación de una meningoencefalitis granulomatosa grave.



**Figura 4.** División del hemisferio izquierdo del encéfalo en secciones de 5 mm de grosor. Las líneas punteadas indican la altura a la que se realizaron los cortes sagitales. La primera sección (medial a lateral) se subdividió en dos partes que se ajustaran al tamaño de las cápsulas de inclusión. Tomado de González-Castillo (2021).

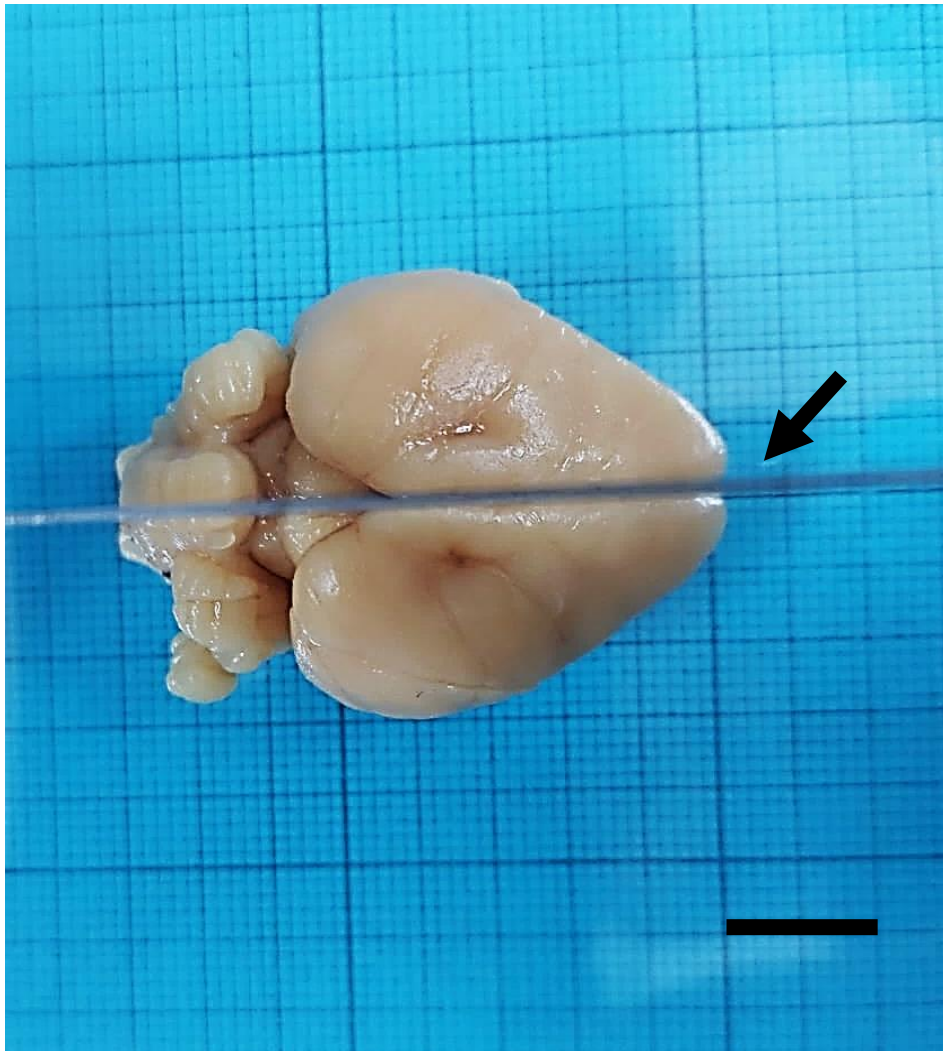


**Figura 5.** División del hemisferio derecho del encéfalo en secciones de 5 mm de grosor. Las líneas punteadas indican la altura en la que se realizaron los cortes coronales. Los cortes pares (2, 4, 6 y 8) se utilizaron para el análisis de la búsqueda de los granulomas. Tomado de González-Castillo (2021).

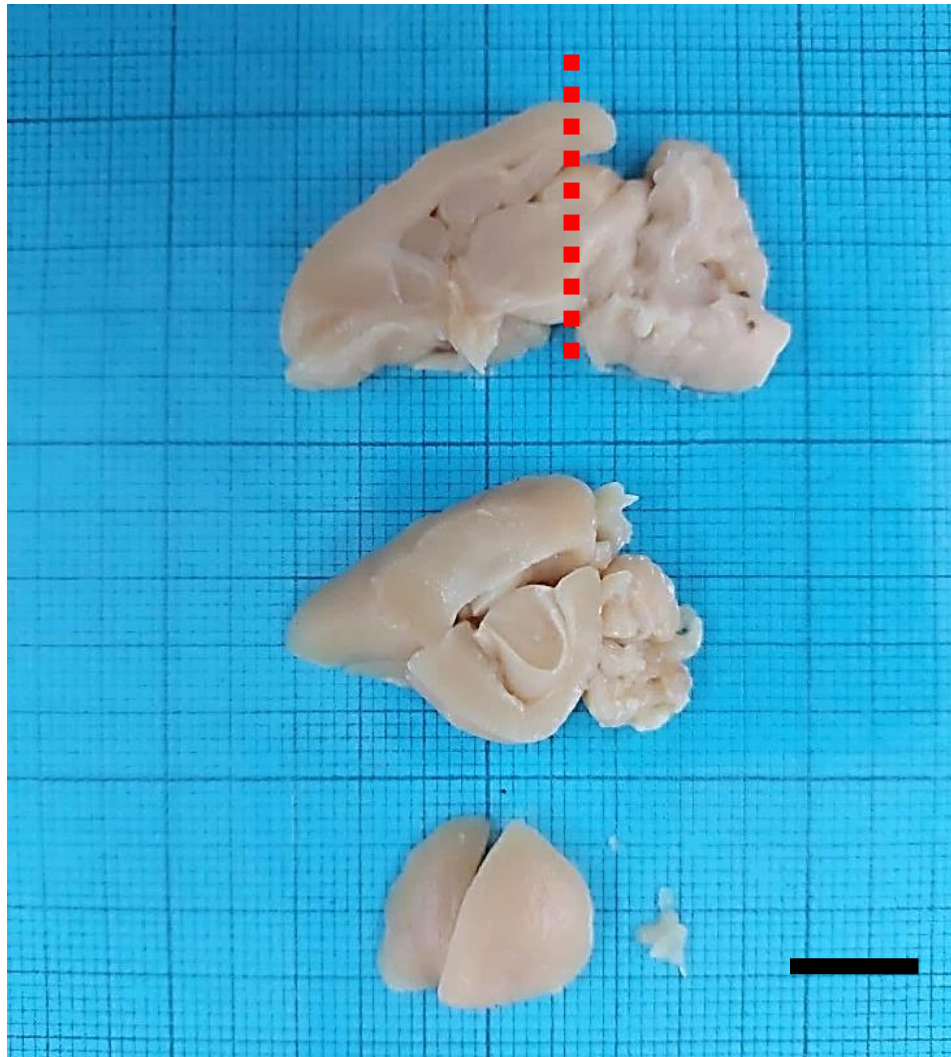


#### **3.2.4. Observación de granulomas en encéfalo**

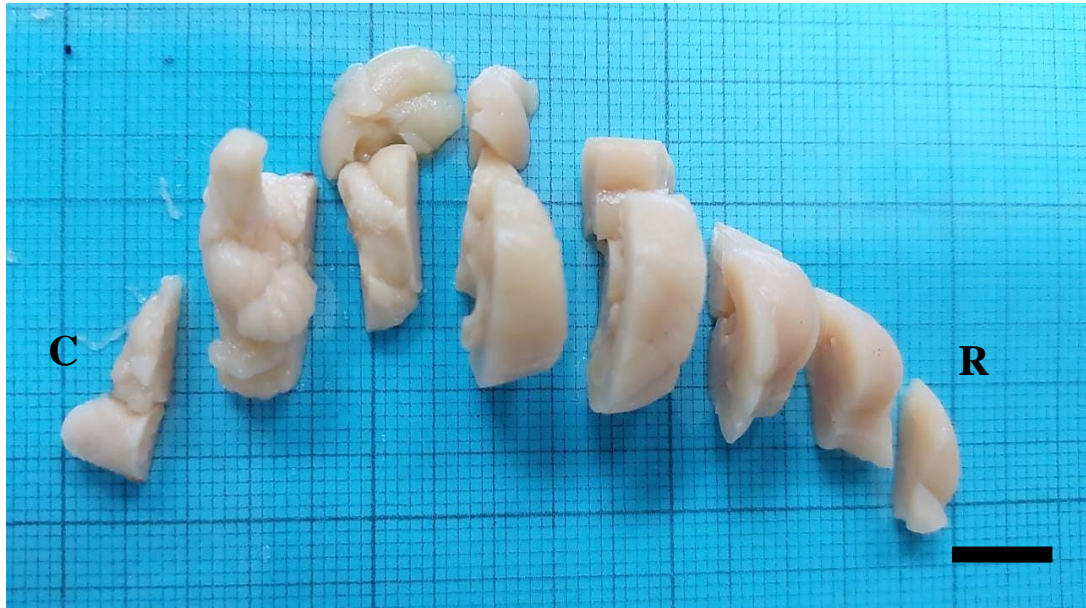
A partir de la fisura interhemisférica (Figura 6) se obtuvieron secciones sagitales (Figura 7) y coronales (Figura 8) de 5 mm de grosor aproximadamente para su análisis. Se realizaron 12 cortes seriados para cada sección coronal (Figura 7) de 5  $\mu\text{m}$  de grosor con 10  $\mu\text{m}$  de espacio entre cada corte en 3 animales por grupo como en trabajos descritos por Mouton *et al.* (2014). Los cortes se realizaron en un microtomo (Leica RM2235, Leica Biosystems, EUA) y se colocaron en portaobjetos convencionales (Corning, Inc., EUA), y se tiñeron con la técnica de hematoxilina y eosina; posteriormente se montaron en resina sintética.



**Figura 6.** Seccionamiento de hemisferios. La navaja (flecha negra) se ubica en la cisura interhemisférica donde se realizó el corte para separar los hemisferios cerebrales. Barra = 1cm.



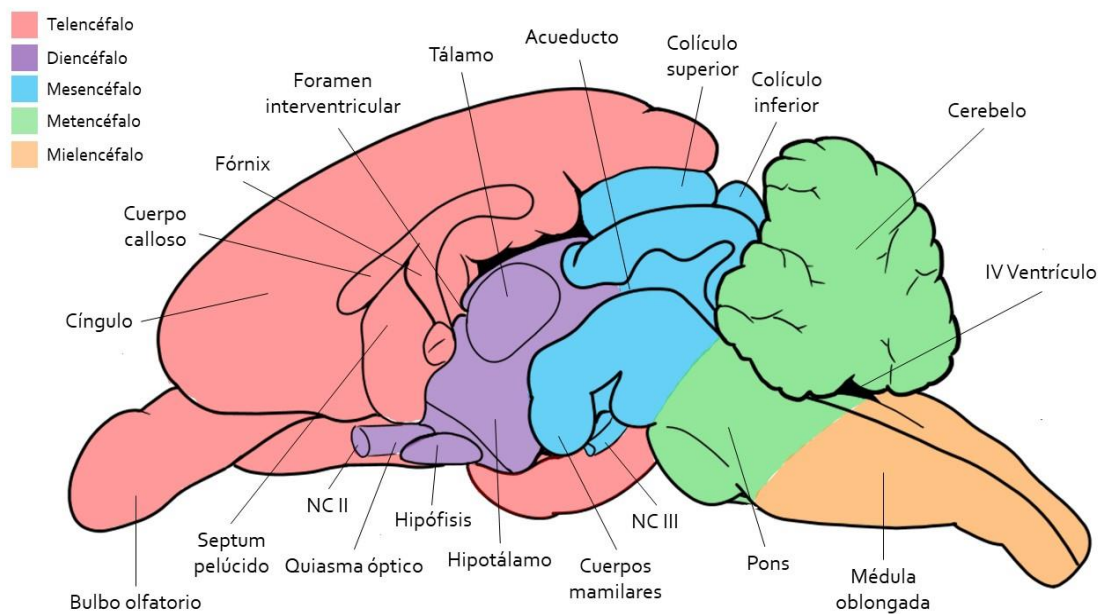
**Figura 7.** La figura muestra las secciones sagitales obtenidas del seccionamiento del hemisferio izquierdo y la línea punteada en color rojo señala donde se realizó el corte para dividir en 2 secciones la sección sagital 1. Barra = 1cm.



**Figura 8.** Encéfalo de conejo. Seccionamiento de cortes coronales, hemisferio derecho.  
R= rostral. C= caudal. Barra = 1 cm.

### 3.2.5. Áreas muestreadas del encéfalo para la detección de los granulomas

La Figura 9 muestra las regiones derivadas de los segmentos cerebrales principales (prosencefalo, mesencefalo, rombencefalo), tomando en cuenta la metodología mencionada anteriormente abarcamos regiones anatómicas del prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo.



**Figura 9.** Representación gráfica de la vista sagital del encéfalo de conejo. Se indican en distintos colores las diferentes regiones cerebrales. Tomado de González-Castillo (2021).

### **3.2.6. Conteo de granulomas**

Para evaluar si la distribución de las lesiones se relaciona con la ubicación de los granulomas se realizó un conteo manual de granulomas con el método de simple ciego (Monaghan *et al.*, 2021) y los datos a tomar en cuenta para el conteo de los granulomas en los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) utilizar secciones coronales para el análisis, 2) analizar las muestras de 3 animales por grupo, y 3) para la identificación de granulomas cerebrales tomar de referencia lo descrito por Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016. Las recomendaciones de Steel *et al.* (1985); Montgomery *et al.* (2004), se siguieron para la transformación de los datos por el método de la transformación raíz cuadrada.

### **3.3. Inmunohistoquímica para la detección de receptores y poblaciones celulares.**

Para la identificación de *E. cuniculi* se utilizó un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-Microsporidia (Bordier Affinity Products, Suiza) a una dilución comercial lista para usarse. Para la detección de astrocitos se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP-Dako Cytomation, Inc®) a una dilución de 1:1000. El anticuerpo policlonal anti-TLR4 (BS-20594R, Thermo Life Technologies) a una dilución de 1:200 y anticuerpo policlonal de conejo anti-TLR2 (ab213676, Abcam®, EUA) a una dilución 1:200. Para la detección de células dendríticas se utilizó el anticuerpo policlonal anti-CD11c (PA5-35326) a una dilución de 1:100, para identificar linfocitos B se utilizó el anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD20 (Dako Cytomation, Inc®) a una dilución de 1:1000, y para identificar células asesinas naturales se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-CD56 (Dako Cytomation, Inc®) a una dilución de 1:1000. Los tejidos control positivos para los marcadores GFAP, TLR2, TLR4, CD11c, CD20, CD56 fueron cerebro de ratón, intestino, bazo, e hígado respectivamente. Como control negativo se omitió el anticuerpo primario.

Secciones de 4 µm de grosor montadas en laminillas recubiertas de poli-L-lisina, se utilizaron y, desparafinaron en xileno, se hidrataron en alcoholes graduados y se lavaron en PBS (pH 7.4). En seguida, las secciones se sometieron a recuperación de antígenos inducida por calor en tampón de citrato pH 6.0 (el tiempo y temperatura varían por marcador, ver protocolo para cada marcador en apéndice A-9 a A-14). La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrogeno al 3% a temperatura

ambiente, y los sitios de unión inespecíficos se bloquearon con suero de caballo al 10% en PBS. El sistema LSAB 2-HRP (ab64264, Abcam®) y el DAB (3,3´diaminobenzidina, ImmPACT, Vector Labs, EE. UU.) se utilizó para la visualización del inmunomarcaje. La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris y las secciones teñidas se deshidrataron y se montaron con resina y cubreobjetos. Los controles positivos y negativos (sin anticuerpo primario) se tiñeron en paralelo para inmunohistoquímica.

### **3.3.1. Conteo de células positivas para los marcadores celulares.**

Para realizar el análisis de los datos de marcadores celulares se utilizó GFAP para detectar astrocitos, CD11c para identificar células dendríticas, células CD56 positivas para células asesinas naturales y TLR2 y TLR4 para identificar células presentadoras de antígeno. Se realizó conteo manual de células positivas con el método de doble ciego por dos investigadores (Müller-Vahl *et al.*, 2022) y los datos para tomar en cuenta para el conteo celular de cada marcador en los grupos experimentales fueron los siguientes: 1) utilizar secciones sagitales, 2) analizar 3 animales por grupo, 2) analizar 1 laminilla por animal, 4) tomar 20 campos por laminilla de la región frontal de la corteza cerebral. Se utilizó un microscopio de luz (Primo Star, Zeiss, Alemania) adaptado con una cámara fotografía (Canon PowerShot G10, Zeiss, Alemania) para la toma de los campos bajo el microscopio de luz en objetivo 40x. Al igual que en el conteo de granulomas se siguieron las recomendaciones de Steel *et al.* (1980); Montgomery *et al.* (2004) para la transformación de los datos por el método de la transformación raíz cuadrada.

### **3.4. Análisis estadístico**

Con los datos obtenidos a partir de la cuantificación manual de granulomas con el método de simple ciego o con el método de doble ciego para el conteo de células positivas para inmunohistoquímica se realizó el método de transformación de la raíz cuadrada, y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias de Tukey seguido de la prueba de Kruskal-Wallis a través del software estadístico Minitab®, (versión 17.1.; 2013). Para la generación de gráficos fue empleado el programa GraphPad Prism 4.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Detección de los granulomas y lesiones adyacentes

Los cerebros de los conejos del grupo control clínicamente sano mostraron una histología normal en las regiones cerebrales exploradas. Mientras que en los conejos infectados se detectaron reacciones granulomatosas compatibles con el granuloma microsporidiano (Tabla 1).

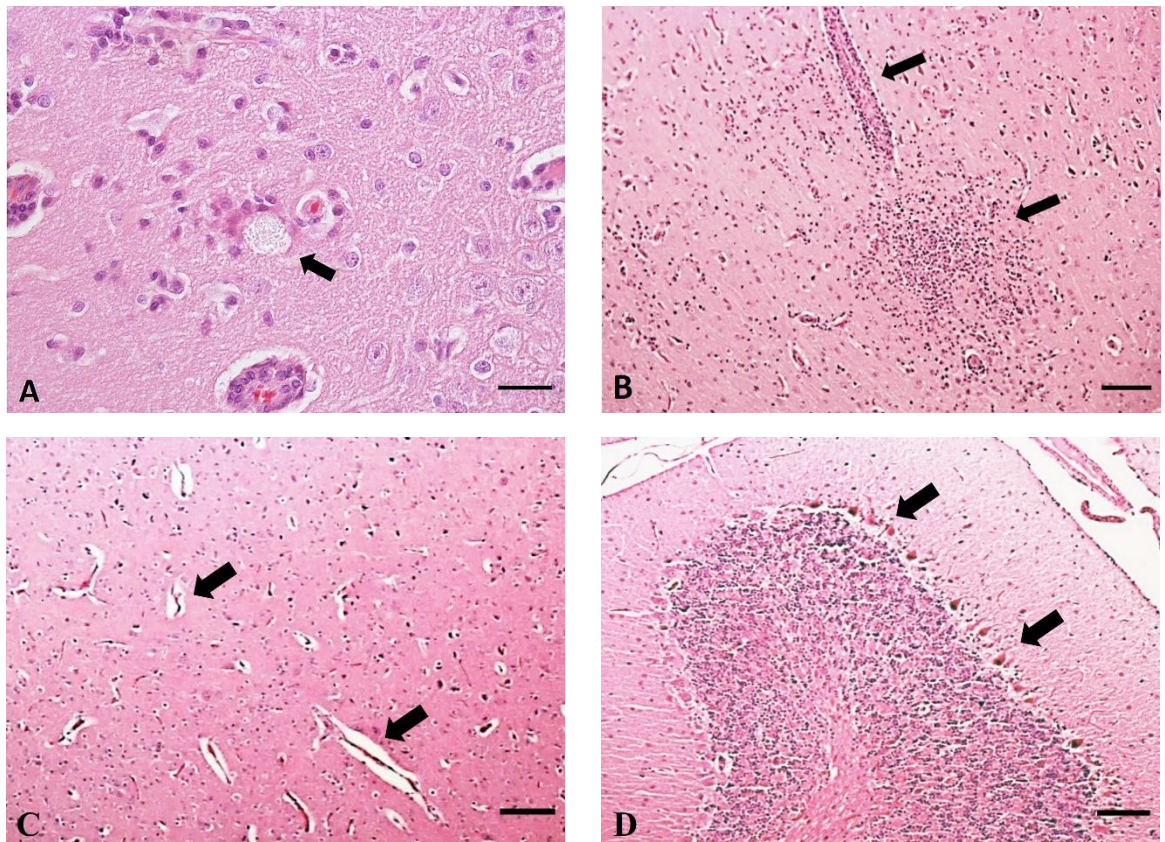
**Grupo B (15 días post infección).** Granulomas de *E. cuniculi* se detectaron en la corteza cerebral, núcleos basales, diencéfalo y mesencéfalo. Las regiones con granulomas fueron: 1) telencéfalo, en la corteza cerebral en su región frontal, occipital, lóbulo piriforme, área cingulada, núcleos basales como el cuerpo estriado, el hipocampo en las capas de células piramidales, tálamo en regiones de núcleos neuronales, 2) mesencéfalo, en los colículos rostral y caudal, tectum y tegmentum. 3) el rombencéfalo presentó alteraciones histopatológicas, pero no se observaron granulomas (Figura 10 B).

**Grupo C (30 días post infección).** Granulomas dispersos se identificaron en las regiones cerebrales mencionadas. Igualmente se observaron numerosas áreas de reacción glial, infiltrados linfocíticos perivasculares y quistes parasitarios (Figura 10 C). En los granulomas más severos se observaron centros necróticos, acompañados de quistes parasitarios adyacentes, así como reacción glial (Figura 10 B).

**Grupo D (45 días post infección).** Lesiones histopatológicas se observaron en la corteza cerebral. Las neuronas presentaron un cambio isquémico por sus cuerpos celulares hipercrómicos, angulados y retraídos, edema perivascular, congestión vascular, gliosis en sustancia gris y blanca y quistes de *E. cuniculi* sin respuesta inflamatoria adyacente (Figura 10 D).

**Tabla 2.** Número de animales que presentaron cambios histopatológicos en las diferentes regiones del cerebro en los grupos infectados por *Encephalitozoon cuniculi* en comparación con el grupo control.

| Cambios histopatológicos                                | Grupo control (dpi) |     |     | Infección con <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (dpi) |     |     |
|---|---------------------|-----|-----|---|-----|-----|
|   | 15                  | 30  | 45  | 15  | 30  | 45  |
| <b>Prosencéfalo</b>                                     |                     |     |     |   |     |     |
| Quistes de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>              | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 2/3 |
| Congestión vascular                                     | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 2/3 | 2/3 |
| Edema perivascular y perineural                         | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 3/3   | 0/3 | 3/3 |
| Infiltrados inflamatorios perivascuales                 | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 0/3 | 1/3 |
| Reacción glial  | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 3/3   | 0/3 | 3/3 |
| Cromatolisis central                                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 2/3 | 3/3 |
| Encefalitis moderada                                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 2/3 | 0/3 |
| Abundantes infiltrados perivascuales                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 0/3 |
| Numerosas áreas de reacción glial                       | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 3/3 |
| Necrosis neuronal                                       | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 3/3 |
| Encefalomiелitis granulomatosa multifocal no supurativa | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 0/3 |
| <b>Mesencéfalo</b>                                      |                     |     |     |   |     |     |
| Quistes de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>              | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 2/3 | 1/3 |
| Congestión vascular                                     | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 3/3 |
| Edema perivascular y perineural                         | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 3/3 |
| Infiltrados inflamatorios perivascuales                 | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 3/3   | 0/3 | 1/3 |
| Reacción glial  | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 0/3 | 3/3 |
| Cromatolisis central                                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 3/3   | 1/3 | 2/3 |
| Encefalitis moderada                                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 0/3 | 0/3 |
| Abundantes infiltrados perivascuales                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 0/3 |
| Numerosas áreas de reacción glial                       | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 3/3 |
| Necrosis neuronal                                       | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 3/3 |
| Encefalomiелitis granulomatosa multifocal no supurativa | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 0/3 |
| <b>Rombencéfalo</b>                                     |                     |     |     |   |     |     |
| Quistes de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>              | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 0/3   | 1/3 | 1/3 |
| Congestión vascular                                     | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 1/3 | 2/3 |
| Edema perivascular y perineural                         | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 3/3   | 0/3 | 3/3 |
| Infiltrados inflamatorios perivascuales                 | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 3/3   | 3/3 | 1/3 |
| Reacción glial  | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 0/3 | 3/3 |
| Cromatolisis central                                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 1/3 | 3/3 |
| Encefalitis moderada                                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 2/3 | 0/3 |
| Abundantes infiltrados perivascuales                    | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 2/3   | 3/3 | 0/3 |
| Numerosas áreas de reacción glial                       | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 3/3 |
| Necrosis neuronal                                       | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 3/3 | 3/3 |
| Encefalomiелitis granulomatosa multifocal no supurativa | 0/3                 | 0/3 | 0/3 | 1/3   | 2/3 | 0/3 |



**Figura 10. Cambios histopatológicos en los grupos experimentales. HE.** A. 15 días post infección. Mesencéfalo. Quiste de esporas y gliosis adyacente (flechas). B. 30 días post infección. Corteza cerebral. Granuloma adyacente a un infiltrado leucocitario y gliosis. C. 45 días post infección. Núcleos basales. Edema cerebral generalizado y gliosis (flechas). D. Cerebelo. Células de Purkinje con signos de cromatolisis. A. Barra = 40  $\mu\text{m}$ . B, C y D. Barra = 100  $\mu\text{m}$ .

#### **4.1.2. Corteza cerebral:**

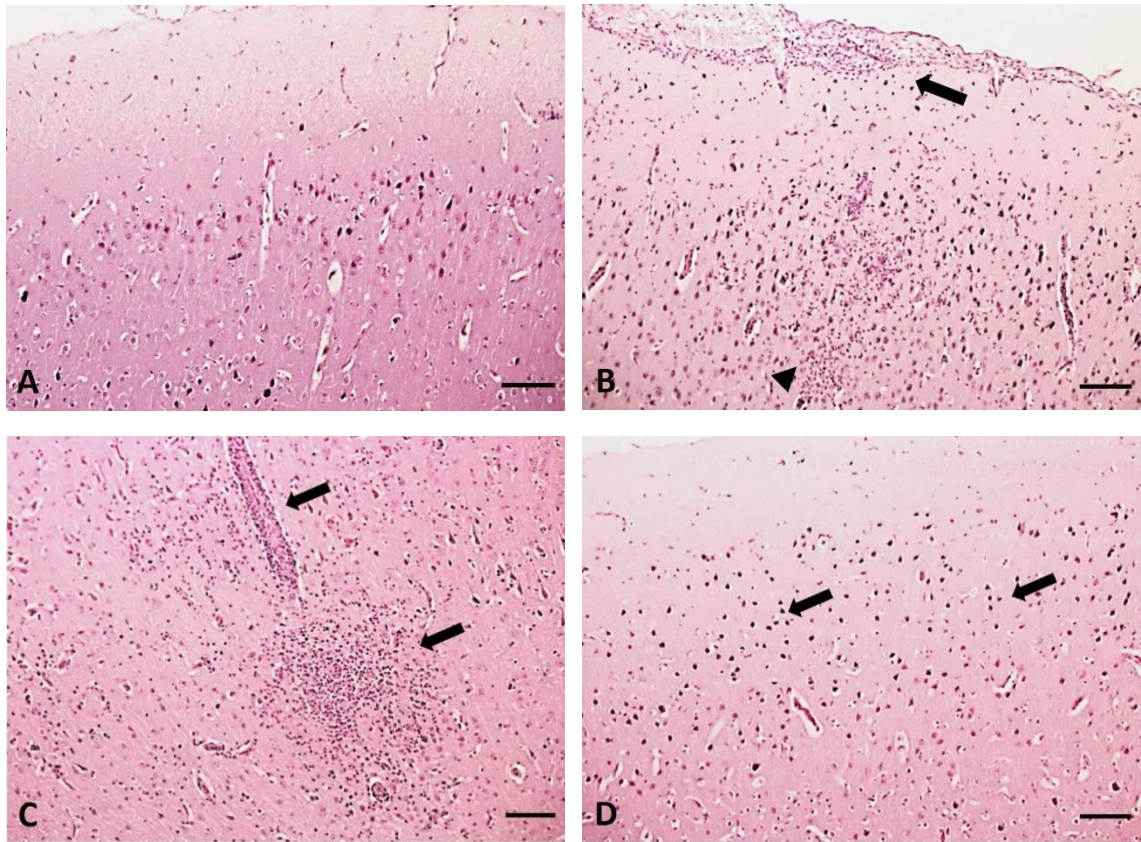
Los cambios en los diferentes días de post infección fueron a los siguientes:

**15 días post infección.** Se observó inflamación de las leptomeninges, edema perivascular y perineural, degeneración neuronal, infiltrados mononucleares perivascuales, gliosis y granulomas (Figura 11 B). También se encontraron quistes de esporas sin respuesta inflamatoria asociada.

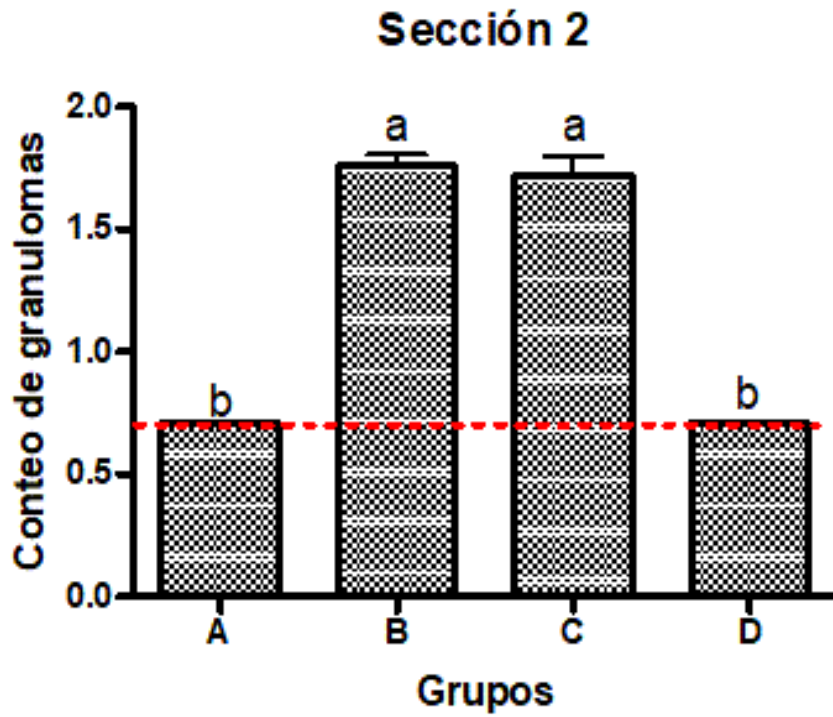
**30 días post infección.** Las lesiones fueron más evidentes, observándose una meningoencefalitis granulomatosa severa, con numerosas áreas de reacción glial, abundantes áreas de infiltrados mononucleares perivascuales y granulomas de hasta 300  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 11 C).

**45 días post infección.** Predominaron las neuronas hipercrómicas en las capas corticales, el edema perivascular y perineural, además de congestión vascular (Figura 11 D).

El conteo de granulomas en la sección coronal 2, mostró diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ) entre los conejos de los grupos de 15 y 30 d de infección respecto a los demás grupos experimentales (Figura 12).



**Figura 11. Corteza cerebral, sección coronal 2.** A. Grupo control sin cambios histológicos. B. 15 días post infección. Meningitis en la piamadre (flecha) y granulomas (cabeza de flecha). C. 30 días post infección. Severas lesiones granulomatosas e infiltrados perivasculares (flechas). D. 45 días post infección. Neuronas picnóticas (flechas). HE. 20X. Barra =100  $\mu$ m.



**Figura 12. Diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre la media del número de granulomas en la sección coronal 2 de los grupos experimentales.** Las medias de los grupos de 15 y 30 días post infección son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) con el análisis Kruskal-Wallis. La línea punteada señala el valor de la media del grupo control.

#### **4.1.3. Hipocampo:**

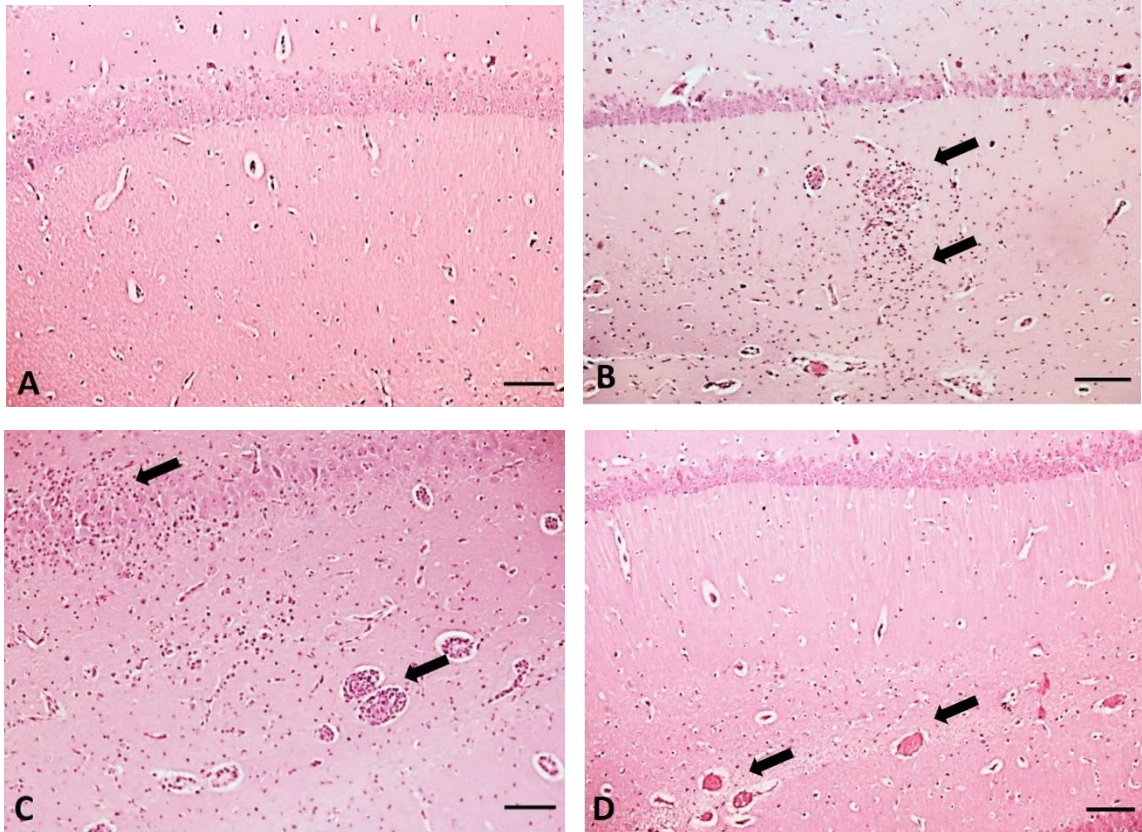
Los cambios presentes en los días de post infección fueron los siguientes, a los:

**15 días post infección.** Se observó edema perivascular, congestión vascular, neuronas picnóticas, ligera gliosis, infiltrados perivasculares, y granulomas (Figura 13 B).

**30 días de infección.** Se observaron numerosas áreas de reacción glial, incremento de edema perivascular y perineural y los granulomas se localizaron en la región de neuronas piramidales (Figura 13 C).

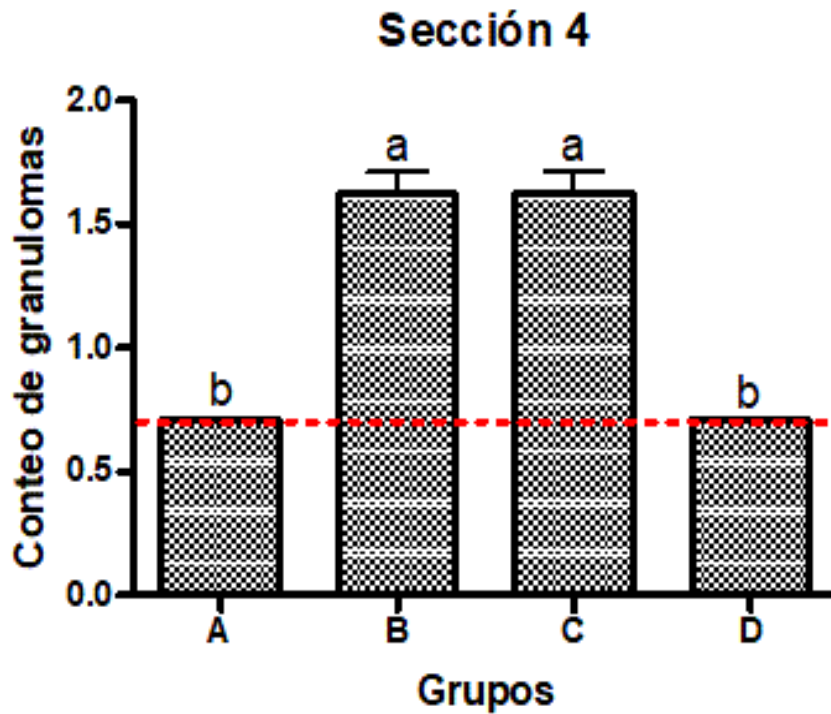
**45 días post infección.** Se observó congestión vascular, edema generalizado y aumento de células neuronales picnóticas (Figura 13 D).

El conteo de granulomas en la sección coronal 4, mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los conejos de los grupos de 15 y 30 d de infección respecto a los demás grupos experimentales (Figura 14).



**Figura 13. Hipocampo, sección coronal 4.** A. Grupo control sin cambios histológicos. B. 15 días post infección. Gliosis y lesiones granulomatosas (flechas). C. 30 días post infección. Severas lesiones granulomatosas e infiltrados mononucleares (flechas). D. 45 días post infección. Neuronas hipercrómicas con disminución del tamaño (flechas). HE. 20X. Barra =100  $\mu$ m.





**Figura 14. Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre la media del número de granulomas en la sección coronal 4, de los grupos experimentales.** Las medias de los grupos de 15 y 30 d post infección son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) al grupo control y de 45 d post infección, indicando que presentan el mismo número de granulomas en esta sección de acuerdo al análisis de Kruskal-Wallis. La línea punteada señala el valor de la media del grupo control.

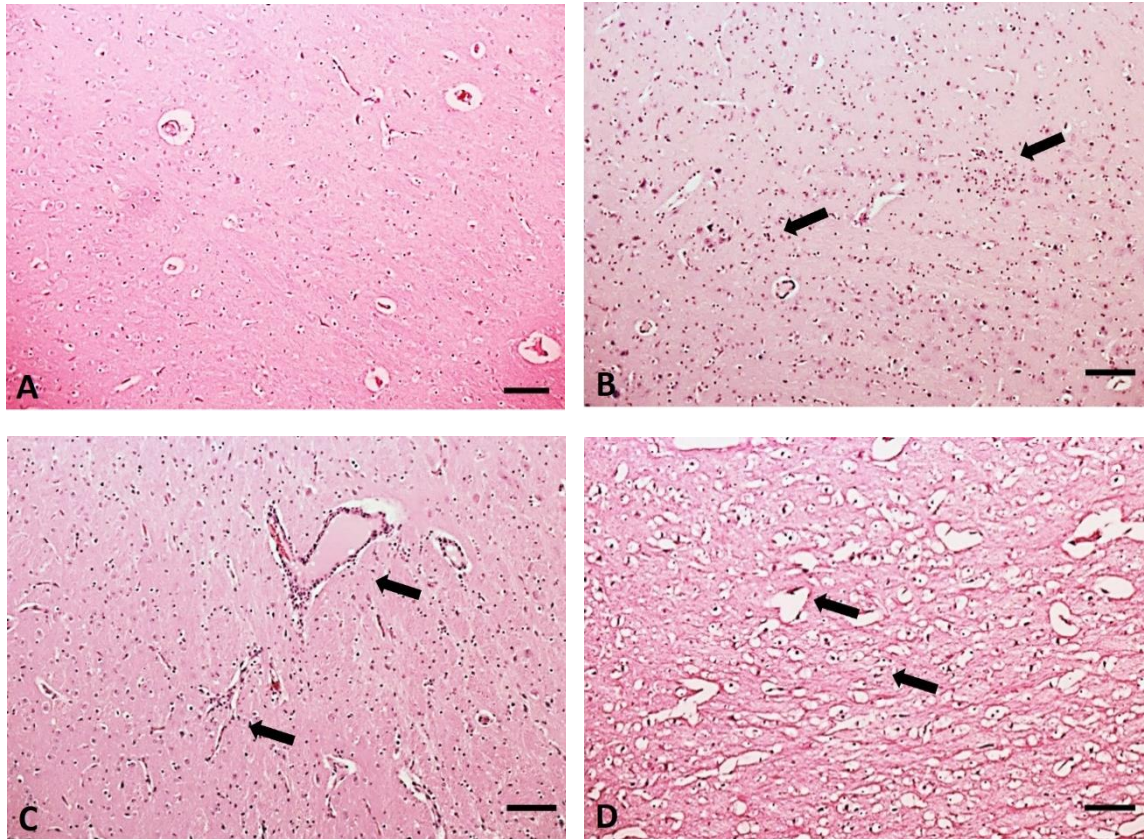
#### **4.1.4. Cuerpo estriado:**

Los cambios que se presentaron principalmente en los diferentes días de post infección fueron a los:

**15 días post infección.** Gliosis se observó, discreto edema perivascular y perineural, neuronas hipercrómicas, infiltrados mononucleares perivascuales, y ausencia de granulomas (Figura 15 B).

**30 días post infección.** Persistió la gliosis, abundantes áreas de infiltrados perivascuales y mayor grado de lesión vascular (Figura 15 C).

**45 días post infección.** Aumentó el número de neuronas hipercrómicas y edema perivascular y perineural (Figura 15 D).



**Figura 15. Núcleos basales, sección coronal 4.** A. Grupo control. B. 15 días post infección. Ligera gliosis, edema cerebral y neuronas hiperocrómicas (flechas). C. 30 días post infección. Discretos infiltrados mononucleares, edema perivascular (flechas). D. 45 días post infección. Presenta edema cerebral, necrosis neuronal desorganización del neuropilo y desmielinización (flechas). HE. 20X. Barra =100  $\mu$ m.

#### 4.1.5. Mesencéfalo:

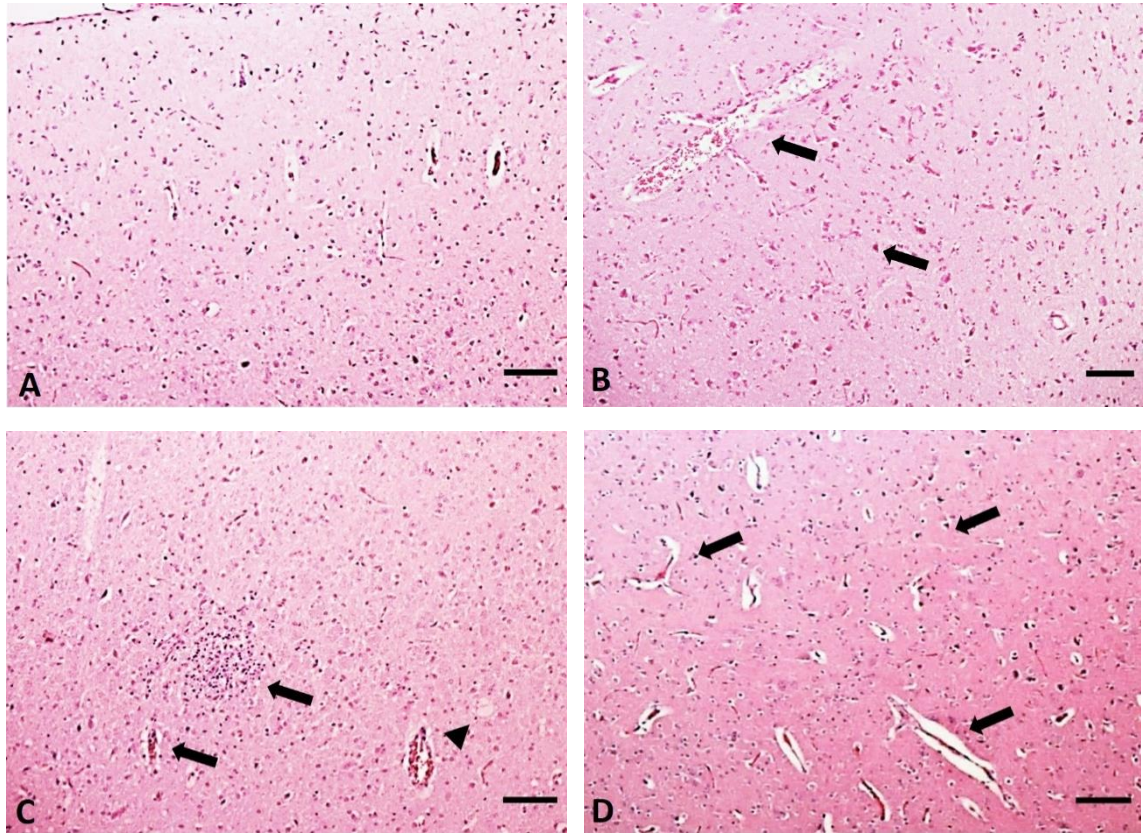
Los cambios histológicos presentados fueron, a los:

**15 días post infección.** Se observó gliosis, discreto edema perivascular y perineural, necrosis neuronal, discreto infiltrado mononuclear perivascular y ausencia de granulomas en la región dorsal del mesencéfalo (Figura 16 B), en otras regiones del mesencéfalo se presentan granulomas como la región ventral.

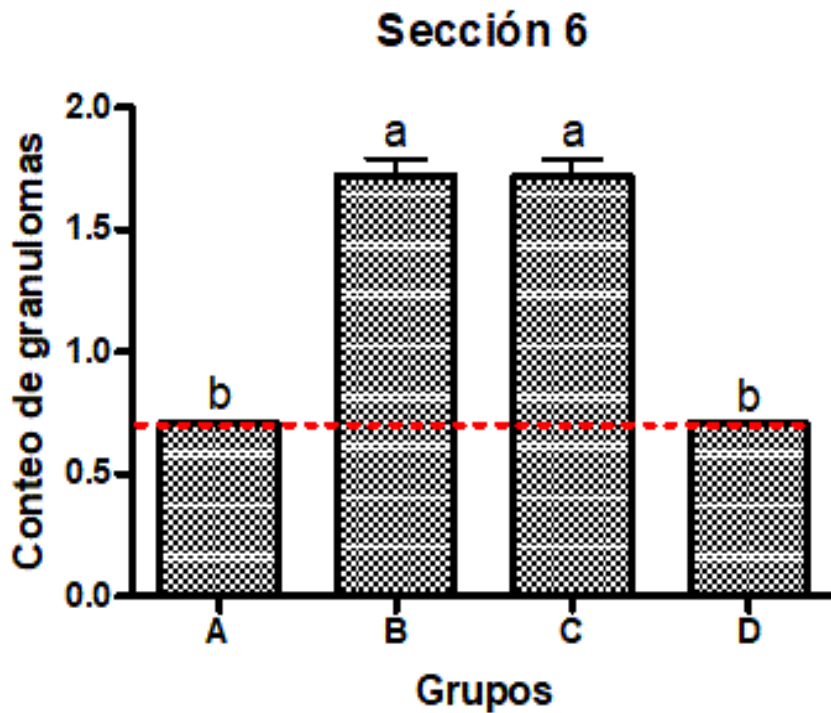
**30 días post infección.** Severa gliosis con áreas de infiltrados perivascuales, lesiones granulomatosas y congestión vascular; también se presentaron quistes de esporas en ausencia de inflamación (Figura 16 C).

**45 días post infección.** Las neuronas presentaron diferentes grados de necrosis y aumento en el número de neuronas con somas retraídos, condensación picnótica del núcleo y nucleolo, picnóticos, sin distinción de la sustancia de Nissl en el citoplasma. Persistió el edema perivascular y perineural, la congestión vascular, y se presentaron quistes de *E. cuniculi* con ausencia de inflamación (Figura 16 D).

En el análisis estadístico del conteo de granulomas en la sección coronal 6, se mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los conejos de los grupos de 15 y 30 días post infección en comparación a los demás grupos experimentales (Figura 17).



**Figura 16. Mesencéfalo, sección coronal 6.** A. Grupo control. No se observaron lesiones granulomatosas. B. 15 días post infección. Gliosis, infiltrados perivasculares y neuronas en degeneración (flechas). C. 30 días post infección. Severa lesión granulomatosa, infiltrados mononucleares (flechas) y quistes parasitarios (cabeza de flecha). D) 45 días post infección. Edema cerebral y necrosis neuronal (flechas). HE. 20X. Barra =100  $\mu$ m.



**Figura 17. Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre la media del número de granulomas en la sección coronal 6, de los grupos experimentales.** Las medias de los grupos de 15 y 30 días post infección difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) con el grupo control y de 45 días post infección indicando que presentan el mismo número de granulomas en esta sección con la prueba de Kruskal-Wallis. La línea punteada señala el valor de la media del grupo control.

#### **4.1.6. Cerebelo:**

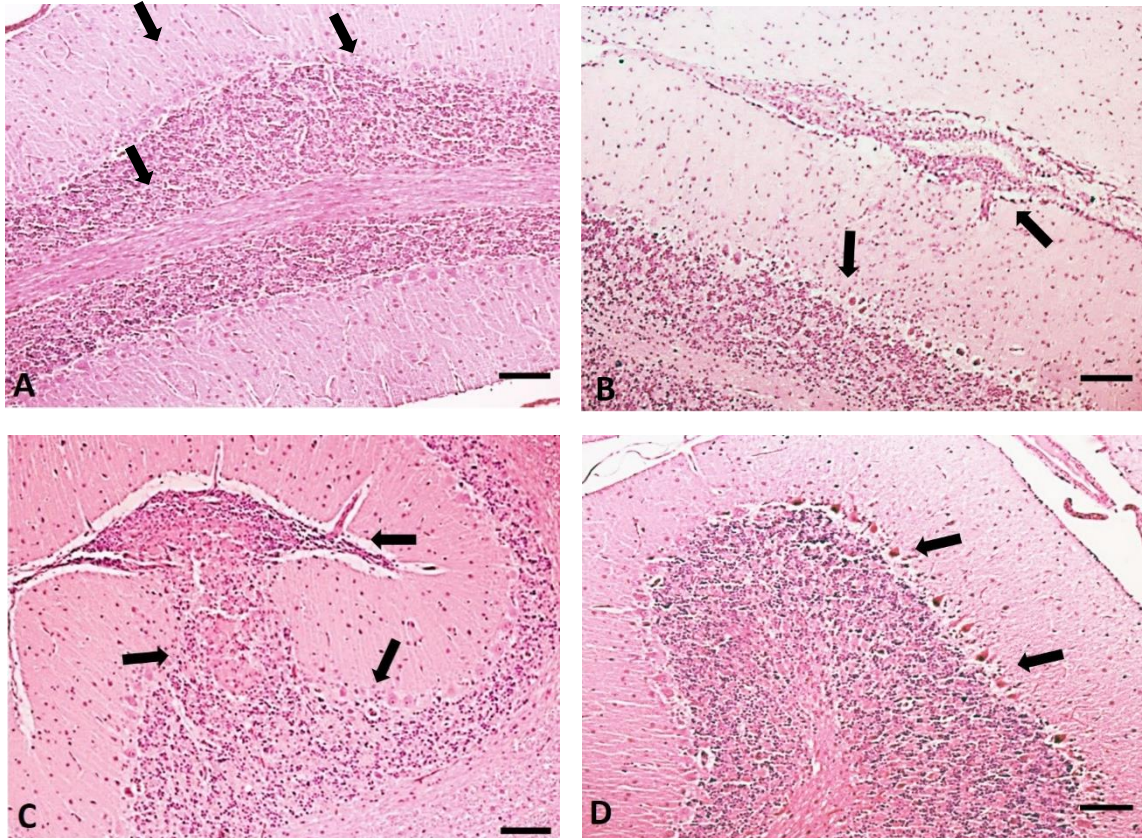
Los cambios histológicos presentados a los diferentes días de post infección fueron los siguientes:

**15 días post infección.** Gliosis se observó en la capa molecular del cerebelo e infiltrados de células mononucleares en la piamadre, también hubo alteración de las células de Purkinje por presentar diferentes grados de necrosis tales como neuronas picnóticas, predominio de neuronas hipercrómicas con disminución del tamaño del soma, o gliosis de Bergmann (Figura 18 B).

**30 días post infección.** Lesiones más graves involucrando granulomas se produjeron en la capa molecular de la corteza cerebelosa, así como una extensión leptomeníngea en las células de Purkinje no se observaron cambios (Figura 18 C).

**45 días post infección.** Las neuronas presentaron cambios como edema perivascular y perineural, pero no se observaron granulomas en la capa molecular (Figura 18 D).

El conteo de granulomas en la sección coronal 8, presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el número de granulomas de los animales de 30 días de infección con respecto a los demás grupos experimentales (Figura 20).



**Figura 18. Cerebelo, sección coronal 8.** A. Grupo control. Capa molecular, células de Purkinje y capa granulosa (flechas). B. 15 días post infección. Meningitis en la piamadre, células de Purkinje picnóticas y gliosis (flechas). C. 30 días post infección. Severas meningitis en piamadre y lesiones granulomatosas que abarcan la capa molecular y células de Purkinje (flechas). D. 45 días post infección. Diferentes estadios de necrosis en células de Purkinje (flechas). HE. 20X. Barra =100  $\mu$ m.



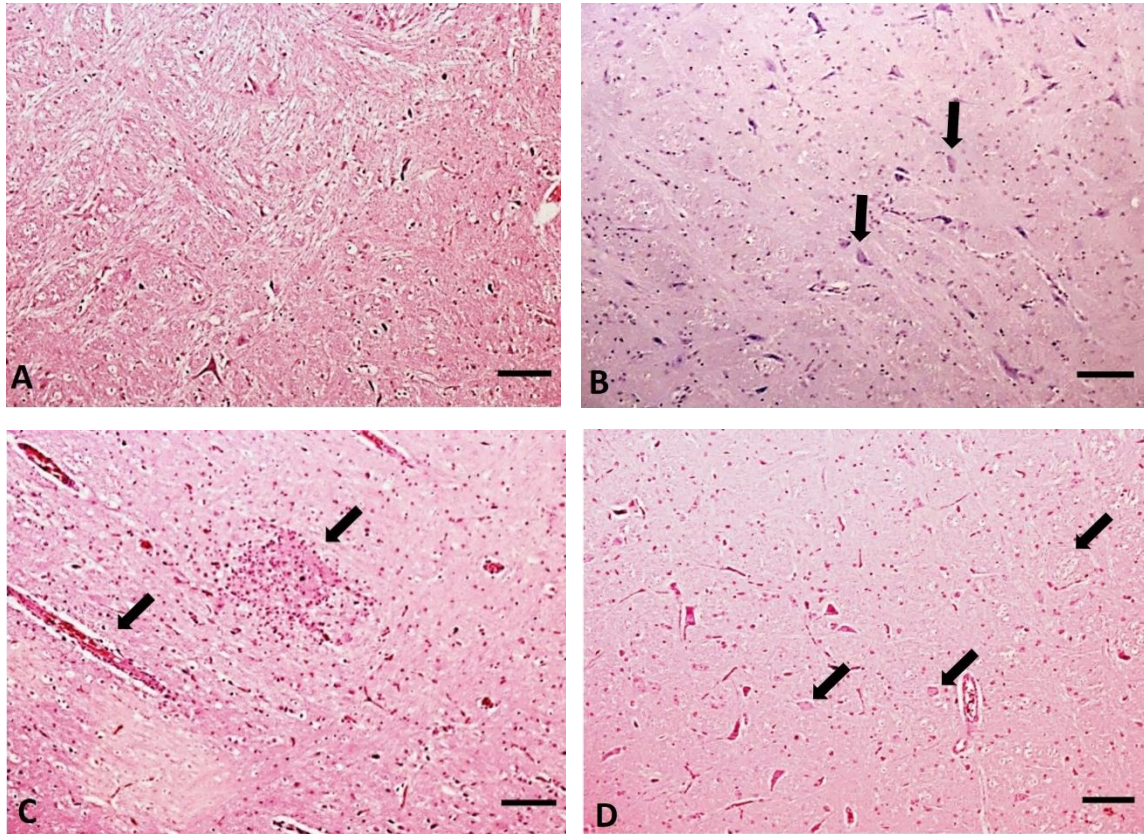
#### **4.1.7. Protuberancia:**

Los cambios histológicos en la protuberancia fueron los siguientes:

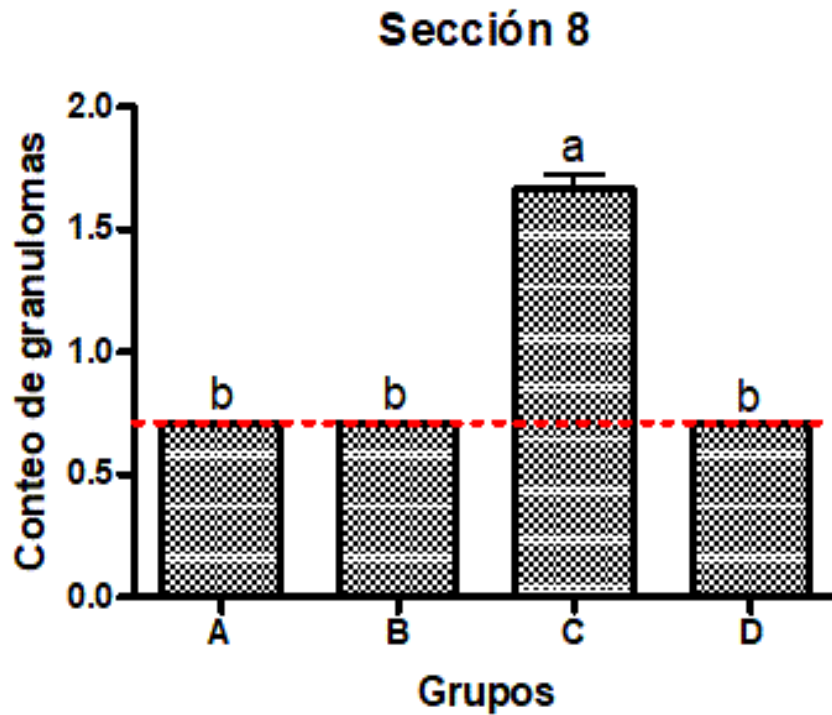
**15 días post infección.** Cromatolisis central se observó por la sustancia de Nissl hacia la periferia (Figura 19 B).

**30 días post infección.** Abundantes áreas de infiltrados perivasculares, congestión vascular y granulomas (Figura 19 C). Numerosas áreas de gliosis y disminución de células neuronales. En este tiempo de infección predominaban espacios en los tractos de axones.

**45 días post infección.** Las neuronas presentaron cromatolisis con edema perivascular y perineural, pero no se observaron granulomas en esta región (Figura 19 D).



**Figura 19. Protuberancia, sección coronal 8.** A. Grupo control sin alteraciones histológicas. B. 15 días post infección. Neuronas con cromatolisis central. C. 30 días post infección. Severas lesiones granulomatosas, congestión vascular e infiltrados mononucleares (flechas). D. 45 días post infección. Neuronas con cromatolisis central y edema cerebral (flechas). HE. 20X. Barra =100  $\mu$ m.

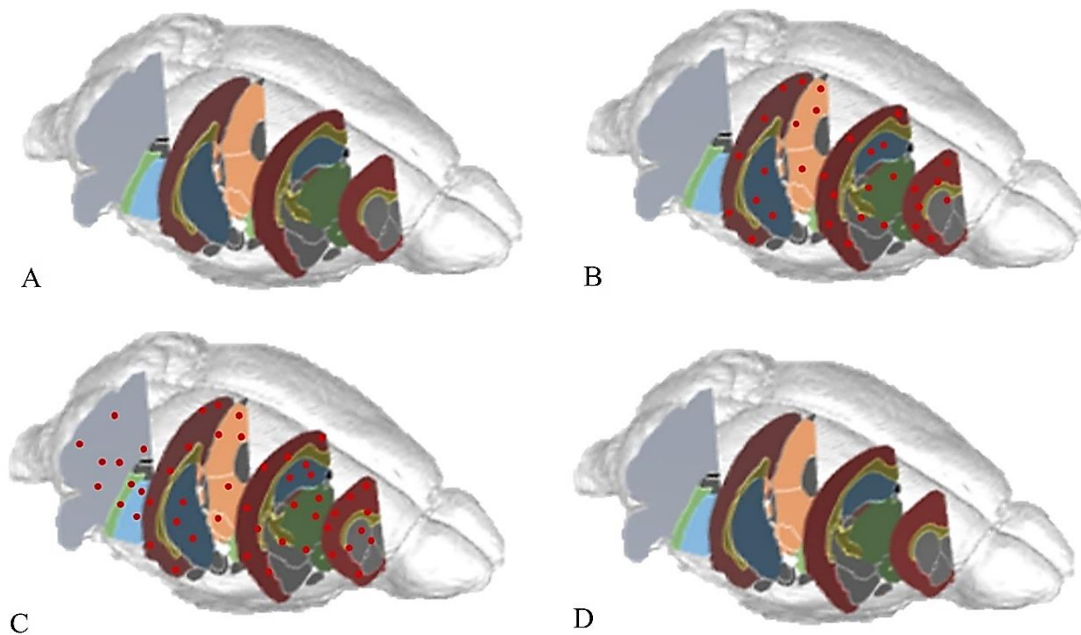


**Figura 20. Diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre la media del número de granulomas en la sección coronal 8 de los grupos experimentales. La media del grupo de 30 días post infección difiere significativamente ( $p < 0.05$ ) con los demás grupos experimentales con el análisis Kruskal-Wallis. La línea punteada señala el valor de la media del grupo control.**

#### **4.2. Distribución de los granulomas en encéfalo de conejo.**

Para determinar si los granulomas causados por *E. cuniculi* muestran un tropismo hacia ciertas regiones cerebrales, se evaluó la localización de los granulomas en el encéfalo de los animales infectados. Se realizó el conteo de granulomas en cortes seriados de los grupos experimentales y se determinó que, en los grupos, 15 y 30 días post infección éstos se localizan principalmente en el prosencéfalo. Aquí éstos se desarrollaron próximo a los vasos sanguíneos o en regiones donde predominan grupos de neuronas, como las de las capas corticales, las piramidales del hipocampo y las de los núcleos basales; en el mesencéfalo se ubican adyacentes a los capilares o en núcleos de neuronas y en el rombencéfalo.

Otros de los lugares de localización de los granulomas son en la capa molecular del cerebelo, originándose de las infiltraciones de células mononucleares por muerte de células de Purkinje. Estos se ubican en núcleos de neuronas de pares craneales o adyacente a capilares en la protuberancia y médula oblongada. Con lo anterior, un modelo en tercera dimensión se realizó de la distribución de granulomas en encéfalo (Figura 21).



**Figura 21. Distribución de granulomas cerebrales en un modelo en tercera dimensión. Los puntos rojos indican la ubicación de granulomas. A. Grupo control sin granulomas. B. 15 días post infección. C. 30 días post infección. D. 45 días post infección.**

■ Corteza cerebral. ■ Cuerpo calloso. ■ Núcleos basales. ■ Tálamo-Hipotálamo. ■ Hipocampo. ■ Mesencéfalo. ■ Protuberancia. ■ Médula. ■ Cerebelo. ■ Ventrículos.

### 4.3. Histoquímica

#### 4.3.1. Tinción de Nissl:

El violeta de cresilo es un colorante acidófilo que tiñe el núcleo celular y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl), ribosomas libres y pequeños núcleos eucromáticos de las células gliales. Utilizamos esta tinción para la evaluación del daño neuronal en la corteza cerebral en conejos con encefalitozoonosis experimental.

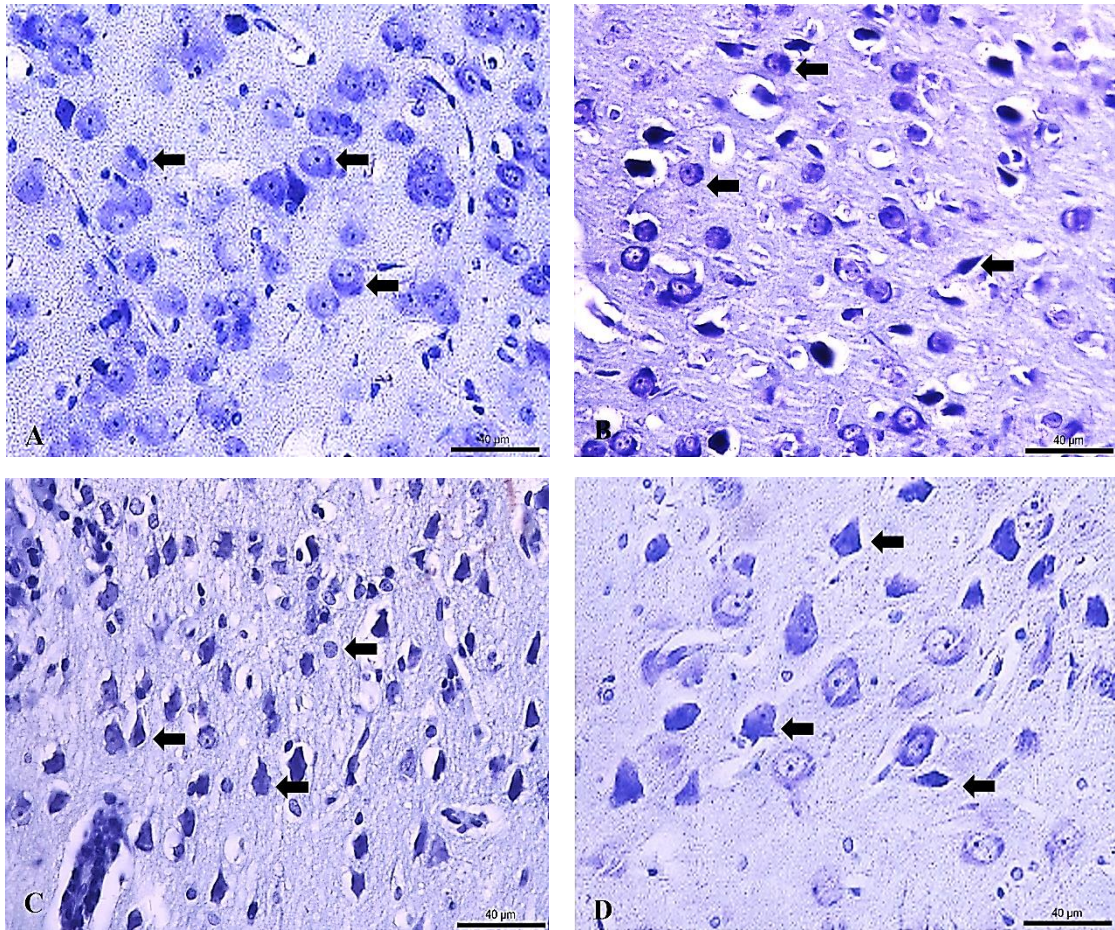
El grupo control presentó una histología normal de la corteza cerebral que incluía neuronas redondeadas con escaso citoplasma, sustancia de Nissl, núcleos eucromáticos con nucleolos prominentes y núcleos más pequeños correspondientes a células gliales. (Figura 22 A).

En los grupos post infectados a diferentes tiempos, se encontró lo siguiente: **15 días post infección.** Las meninges presentaron moderados grupos de células infiltrantes y discretos infiltrados en el parénquima. Se produjo daño neuronal en la corteza cerebral ya que las neuronas presentaron cambios morfológicos como desplazamiento de la sustancia de Nissl hacia la periferia del soma (cromatolisis), retracción del soma, condensación de núcleos, los cuerpos de Nissl de la corteza estaban oscuros y los somas de algunas neuronas se observaron muy teñidos, encogidos o completamente perdidos, edema perineural, además, el neurópilo presentó degeneración y edema en el parénquima y discreta reacción glial. La sustancia blanca presentaba ligeros infiltrados mononucleares en axones en degeneración. (Figura 22 B).

**30 días post infección.** Las meninges presentaron una mayor severidad de las lesiones en este tiempo de infección que en los demás grupos experimentales por la grave meningitis. La mayoría de las neuronas dañadas presentaban retracción del soma, núcleos y nucleolos condensados, no se identificó la sustancia de Nissl en la mayoría de las neuronas. El parénquima cerebral presentó gliosis, hipertrofia de núcleos gliales, aumento de células mononucleares en el parénquima cerebral. En la sustancia blanca cortical los axones presentaron lesiones granulomatosas y severos infiltrados mononucleares (Figura 22 C).

**45 días post infección.** Las meninges no presentaron infiltrados mononucleares. En la corteza cerebral disminuyó la densidad neuronal y persistieron neuronas en degeneración,

algunas con somas retraídos, pérdida de la integridad de la membrana celular, desplazamiento de la sustancia de Nissl hacia la periferia, degeneración del neuropilo y núcleos de células gliales hipertrofiados. No se observaron infiltrados mononucleares en sustancia blanca, ni granulomas (Figura 22 D).



**Figura 22. Corteza Cerebral. Tinción de Nissl.** A. Grupo control sin cambios histológicos. B. 15 días post infección. Neuronas con desplazamiento de sustancia de Nissl y picnoticas (flechas). C. 30 días post infección. Predominan neuronas con somas retraídos y células mononucleares (flechas). D. 45 días post infección. Persiste el daño neuronal por presencia de neuronas con desplazamiento de sustancia de Nissl hacia la periferia. 40X.



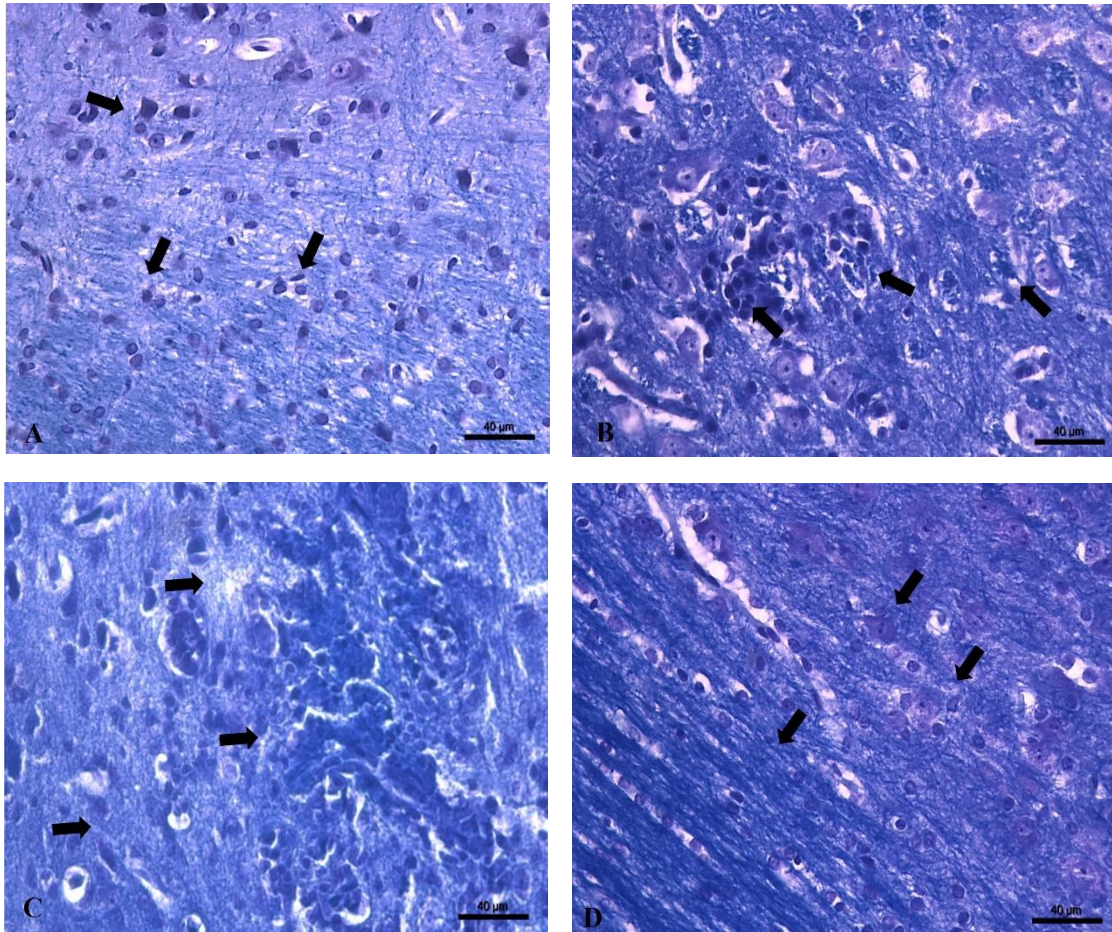
#### **4.3.2. Tinción de Klüver-Barrera:**

Esta tinción se utilizó para la evaluación de la corteza cerebral, por permitir analizar el aspecto de la coloración de la mielina y contrastar los núcleos de células neuronales y gliales. Esta técnica permitió la observación de somas neuronales y células gliales con la identificación de núcleos de las células gliales, núcleo, nucleolo y sustancia de Nissl de neuronas y la observación de los haces de axones en el grupo control que presentó tinción de mielina uniforme y un neurópilo organizado (Figura 23 A).

**15 días post infección.** La región de la sustancia blanca y delimitación de la sustancia gris presentó infiltrados mononucleares, también el neurópilo presentó desorganización y las neuronas presentaron desplazamiento de la sustancia de Nissl hacia la periferia. Los granulomas en el parénquima cerebral se comportan como lesiones focales que provocan la pérdida de células neuronales y gliales en regiones específicas (Figura 23 B).

**30 días post infección.** Zonas de desmielinización se observaron en la periferia de los granulomas por la identificación de zonas con palidez en la región que delimita la corteza cerebral y sustancia blanca. En este día de infección la desorganización de los haces de axones en la sustancia blanca es más severa y los núcleos basales granulomas con infiltrados mononucleares (Figura 23 C).

**45 días post infección.** Haces de axones se observaron en la sustancia blanca con tinción positiva para mielina, el neurópilo se observó organizado, pero hay signos de inflamación por el aumento de núcleos gliales, principalmente en la sustancia blanca de la región frontal y núcleos basales o adyacentes de vasos sanguíneos. A diferencia de los grupos de 15 y 30 días post infección no se observaron infiltrados mononucleares (Figura 23 D).



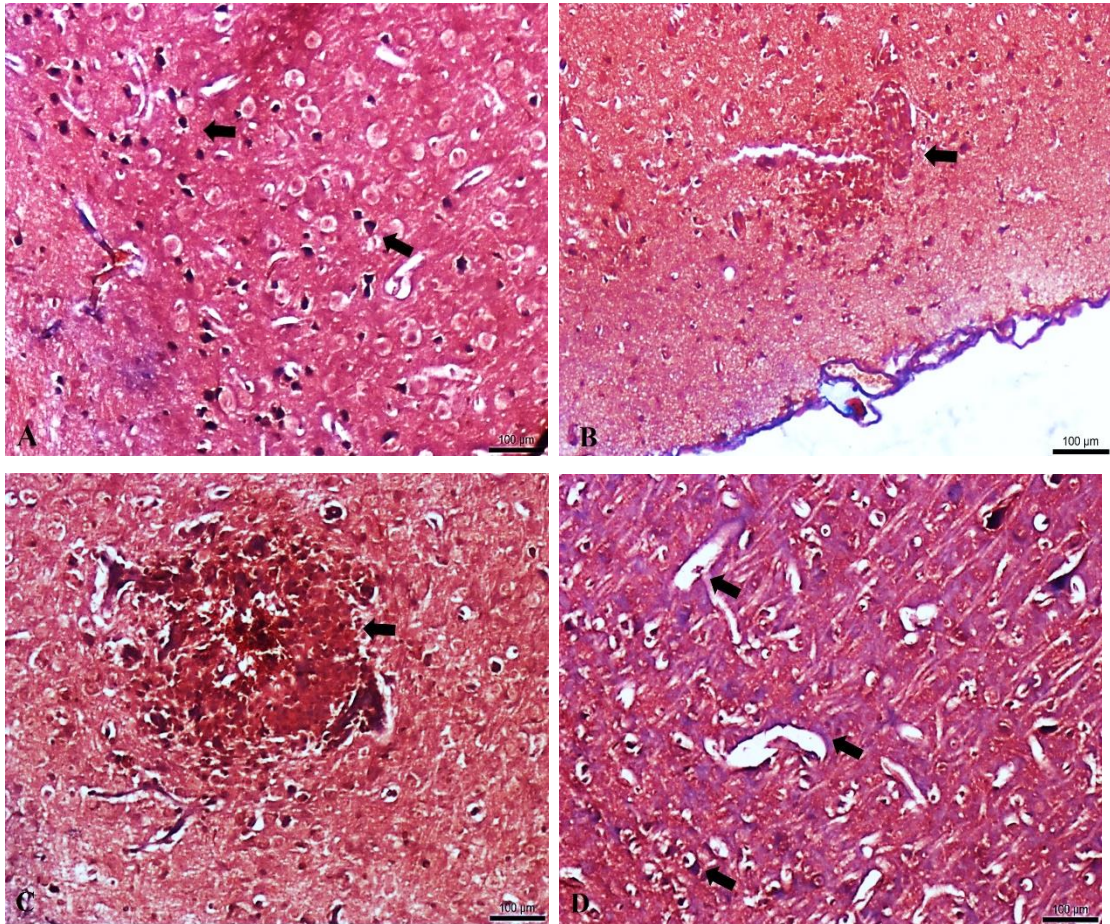
**Figura 23. Corteza Cerebral. Tinción de Kliver-Barrera.** A. Grupo control sin alteraciones morfológicas. Neurópilo organizado y tinción de sustancia blanca con azul rápido de Luxol (flechas). B. 15 días post infección. Infiltración de células mononucleares en sustancia blanca (flechas). C. 30 días post infección. Granulomas, zonas pálidas sin tinción de mielina y neurópilo desorganizado (flechas). D. 45 días post infección. Se presentan algunas neuronas sanas, espacios sin tinción de mielina, núcleos de células gliales hipertrofiados (flechas). 40X. Barra= 40 µm.

### **4.3.3. Tinción con Tricrómico de Massón:**

Después de localizar los granulomas mediante la tinción de hematoxilina y eosina se analizaron las muestras de los grupos experimentales con la tinción de tricrómico de Masson, para descartar o identificar el tejido conectivo en el granuloma o en el parénquima cerebral adyacente. El grupo control no reveló tejido conectivo en el parénquima cerebral (Figura 24 A).

**15 y 30 días post infección.** Las muestras de corteza cerebral que presentaron meningitis no demostraron colágeno, a diferencia del grupo control presentaron infiltrados leucocitarios, además, observamos regiones corticales sin meningitis y granulomas intraparenquimatosos. Algunos granulomas se formaron en los vasos sanguíneos que ingresan al parénquima cerebral provenientes de las meninges. También esta tinción demostró infiltración directa y disrupción del colágeno en las paredes vasculares de las arteriolas por la infiltración leucocitaria dentro del parénquima cerebral. No se observó tejido conectivo o fibrosis en los granulomas de estos dos grupos experimentales (Figura 24 B y C).

**45 días post infección.** Las meninges de la corteza cerebral no presentaron infiltrados leucocitarios, ni los vasos sanguíneos del parénquima cerebral; sin embargo, se observó colágeno en el parénquima cerebral y al compararse con el grupo control este aumento coincide en regiones cerebrales donde los grupos de 15 y 30 días post infección presentaron granulomas (Figura 24 D).



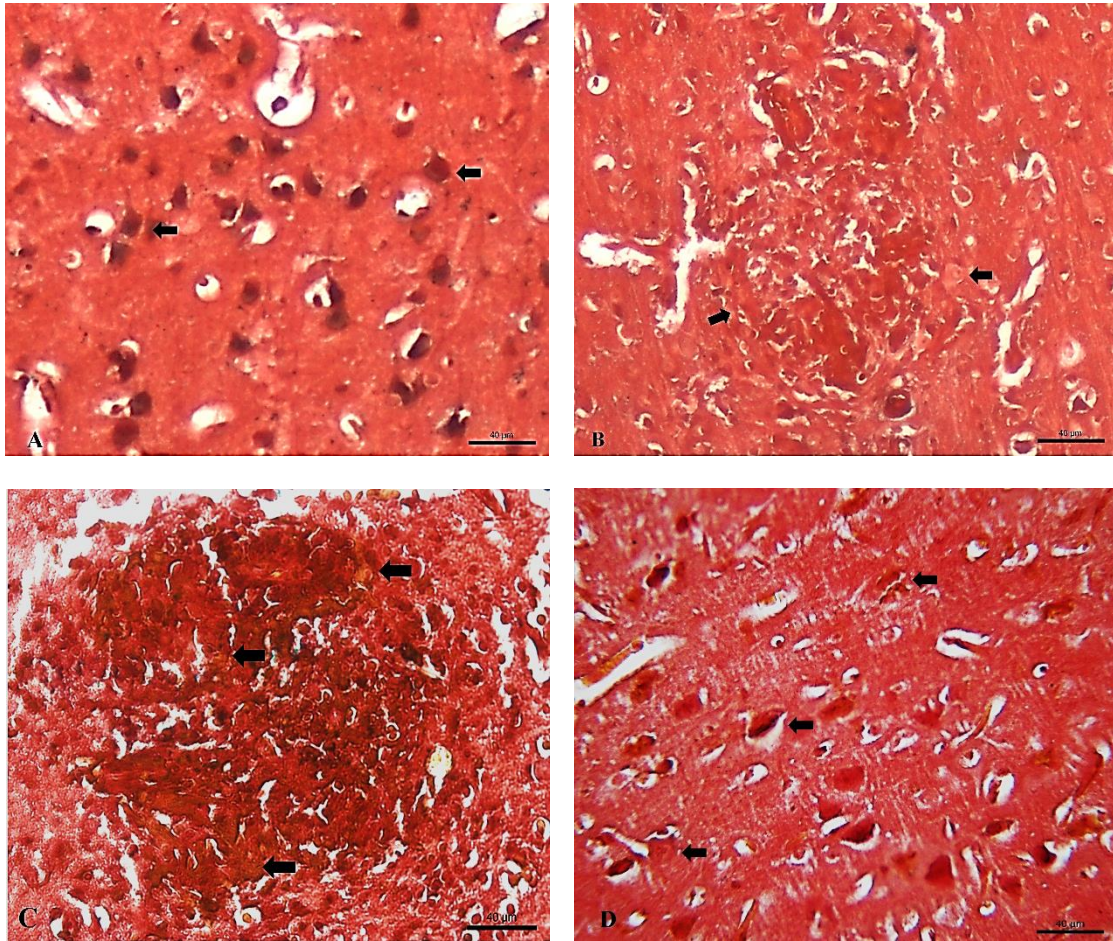
**Figura 24. Corteza Cerebral. Tricrómico de Massón.** A. Grupo control sin daño. Neuronas con tinción nuclear positiva (flechas). B. 15 días post infección. Granuloma sin presencia de tejido conectivo adyacente con un infiltrado perivascular (flecha). C. 30 días post infección. Granuloma y ausencia de capsula fibrosa (flecha). D. 45 días post infección. Edema cerebral generalizado y evidencia de colágeno en parénquima cerebral (flechas). 20X. Barra= 100 µm.

#### **4.3.4. Tinción de Pentacrómico de Movat:**

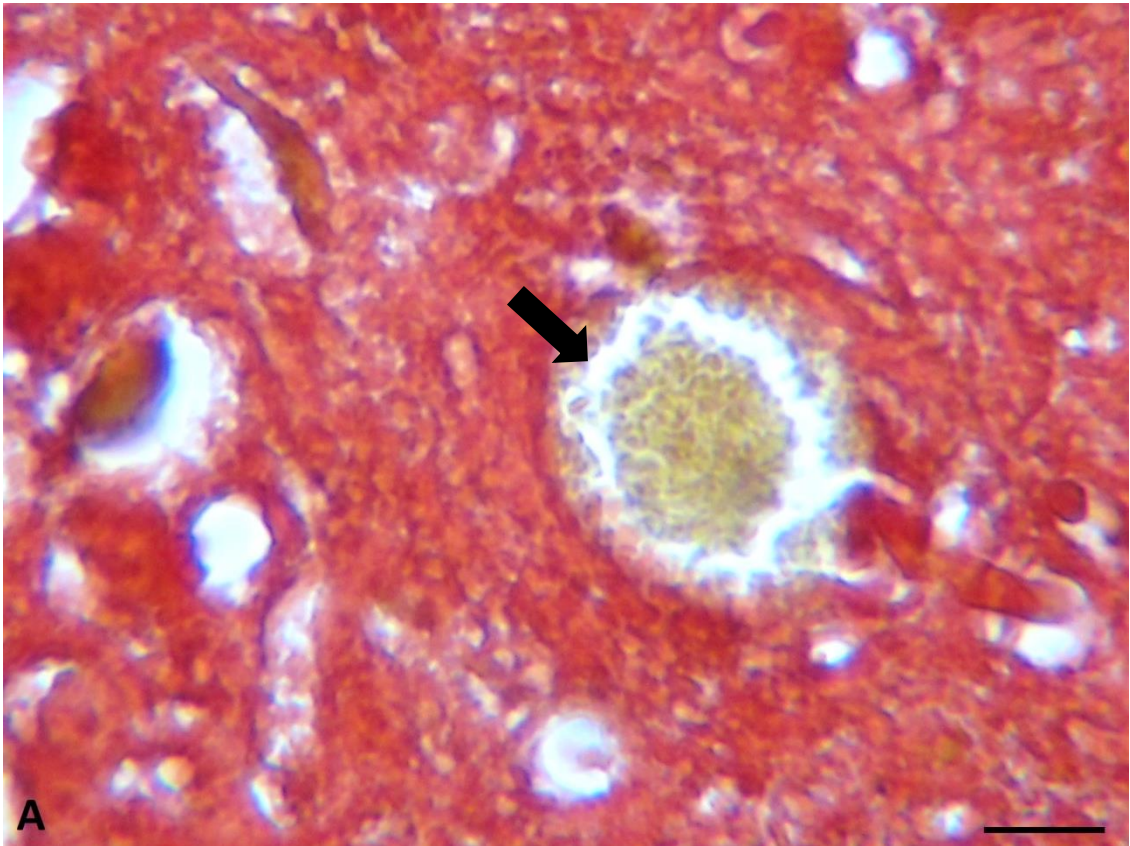
La tinción de Pentacrómico de Movat identifica el núcleo, citoplasma, regiones fibrinoides y una variedad de componentes de la matriz extracelular como el colágeno, elastina y glucosaminoglicanos carboxilados o sulfatados. El grupo control presentó tinción normal de neuronas.

**15 y 30 días post infección.** Esta tinción confirmó la ausencia de una cápsula fibrosa en los granulomas cerebrales, se descartaron componentes de matriz extracelular en la periferia del granuloma y del parénquima adyacente (Figura 25 B y C). Cabe recalcar que, esta tinción permitió la identificación de *E. cuniculi* de un color amarillo brillante, en la corteza cerebral las zonas adyacentes de los granulomas presentaron pérdida de tinción por la necrosis neuronal (Figura 25).

**45 días post infección.** Una marcada disminución se observó de la densidad de las células neuronales, algunas presentaron retracción del soma, núcleos contraídos y densos, persistió el edema perivascular y perineural en el parénquima, pero no se observaron granulomas ni componentes de matriz extracelular. Las regiones analizadas demostraron la alteración del neurópilo y se presentó pérdida de tinción por la necrosis neuronal (Figura 25 D).



**Figura 25. Corteza Cerebral. Pentacrómico de Movat.** A. Grupo control sin daño. Neuronas piramidales (flechas). B y C. 15 y 30 días post infección. Granulomas cerebrales con ausencia de componentes de matriz extracelular (flechas). D. 45 días post infección. Edema cerebral generalizado y necrosis neuronal (flechas). 40X. Barra= 40 µm.

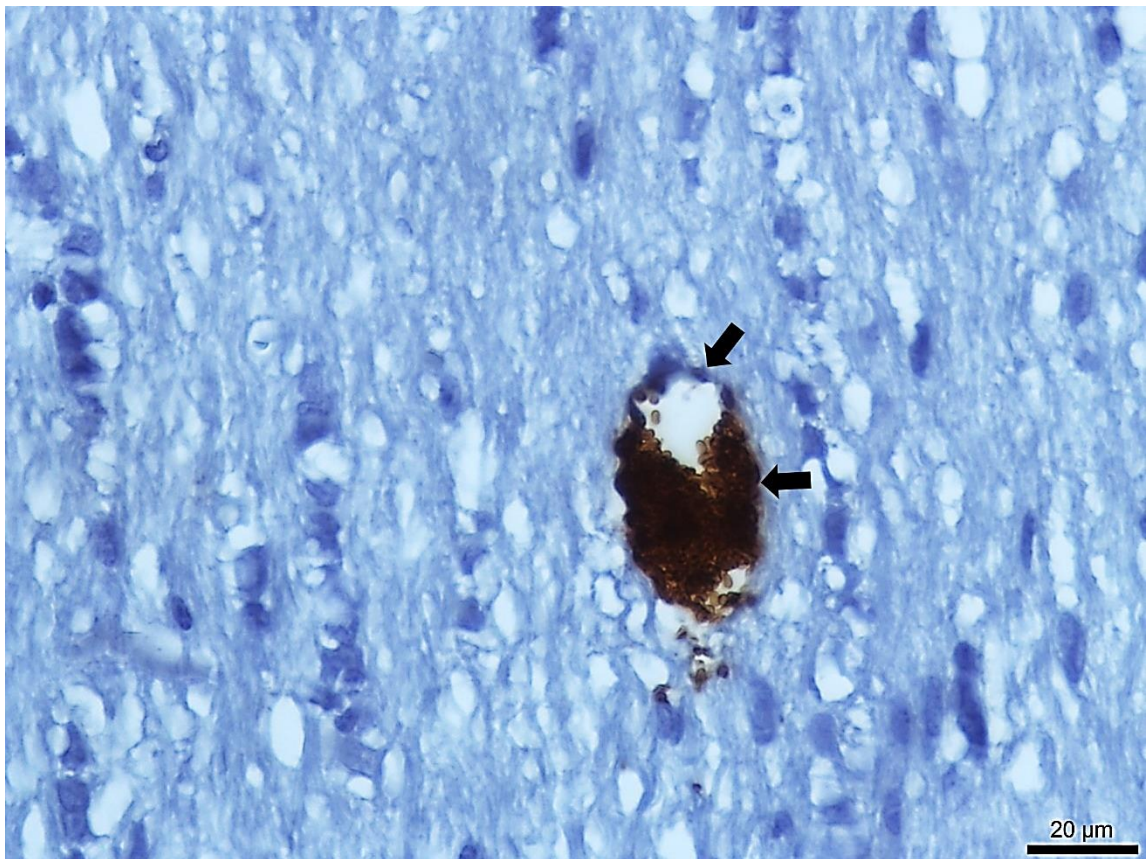


**Figura 26. Corteza Cerebral. Pentacrómico de Movat. A.** Grupo de 30 días post infección. Quiste de esporas (flecha negra). 40X. Barra = 30  $\mu$ m

#### 4.4. Inmunohistoquímica:

##### 4.4.1. Detección de *Encephalitozoon cuniculi*.

Un anticuerpo monoclonal anti microsporidia permitió la localización de las esporas en tejido nervioso de los grupos infectados y el inmunomarcaje no se observó en el grupo control. El inmunomarcaje reveló la forma ovoide y tamaño de 2 por 4  $\mu\text{m}$  de las esporas. Algunas se encontraron libres en parénquima cerebral, adyacentes o dentro de los granulomas o en el lumen de la barrera hematoencefálica (Figura 27).



**Figura 27. Inmunohistoquímica para la identificación de *Encephalitozoon cuniculi*. Encéfalo.** Grupo de esporas de *E. cuniculi* en lumen arteriolar y parénquima cerebral (flechas negras). 100X.



#### **4.4.2 . Detección de GFAP.**

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína de filamento intermedio, la cual se utiliza como un marcador para astrocitos. Los astrocitos del grupo control se caracterizaron por una tinción citoplasmática de GFAP de color marrón rodeada de procesos largos finos en sustancia blanca y procesos cortos en sustancia gris en la cuarta y quinta capa cortical; también presentaron el marcaje cuando se observaron en estrecho contacto entre astrocito-astrocito, astrocito-neurona, y vasos sanguíneos, formando la unidad neurovascular (Figura 28 A).

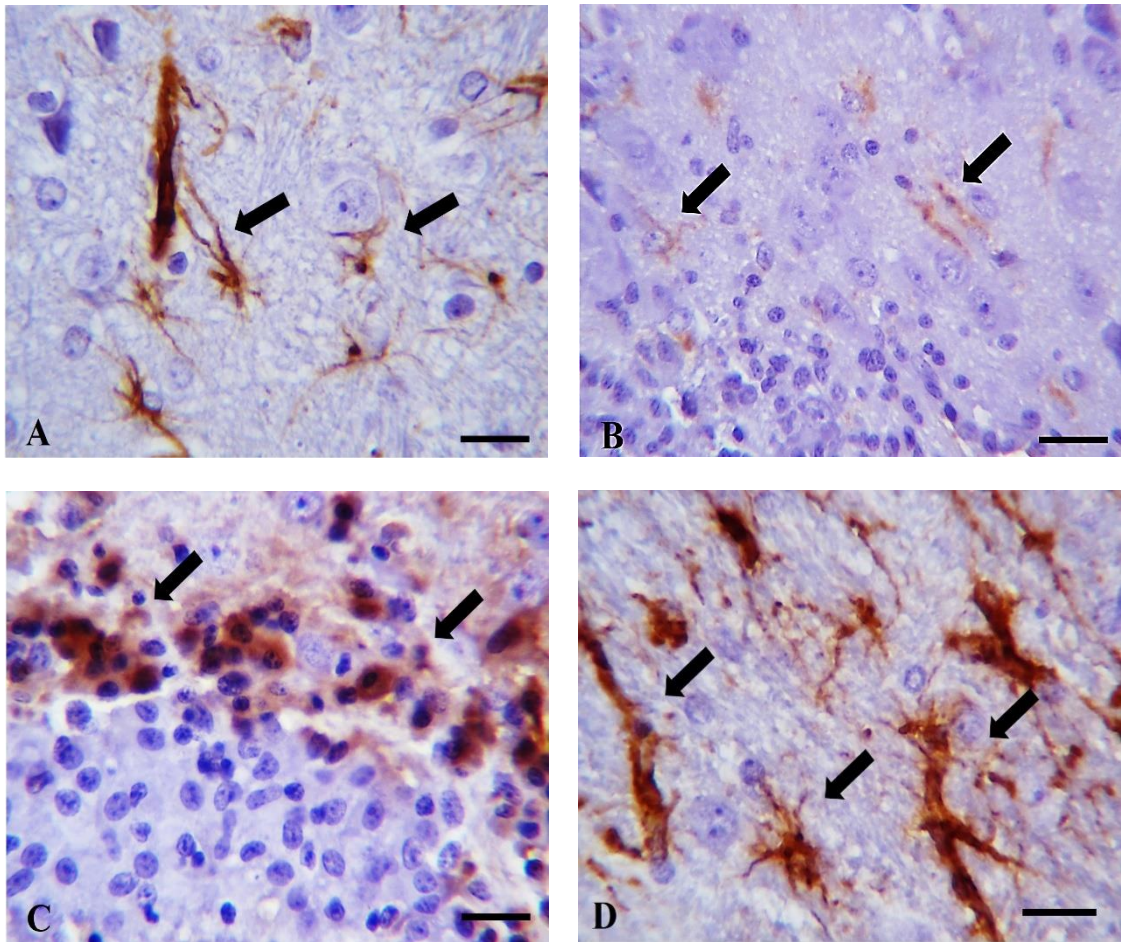
**15 días post infección.** Expresión positiva de GFAP se detectó en astrocitos protoplasmáticos en sustancia gris y astrocitos de vasos sanguíneos que presentaban disrupción de sus paredes en corteza cerebral, hipocampo, núcleos basales. Los astrocitos GFAP positivos se ubicaron preferentemente alrededor de los granulomas o de vasos sanguíneos con infiltrados perivasculares. El plexo coroideo y las células ependimarias de los ventrículos laterales mostraron mayor expresión de GFAP (Figura 28 B).

**30 días post infección.** Una astrogliosis reactiva severa generalizada se observó. Las meninges presentaron infiltrados leucocitarios, aumento de astrocitos protoplasmáticos GFAP positivos en la periferia de los infiltrados, también astrocitos con mayor expresión de GFAP ubicados entre neuronas de la corteza cerebral y de vasos sanguíneos, con mayor disrupción porque presentaban infiltrados leucocitarios graves. En la periferia de los granulomas se observaron células GFAP positivas, formando una barrera a lo largo de los bordes de las lesiones granulomatosas. El plexo coroideo y células ependimarias de los ventrículos también aumentaron la expresión de GFAP, incluso observamos leucocitos en las cavidades ventriculares. En el cerebelo pudimos observar astrocitos positivos a GFAP en la periferia de granulomas, en infiltrados de la piamadre o en la sustancia blanca (Figura 28 C).

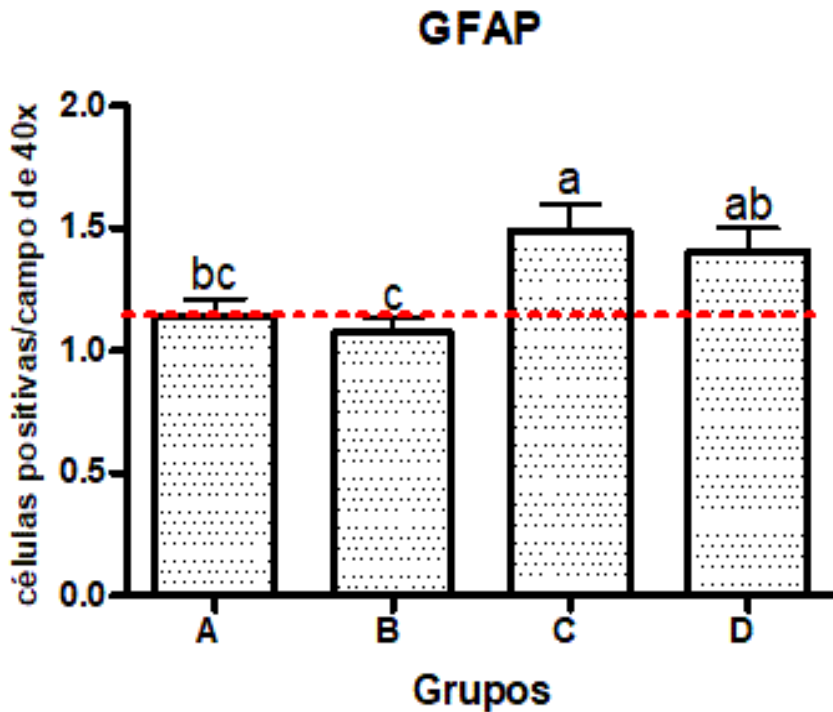
**45 días post infección.** Los astrocitos GFAP positivos se limitaron a la región frontal de la sustancia blanca cortical, en vasos sanguíneos sin infiltración leucocitaria y sin disrupción de su pared. Se observaron más procesos de astrocitos GFAP positivos y citoplasmas hipertrofiados que se extienden y recubren los vasos sanguíneos. Los procesos de astrocitos se entremezclaron con procesos de astrocitos vecinos. La expresión de GFAP

persistió en regiones ausentes de grupos neuronales como en el hipocampo y en vasos sanguíneos alterados. El neurópilo presentó una marcada señal para GFAP que correspondía con procesos astrocíticos más largos, ramificados e hipertrofia del núcleo. La inmunohistoquímica mostró astrogliosis reactiva especialmente alrededor de los vasos sanguíneos y persiste inclusive en ausencia de granulomas (Figura 28 D).

El conteo de células GFAP positivas mostró diferencia ( $p < 0.05$ ) en la región frontal de la corteza cerebral del grupo de 30 días post infección, comparado con los demás grupos experimentales, indicando cuantitativamente astrogliosis reactiva más grave a este tiempo de infección (Figura 29).



**Figura 28. Corteza Cerebral. Inmunohistoquímica para la detección de GFAP en los grupos experimentales.** A. Grupo control. El citoplasma y procesos de astrocitos son positivos para GFAP (flechas). B. 15 días post infección. Los astrocitos GFAP positivos están presentes en la periferia de los granulomas (flechas). C. 30 días post días post infección. La astrogliosis en la periferia de granulomas (flechas). D. 45 días post infección. En la corteza cerebral los astrocitos GFAP positivos presentaron hipertrofia celular y procesos altamente ramificados (flechas). Barra = 20  $\mu$ m.



**Figura 29. Conteo de células positivas a la proteína ácida fibrilar glial en la región frontal del encéfalo de los grupos experimentales.** Se puede apreciar una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la media del grupo de 30 días post infección con respecto a los demás grupos experimentales mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar y las barras que no tengan la misma letra son estadísticamente diferentes.

#### **4.4.3. Detección de TLR2**

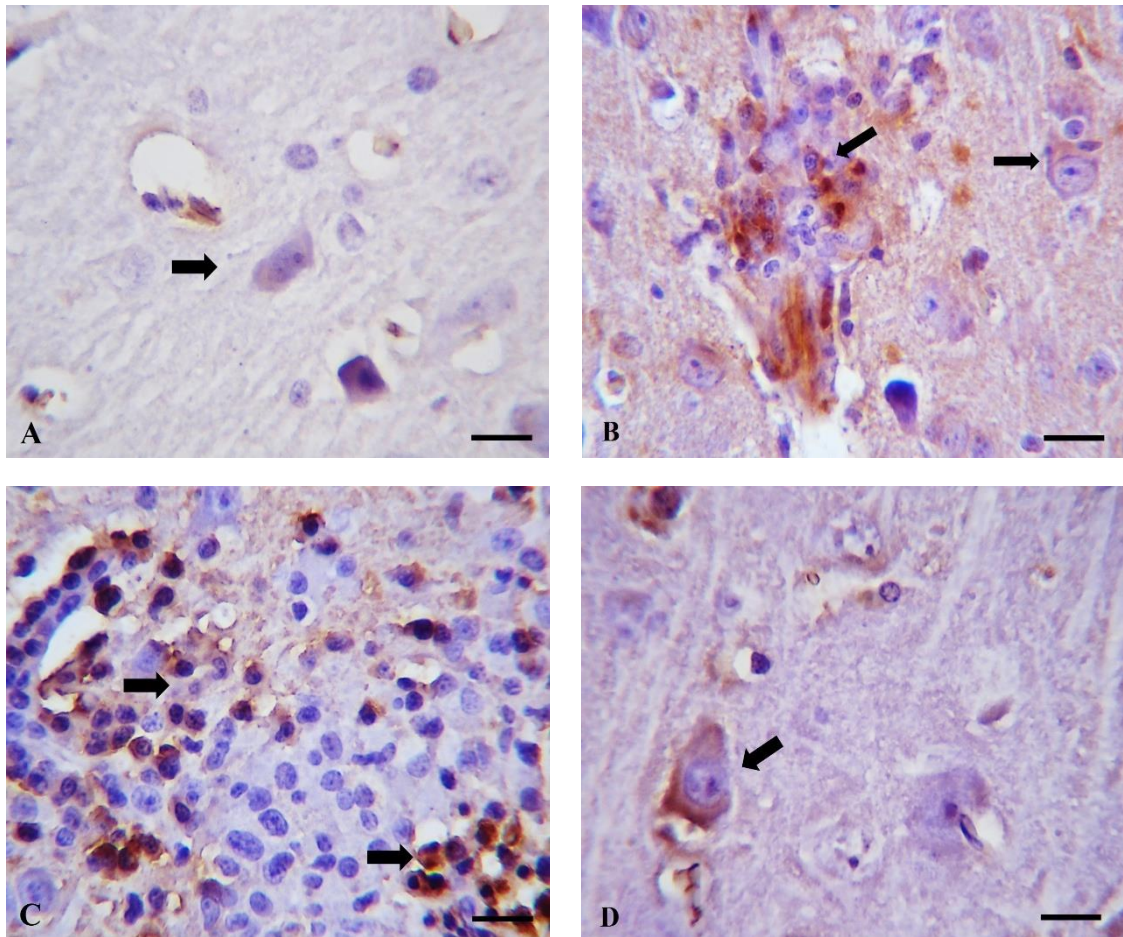
Todos los animales de los grupos experimentales resultaron positivos para TLR2. El marcaje de TLR2 del grupo control se limitó a las neuronas en la sustancia gris, en las células endoteliales de vasos sanguíneos y en los grupos neuronales en regiones cerebrales más profundas (Figura 30 A).

**15 días post infección.** En meninges los infiltrados mononucleares presentaron inmunomarcaje para TLR2. En la corteza cerebral predominó el marcaje en macrófagos que se infiltraban en los granulomas y la expresión en vasos sanguíneos se mantuvo en los que presentaron alteración de su composición, también el plexo coroideo y las células ependimarias presentaron ligera expresión (Figura 30 B).

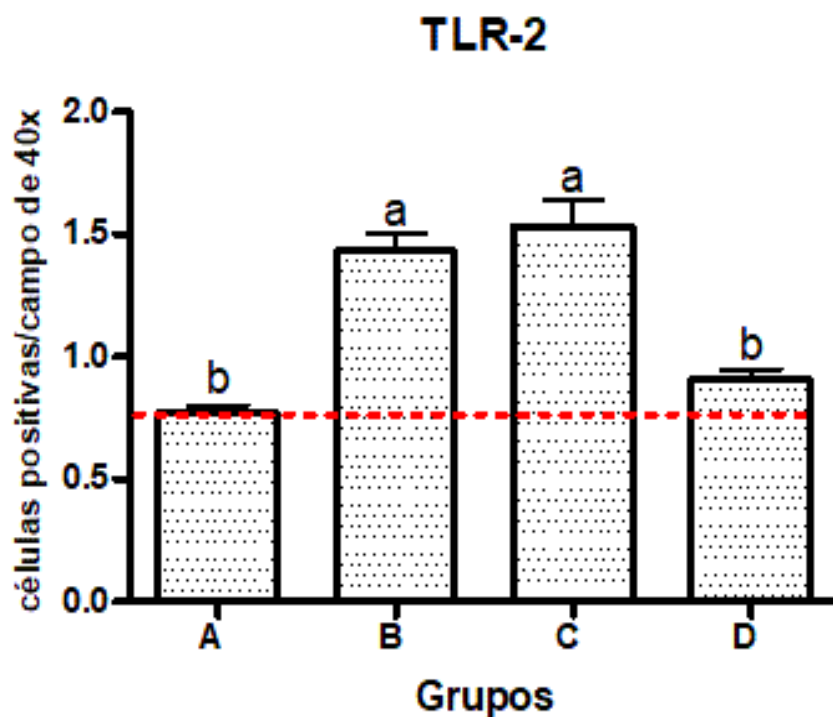
**30 días post infección.** Las muestras analizadas presentaron meningitis y gran número de células positivas para TLR2. Los vasos sanguíneos corticales presentaron gran cantidad de células mononucleares positivas a TLR2, la mayoría de los granulomas se ubicaban adyacentes a los infiltrados perivasculares y las células positivas se encontraban tanto en la periferia como en el centro de los mismos; en la sustancia blanca se observó el marcaje similar de acuerdo con lo antes mencionado. La vasculatura del hipocampo estaba severamente afectada por infiltrados leucocitarios y pérdida de células piramidales por la presencia de granulomas con células TLR2 positivas y las demás regiones cerebrales presentaron el mismo tipo de marcaje. En los granulomas las células TLR2 positiva se encontraron distribuidas en la periferia y centro (Figura 30 C).

**45 días post infección.** El marcaje se limitó a células neuronales de la sustancia blanca y sustancia gris, células endoteliales vasculares y microglía, no se observaron infiltrados mononucleares ni granulomas en meninges, regiones periventriculares o parénquima cerebral. Las células TLR2 positivas se distribuyeron de manera uniforme en el parénquima cerebral. La expresión de la intensidad de TLR2 fue variable, pero más notoria en neuronas lesionadas (Figura 30 D).

El conteo de células positivas presentó diferencia ( $p < 0.05$ ) para el receptor TLR2 en la región frontal de la corteza cerebral en los grupos experimentales. Los grupos de 15 y 30 días post infección demostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la media del número del conteo de células positivas al receptor TLR2 comparado con los demás grupos experimentales (Figura 31).



**Figura 30. Corteza Cerebral. Inmunohistoquímica para la detección de TLR2 en los grupos experimentales.** A. Grupo control. Neurona positiva para TLR2 (flecha). B. 15 días post infección. Células TLR2 positivas en la periferia de los granulomas (flechas). C. 30 días post infección. Células TLR2 positivas en infiltrados perivasculares, centro y periferia de granulomas (flechas). D. 45 días post infección. Neurona cortical positiva para TLR2 (flechas). Barra = 20  $\mu$ m.



**Figura 31. Conteo de células positivas al receptor TLR2 en encéfalo de los grupos experimentales.** Se puede observar que las medias representativas de los grupos B y C muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con los demás grupos experimentales. La barra T en las columnas representan la desviación estándar de la media de los conteos de células positivas para TLR2 y las barras T que no tienen la misma letra son estadísticamente diferentes.



#### **4.4.4. Detección de TLR4.**

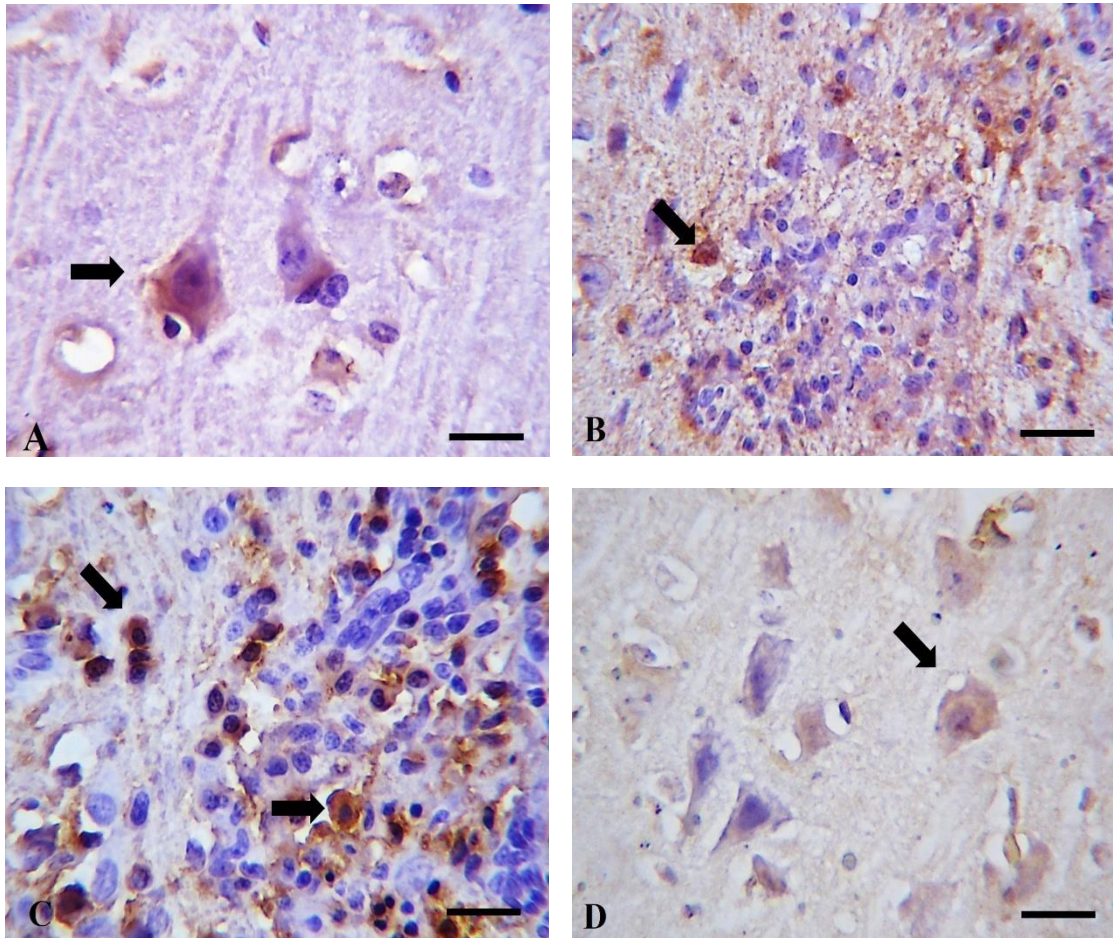
Todas las muestras de los grupos experimentales resultaron positivas para TLR4 en la región de la corteza cerebral, núcleos basales o núcleos de neuronas. En el grupo control la detección de células TLR4 positivas solo se limitó a neuronas (Figura 32 A).

**15 días post infección.** En las meninges algunas células mononucleares mostraron marcaje positivo. En el parénquima cerebral las células positivas fueron neuronas de las capas corticales ubicadas adyacentes a vasos sanguíneos que evidenciaban alteración de su estructura o neuronas adyacentes a granulomas. En las cavidades ventriculares las células endoteliales mostraron positividad al igual que el plexo coroideo (Figura 32 B).

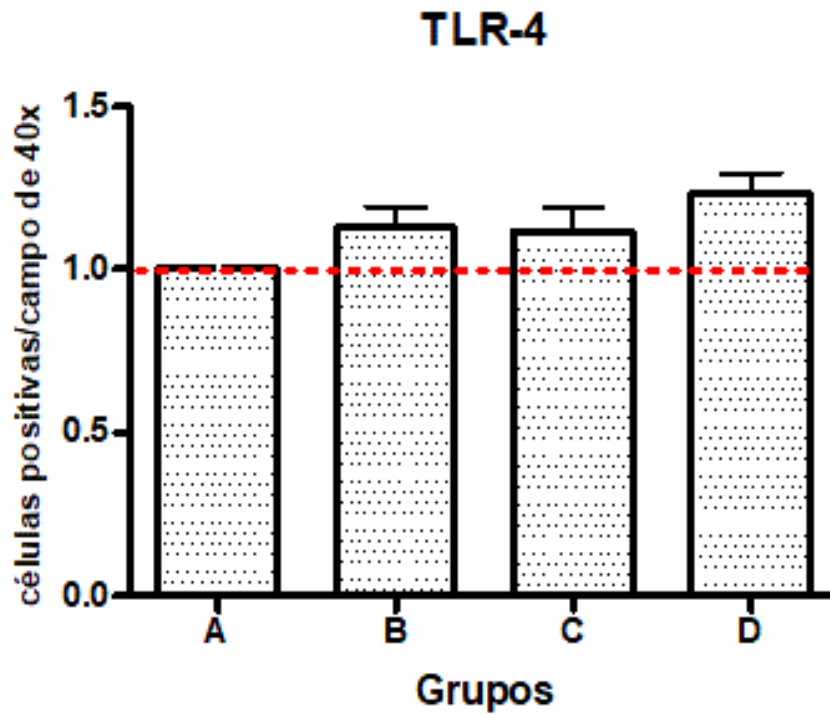
**30 días post infección.** Las meninges presentaron graves infiltrados mononucleares positivos para TLR4. En el parénquima cerebral las células positivas fueron neuronas piramidales, neuronas adyacentes de granulomas, también, células mononucleares en la periferia de los granulomas; las células mononucleares positivas, pudieran ser monocitos, linfocitos y células dendríticas. Observamos células positivas en capilares, vasos sanguíneos o dispersas en el parénquima (Figura 32 C).

**45 días post infección.** La detección de células TLR4 positivas se limitó a grupos neuronales de las regiones cerebrales como corteza cerebral, hipocampo, núcleos basales, diencéfalo, y tronco encefálico. Los vasos sanguíneos no mostraron infiltración leucocitaria, aunque si presentaron edema y disrupción de sus paredes (Figura 32 D).

El conteo de células positivas en la región frontal de los grupos experimentales para células TLR4 positivas no se observó diferencia ( $p < 0.05$ ) entre los grupos experimentales. Esto se presenta en la gráfica que la media de los grupos experimentales resultó similar y el grupo control presento una media ligeramente más baja, pero sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) (Figura 33).



**Figura 32. Corteza cerebral región frontal. Inmunohistoquímica para la detección de TLR4 en los grupos experimentales.** A. Grupo control. El citoplasma de la neurona cortical es positivo para TLR4 (flecha). B. 15 días post días post infección. Las células TLR4 positivas se presentan en la periferia de granulomas y en infiltrados perivasculares (flecha). C. 30 días post infección. Células TLR4 positivas en el centro y periferia de granulomas (flechas). D. 45 días post infección. El citoplasma de las neuronas es TLR4 positivo (flecha). 40X. Barra = 20  $\mu$ m.



**Figura 33. Conteo de células positivas al receptor TLR4 en encéfalo de los grupos experimentales.** Las medias representativas de los grupos experimentales son similares y no muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con la prueba Kruskal-Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar. La línea punteada roja muestra la media del grupo control.

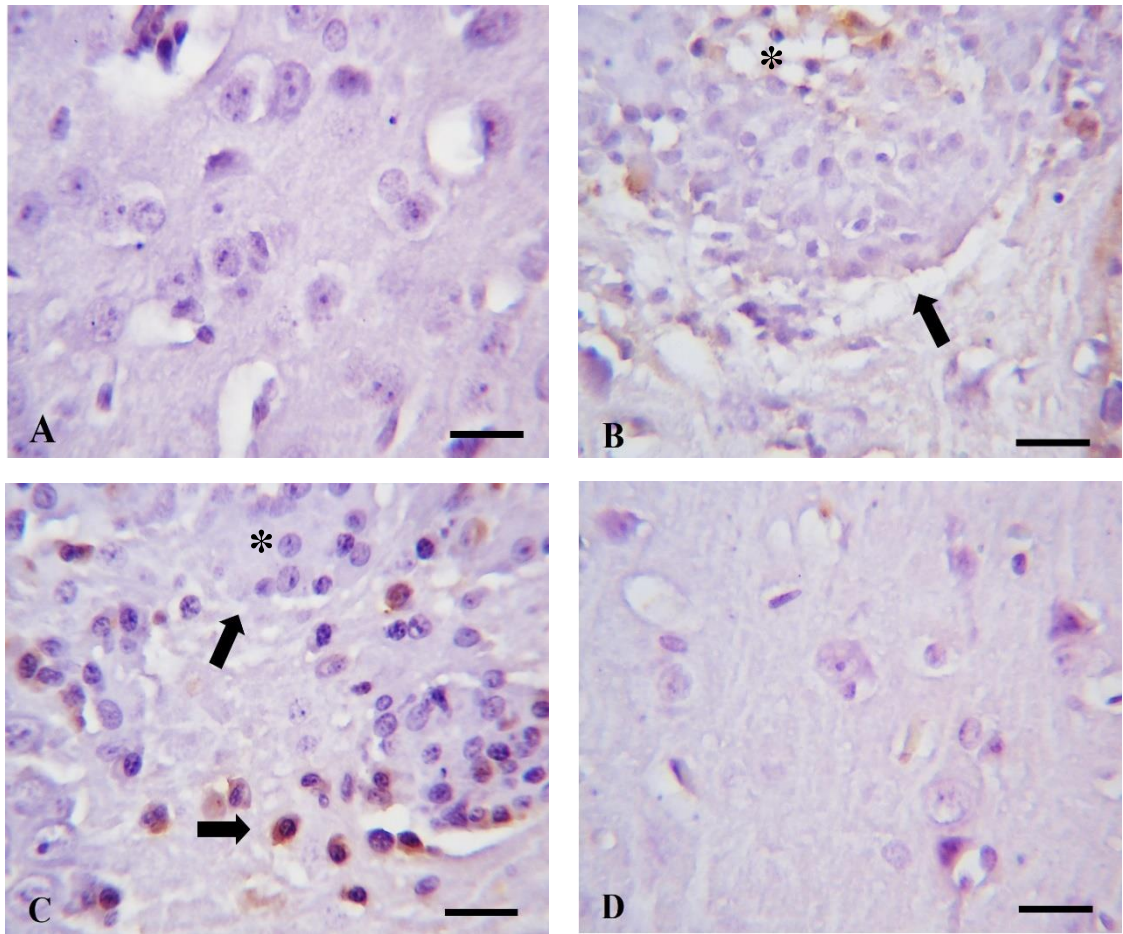
#### **4.4.5. Detección de células dendríticas CD11c positivas.**

Para desencadenar la inmunidad adaptativa se debe capturar, procesar y presentar una muestra de material extraño de forma adecuada a las células que puedan reconocerlo, lo cual lo realizan las células presentadoras de antígeno (CPA) que pueden ser atraídas por productos microbianos o por lesión tisular, de hecho, tanto las células dendríticas y macrófagos son células centinela y CPA.

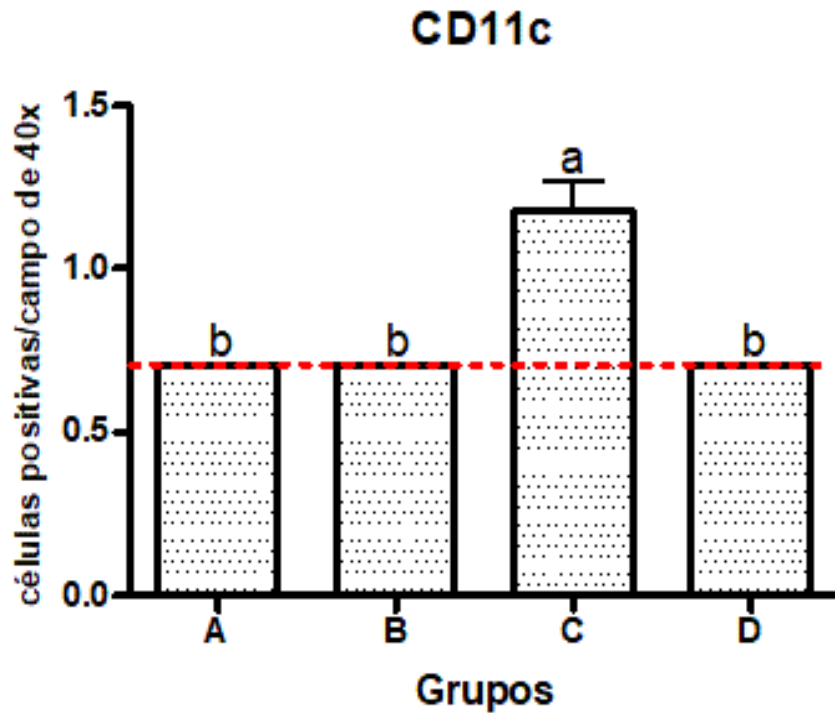
**Grupo control, 15 y 45 días post infección.** En la corteza cerebral del grupo control y de los grupos de 15 y 45 días post infección no se presentaron células CD11c positivas y solo las muestras de los animales del grupo de 30 días post infección resultaron positivas para CD11c en la región frontal de la corteza cerebral (Figura 34 A, B y D).

**30 días post infección.** Las células CD11c positivas se observaron en la periferia de los granulomas que se encontraban preferentemente adyacentes a los vasos sanguíneos. Las células positivas presentaron una morfología estrellada distintiva de células dendríticas como un tamaño de hasta 20  $\mu\text{m}$  de diámetro, un núcleo y un abundante citoplasma. En el parénquima cerebral las células positivas para CD11c se observaron en los infiltrados perivasculares o diseminadas en el neurópilo (Figura 34 C).

El análisis estadístico del conteo de células positivas para CD11c que se realizó en la región de la corteza frontal de los grupos experimentales mostró que la media del grupo de 30 días post infección presentó diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), comparado con los demás grupos experimentales; indicando la participación de las células dendríticas en el granuloma a este tiempo de infección, cumpliendo roles como modulación o presentando antígenos a otras células inmunes como linfocitos (Figura 35).



**Figura 34. Corteza cerebral región frontal. Inmunohistoquímica para la detección de células dendríticas CD11c positivas en los grupos experimentales.** A. grupo control. Las secciones son negativas para CD11c. B. 15 días post infección. Granuloma cortical (flecha), células en el centro positivas para CD11c (asterisco). C. 30 días post infección. Células CD11c positivas en el centro y periferia de granulomas (flechas). Célula gigante multinucleada en la periferia del granuloma (asterisco). D. 45 días post infección. No se observaron granulomas ni células CD11c positivas. Barra = 20 µm.



**Figura 35.** Conteo de células positivas a la molécula CD11c en la región frontal de la corteza cerebral en los grupos experimentales. Se puede observar que la media representativa del grupo de 30 días post infección presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con los demás grupos experimentales mediante el análisis Kruskal-Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar y las barras que no tengan la misma letra son estadísticamente diferentes.

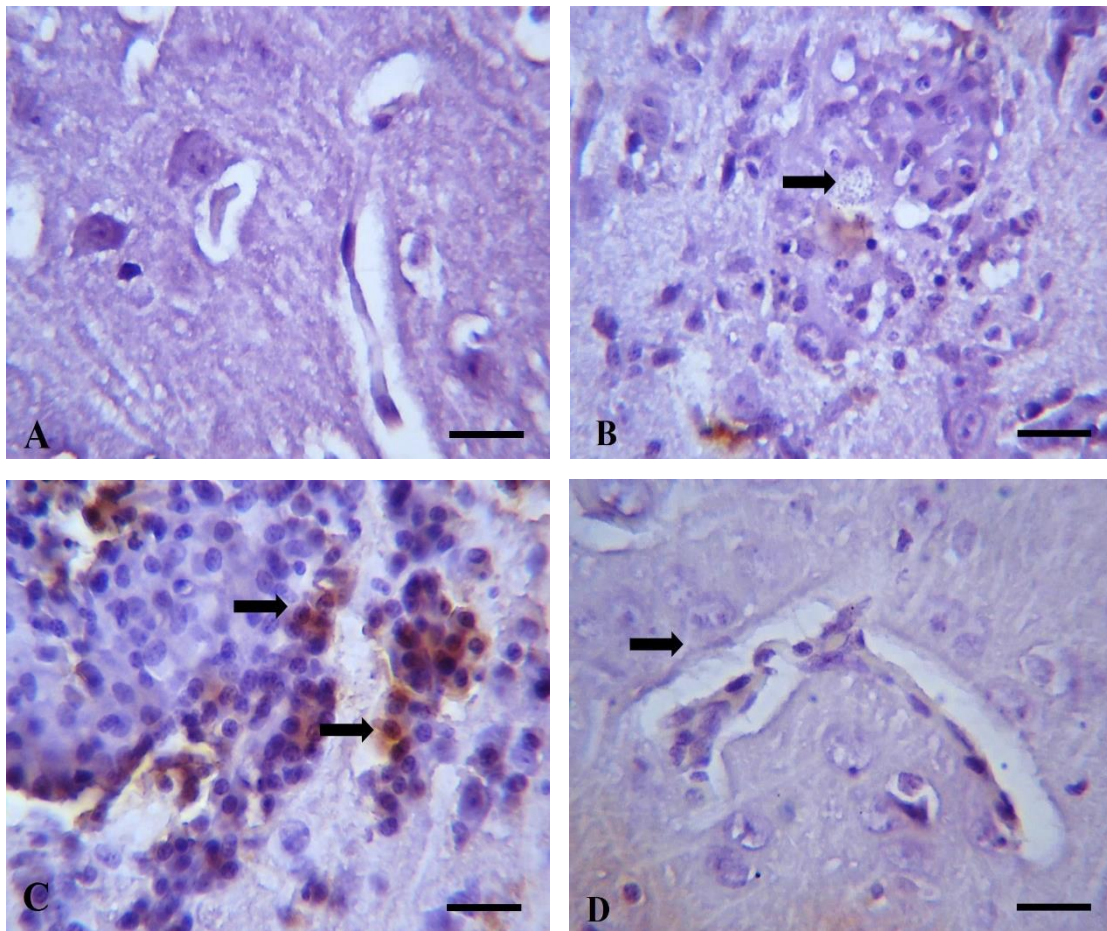
#### **4.4.6. Detección de células B CD20 positivas**

Comúnmente el marcador CD20 se utiliza para identificar las células B. En las muestras de tejido nervioso del grupo control no observamos células CD20 positivas (Figura 36 A).

**15 y 45 días post infección.** En las meninges del grupo de 15 días post infección se presentaron células CD20 positivas, pero no en el parénquima ni en los granulomas. Las células presentes en los granulomas del grupo de 15 días post infección fueron células mononucleares. A los 45 días post infección no se presentaron células B en ninguna región analizada (Figura 36 B y D).

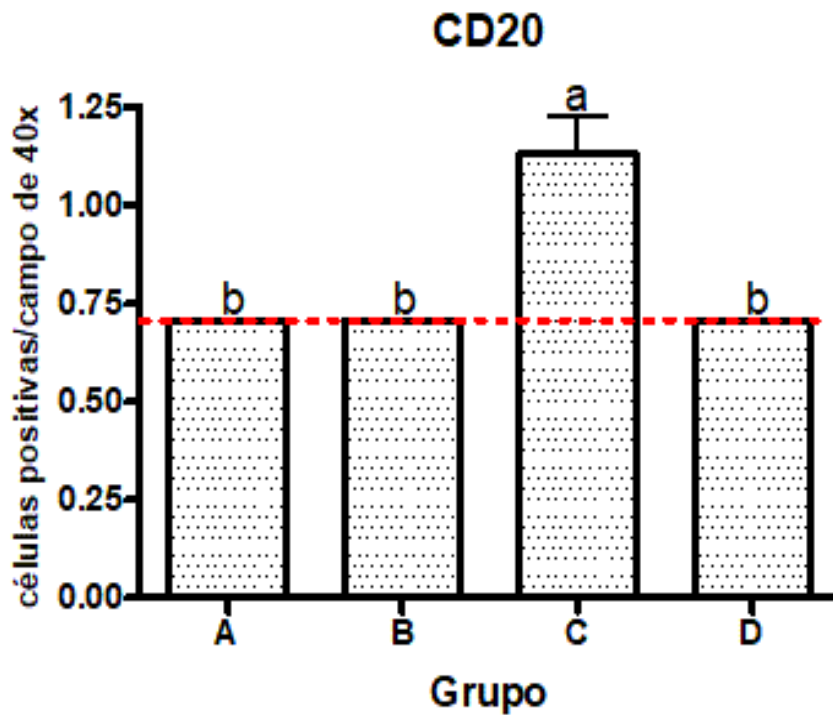
**30 días post infección.** Las regiones cerebrales como las meninges, los infiltrados perivasculares y las reacciones granulomatosas mostraron marcaje positivo para CD20. Las células CD20 positivas se encontraban distribuidas en la periferia de los granulomas formando grupos alrededor de los granulomas y en el parénquima cerebral, la detección de células CD20 positivas se observó principalmente en manguitos perivasculares. Los ventrículos también presentaron presencia de células mononucleares (Figura 36 C).

El conteo de células positivas para CD20 mostró una diferencia a los 30 días post infección comparado con los demás grupos experimentales (Figura 37).



**Figura 36. Corteza cerebral región frontal. Inmunohistoquímica para la detección de células B CD20 positivas en los grupos experimentales. A. Grupo control. Las secciones son negativas para CD20. B. 15 días post infección. Granuloma negativo para CD20 con quiste de esporas (flecha). C. 30 días post infección. Células CD20 positivas en la periferia de granulomas (flechas). D. 45 días post infección. No se observaron granulomas ni células CD20 positivas, observamos un vaso sanguíneo con células mononucleares negativas al marcaje (flecha). 40X. Barra = 20  $\mu$ m.**





**Figura 37. Conteo celular de células positivas para la molécula CD20 en la región frontal de la corteza cerebral de los grupos experimentales.** Se puede observar que la media representativa del grupo de 30 días post infección presenta diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con los demás grupos experimentales con la prueba Kruskal-Wallis. Las barras de error representan la desviación estándar y las barras que no tengan la misma letra son estadísticamente diferentes.

#### **4.4.7. Detección de células NK CD56 positivas**

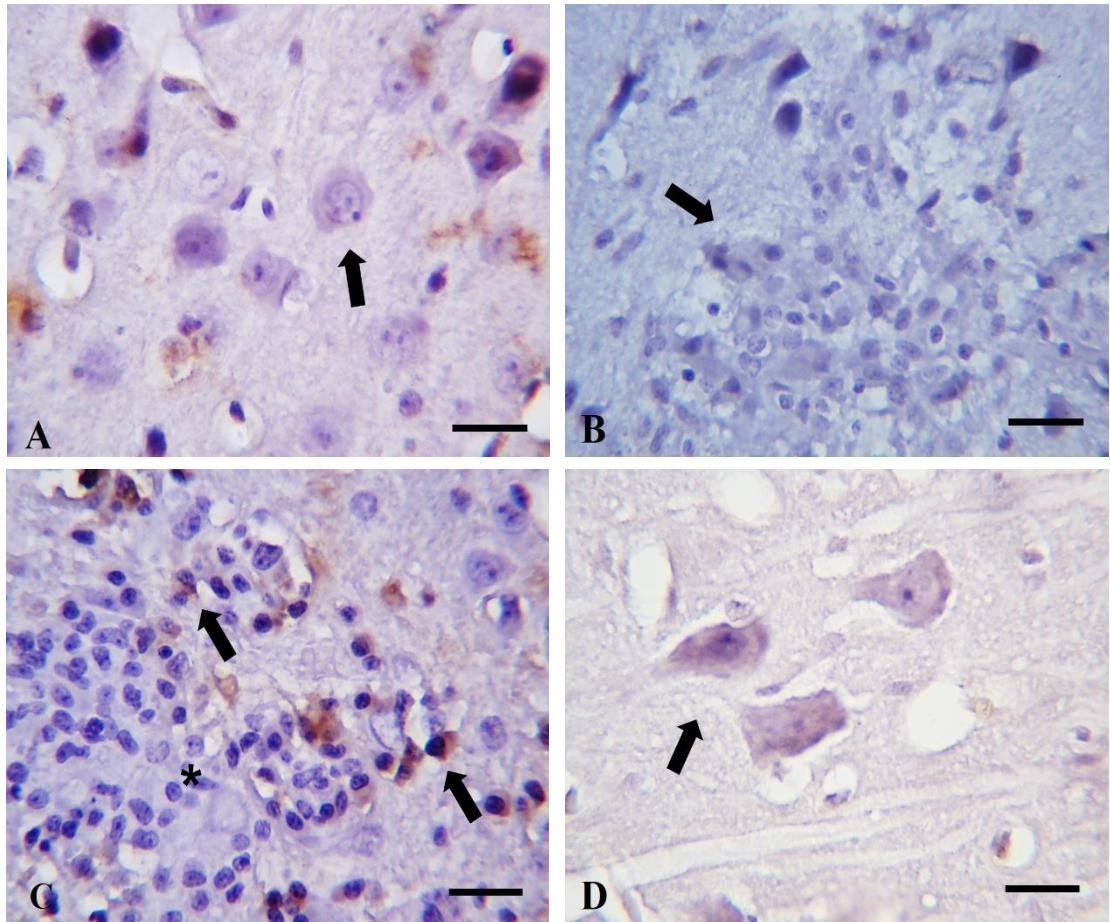
La molécula de adhesión de células neurales (NCAM; CD56) se utiliza como marcador fenotípico para células NK. En el grupo control se pudo observar marcaje positivo para neuronas en la corteza cerebral (Figura 38 A).

**15 días post infección.** En la corteza cerebral mostraron marcaje positivo solo en células neuronales, ya que en los granulomas formados a este tiempo de infección predominaron monocitos infiltrantes (Figura 38 B).

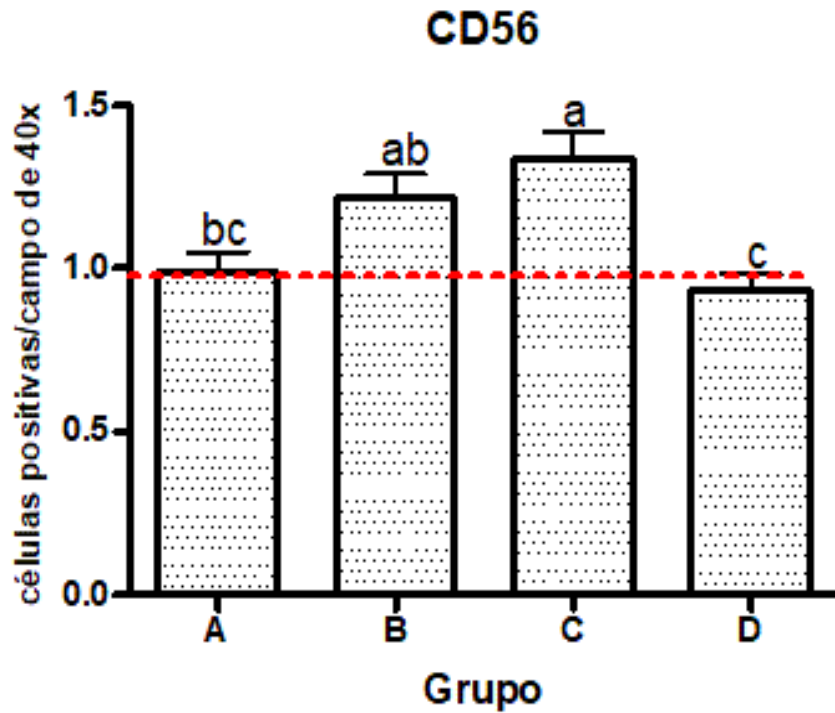
**30 días post infección.** Células CD56 positivas se observaron en las meninges, vasos sanguíneos, regiones del parénquima cerebral adyacentes a granulomas. El marcaje se limitó a células mononucleares en los manguitos perivasculares o se ubicaron principalmente en la periferia de los granulomas, pero también diseminadas dentro de los granulomas (Figura 38 C).

**45 días post infección.** La detección de células CD56 positivas se limitó a las neuronas (Figura 38 D).

En el análisis del conteo de células positivas para CD56 que se realizó en la corteza frontal de los grupos experimentales mostró diferencia ( $p < 0.05$ ) a los 30 días post infección, comparado con los demás grupos experimentales (Figura 39).



**Figura 38. Corteza cerebral región frontal. Inmunohistoquímica para la detección de células NK CD56 positivas en los grupos experimentales.** A. Grupo control. El citoplasma de neuronas es positivo para CD56 (flecha). B. 15 días post infección. Granuloma presente en zona de neuronas piramidales (flecha). C. 30 días post infección. Las células CD56 positivas están presentes en la periferia de granulomas (flechas). Célula gigante multinucleada (asterisco). D. 45 días post infección. Las neuronas expresan CD56 en su citoplasma (flecha). 40X. Barra = 20  $\mu$ m.



**Figura 39.** Conteo de células positivas para la molécula CD56 en la región frontal de la corteza cerebral de los grupos experimentales. La media representativa del grupo de 30 días post infección muestra diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con los demás grupos experimentales con el análisis de Kruskal-Wallis.

## 5. DISCUSIÓN

*Encephalitozoon cuniculi* es un hongo patógeno esporulado, emergente y zoonótico, el cual causa una severa encefalitis granulomatosa en muchos huéspedes mamíferos, especialmente en los conejos (*Oryctolagus cuniculus*). La encefalitozoonosis se caracteriza por la presentación de signos neurológicos compatibles con el síndrome vestibular central como opistótonos, nistagmos, rodamiento en círculos y tortícolis (Santaniello *et al.*, 2020). Lo anterior es debido a la generación de una respuesta inflamatoria granulomatosa multifocal y difusa en el encéfalo de los animales afectados. El granuloma microsporidiano es una entidad poco descrita en la literatura, y lo que se conoce de esta inflamación crónica proviene de la extrapolación de otras enfermedades infecciosas granulomatosas como la tuberculosis, esquistosomiasis, lepra, sarcoidosis, leishmaniasis (Boros *et al.*, 2003; 2013). El granuloma microsporidiano es el resultado de la inmunidad innata y adaptativa contra la espora de *E. cuniculi*, teniendo como punto convergente la participación y activación del macrófago y formación posterior de una reacción inflamatoria granulomatosa (Sholeye *et al.*, 2012). Lo que se conoce de la participación inmune molecular, celular y fagocítica en el granuloma cerebral por *E. cuniculi* se ha reportado en trabajos previos por Dávila-Martínez *et al.*, (2020), Soto-Domínguez *et al.*, (2020, 2022). Los estudios que analizan las lesiones en encéfalo y relacionan la signología clínica con la gravedad de las lesiones concluyen que no hay una correlación en la gravedad de las lesiones y la presentación clínica (Csokai *et al.*, 2009; Ozcan *et al.*, 2018). No existe ningún estudio que relacione la ubicación de los granulomas microsporidianos con regiones específicas en el encéfalo de conejos como en otras enfermedades neurodegenerativas o inmunes (Mounton *et al.*, 2014).

Por lo anterior, en este trabajo se realizó un análisis de la distribución de los granulomas cerebrales en busca de una localización anatómica cerebral en conejos Nueva Zelanda infectados oralmente con esporas de *E. cuniculi* viables. Los granulomas que se desarrollaron exhibieron características similares a las descritas en estudios previos de Rodríguez-Tovar *et al.* (2016) y Soto-Domínguez *et al.* (2022). En este trabajo la distribución de los granulomas cerebrales demostró que se localizaron mayormente en regiones donde se encuentran grupos neuronales con funciones específicas en lugar de una

distribución aleatoria. La distribución de los granulomas o alteraciones adyacentes en los mismos es en sentido rostral a caudal. Las lesiones a los 15 días post infección se encontraron en regiones del prosencéfalo como en la sustancia gris y sustancia blanca de la corteza cerebral, en núcleos basales, hipocampo, regiones periventriculares y en el mesencéfalo, similar a la criptococosis experimental en ratas (Boros *et al.*, 2003). Un hallazgo importante en este grupo fue la presencia de esporas de *E. cuniculi* en el lumen de arteriolas en la región de la corteza frontal y el mesencéfalo. Se ha sugerido que un mecanismo de diseminación o de infección era a través de la vía sanguínea o a través de leucocitos infectados (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016); sin embargo, este descubrimiento se considera como el primer reporte de esporas microsporidianas libres en circulación, lo cual indica que *E. cuniculi* pudiera ingresar al parénquima cerebral como lo hacen otros patógenos como *Cryptococcus neoformans* (Casadevall *et al.*, 2018).

En el grupo C (30 días post infección), la distribución de los granulomas fue más diseminada en el encéfalo en las regiones antes mencionadas y en las áreas cerebrales relacionadas con la regulación del movimiento como el cerebelo, ya que el cerebelo está implicado en el control del movimiento, equilibrio y propiocepción (Schneider *et al.*, 2018), coincidiendo con la presentación clínica de conejos infectados con *E. cuniculi* (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). Las áreas cerebrales afectadas coinciden con la tuberculosis cerebral o neurosarcoidosis (Correale *et al.*, 2011) pero resulta incierto porque en las regiones cerebrales analizadas del grupo D (45 días post infección) no observamos granulomas, puesto que se esperarían lesiones más graves. No obstante, el tejido nervioso presentó cambios histopatológicos asociados con un proceso de reparación como numerosas áreas de reacción glial, regeneración del neurópilo, vasos sanguíneos continuos sin disrupción ni infiltración leucocitaria. Lo anterior es interesante, ya que el parénquima cerebral muestra poca evidencia de daño crónico inflamatorio; esto pudiera deberse a que *E. cuniculi* es un patógeno oportunista y todos los animales del estudio fueron inmunocompetentes contra la infección experimental, debido a que la susceptibilidad a la infección puede deberse a variables relacionadas con el patógeno como el tamaño del inóculo o las diferencias entre las diversas cepas de *E. cuniculi* y una inmunidad celular adecuada como en la criptococosis (Boros *et al.*, 2003).

La distribución y composición de los granulomas cerebrales por *E. cuniculi* es similar a la reportada en la neurotuberculosis humana en que los granulomas se distribuyen en las leptomeninges, tronco encefálico o cerca de regiones periventriculares y se componen principalmente de macrófagos, microglía, células epitelioides, células gigantes multinucleadas, linfocitos T, células NK, células B (Zaharie *et al.*, 2020). En modelos experimentales con ratas infectadas con criptococosis en el SNC observaron lesiones granulomatosas en la corteza cerebral y núcleos basales, siendo similar a la distribución de los granulomas en el grupo B (15 días post infección). Resultaría obvio suponer que la manifestación clínica se relacione con el sitio comprometido como en la neurosarcoidosis humana, que las lesiones granulomatosas se forman en núcleos de nervios craneales o lesiones intraparenquimatosas (Correale *et al.*, 2011) y las personas presentan signos clínicos dependiendo de la región comprometida, lo cual no sucede en los animales infectados de este estudio. Además, la composición celular de los granulomas en la neurosarcoidosis son macrófagos, macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas, linfocitos T, células B, células plasmáticas (Boros *et al.*, 2003). Cabe destacar que los granulomas en la criptococosis y tuberculosis son de gran tamaño desde menos de un centímetro hasta casi 10 cm, respectivamente, en cambio los granulomas por *E. cuniculi* son microscópicos, desde menos de 50  $\mu\text{m}$  hasta 300  $\mu\text{m}$ . Probablemente pudiera ser el pequeño tamaño del granuloma microsporidiano lo que no afecte funciones cerebrales y sea un nicho favorable para la replicación de *E. cuniculi* como en la tuberculosis (Boros *et al.*, 2013; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). Los granulomas cerebrales por *E. cuniculi* se distribuyen de forma diseminada en el SNC, en el caso de la microsporidiosis en conejos, puede que no presenten signos clínicos, aunque esté gravemente afectado el tejido nervioso. En nuestro estudio observamos una distribución similar a la de los granulomas en la neurosarcoidosis donde se pueden encontrar en cualquier región cerebral con funciones específicas asociada a la manifestación clínica.

Este es el primer trabajo en su tipo que propone un modelo 3D de granulomas cerebrales en conejos Nueva Zelanda infectados experimentalmente con *E. cuniculi* en regiones cerebrales específicas y no una distribución aleatoria. Esto mismo puede estar relacionado con la diseminación del parásito en la naturaleza debido a que los patrones de conducta en los conejos infectados con este microorganismo están caracterizados por movimientos

convulsivos y rotatorios; volviéndolos susceptibles a la depredación y de este modo continuar con la dispersión del parásito. Se sabe que en ratones infectados con *Toxoplasma gondii* se producen alteraciones conductuales mediado por neuroinflamación, más que por la interferencia directa del patógeno con poblaciones neuronales específicas del SNC, afectando regiones cerebrales involucradas en la aversión contra los depredadores (Boillat *et al.*, 2020). Se han descrito escasos modelos 3D en enfermedades infecciosas como la tuberculosis o toxoplasmosis (Zaharie *et al.*, 2020; Boillat *et al.*, 2020), pero no en la encefalitozoonosis por lo cual es relevante plasmar un modelo 3D lo cual servirá como herramienta para estudios posteriores.

La tinción de Nissl se utilizó para observar el daño cortical, así como evaluar la respuesta glial y la supervivencia neuronal por su morfología durante este proceso infeccioso en diferentes tiempos de infección. Por primera vez se demostró que existe una marcada pérdida neuronal y alteraciones morfológicas debido a lesión axonal, desde los 15 días post infección, lo cual se agravó a los 30 días post infección y persistió a los 45 días de infección, a pesar de que no observamos granulomas asociados con esas lesiones. La infección por *E. cuniculi* causa muerte neuronal, lo cual coincide con otro trabajo en conejos infectados naturalmente con *E. cuniculi* (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). Por primera vez se evaluó mediante esta técnica la supervivencia neuronal en la encefalitozoonosis cerebral. A los 15 y 30 días post infección las neuronas adyacentes a granulomas presentaron encogimiento del cuerpo celular, pérdida o desplazamiento de la sustancia de Nissl hacia la periferia en respuesta a la lesión axonal, citoplasmas intensamente teñidos, y núcleos pequeños. A los 30 días post infección el parénquima cerebral presentó mayor densidad de núcleos de células gliales en sustancia gris y blanca que pudiera deberse a la liberación y expresión de moléculas que señalan el daño, como neurotransmisores, citocinas, quimiocinas o patrones moleculares asociados a daño, que estimulan la gliosis y la infiltración leucocitaria promoviendo la neuroinflamación (Burda & Sofroniew, 2014; Boos *et al.*, 2021).

La tinción de Klüver-Barrera permitió la evaluación de los axones para distinguir entre la necrosis del SNC, que es en donde los axones se desintegran y dejan restos axonales en los macrófagos y la desmielinización en donde se aprecian que los axones están intactos



y los macrófagos espumosos sólo contienen mielina (Jubb *et al.*, 2016). La necrosis del SNC se produce en otras infecciones, sobre todo en la toxoplasmosis, neurotoxocariosis o leucoencefalomielitis multifocal progresiva por el virus del moquillo canino (Klements *et al.*, 2019; Springer *et al.*, 2019). En el presente estudio se demostró las diferencias entre los conejos infectados de 15 y 30 días post infección a nivel histopatológico en cuanto a la desmielinización comparado con los demás grupos. Lo anterior podría ser debido a la presencia de los granulomas al invadir tejido nervioso e interrumpir los tractos de los axones, presentándose una pérdida de la tinción o bien, los macrófagos podrían estar fagocitando restos de mielina del tejido necrótico proveniente de axones de neuronas muertas para eliminar los desechos y continuar con la reparación de la región afectada (Zachary *et al.*, 2022). También se observaron evidencias de la lesión crónica como infiltración linfocítica perivascular, activación de la glía, o desmielinización en muestras de sustancia blanca cortical y sustancia blanca cerebelar a los 30 días post infección, lo cual pudiera deberse a que se perdió la integridad estructural y funcional de la barrera hematoencefálica promoviendo el curso de la neuroinflamación por la migración de células inmunitarias, el transporte de citocinas y otras reacciones inflamatorias. Esto similar en la neurotoxocariosis y en la leucoencefalomielitis multifocal progresiva por el virus del moquillo (Springer *et al.*, 2019; Klemens *et al.*, 2019).

Un análisis histoquímico de los componentes conectivos del granuloma y del tejido cerebral adyacente se consideró para, la tinción de Tricrómico de Masson, para ver la participación de componentes de la matriz extracelular en estos granulomas. En algunas neuropatologías como en la neurotuberculosis o la neurocisticercosis, se ha observado una capsula de tejido conectivo, fibras de reticulina dentro del área necrótica del granuloma tuberculoso o de una cápsula fibrosa en los casos de *Taenia solium* (Verastegui *et al.*, 2015; Zaharie *et al.*, 2020). En este trabajo, el grupo control no reveló participación de tejido conectivo en el parénquima cerebral. Los granulomas en el tejido nervioso a los 15 y 30 días post infección no presentaron cápsula fibrosa a diferencia de los granulomas mencionados anteriormente. Por tratarse de una respuesta tipo Th1, era de esperarse la participación de tejido conectivo en la periferia del granuloma (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). En cambio, el parénquima cerebral de los conejos de 45 días post infección presentó tejido conectivo en el neurópilo y cambios espongiiformes en la sustancia blanca

cerebelar que pudiera deberse a la pérdida neuronal por el proceso infeccioso, como la observada en la neurocisticercosis (Verastegui *et al.*, 2015). La ausencia de tejido conectivo pudiera deberse a la participación de células NK en el granuloma, como la reportada en la fibrosis hepática asociada a la esquistosomiasis (Liu *et al.*, 2022). Las células NK pudieran inhibir la fibrosis hepática mediante mecanismos mediados por TLR3, inducir apoptosis en células blanco del huésped o debido a la secreción de IFN- $\gamma$  (Liu *et al.*, 2022). Cabe destacar que a pesar de que el granuloma microsporidiano es de tipo tuberculoide o Th1, carece de una cápsula fibrosa, la cual es característica del granuloma prototipo observado en tuberculosis (Boros *et al.*, 2003). Estos datos coinciden en que se ha visto mayor expresión de IFN- $\gamma$  en cerebro de conejos infectados naturalmente con *E. cuniculi* (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). La tinción de Movat permitió descartar la participación de componentes de tejido conectivo dentro y fuera de los granulomas de 15 y 30 días post infección. Esta técnica se ha utilizado para analizar otros patógenos causantes de granulomas como el hongo *Cryptococcus neoformans*. El componente azul de Alciano tiñe de color turquesa las paredes celulares y las cápsulas criptocócicas, permite la visualización de hongos y células huésped o evidenciar estructuras linfoides en pulmón (Li *et al.*, 2020). En los conejos de los grupos infectados detectamos esporas de *E. cuniculi* de color amarillo, probablemente tomaron esta coloración por la afinidad del amarillo de metanil debido al alto contenido de proteínas de la pared de la exospora (Weiss *et al.*, 2014). En términos de histología cerebral, se espera encontrar la participación de componentes de tejido conectivo como se ha mencionado en otros estudios mediante la técnica de hematoxilina y eosina (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016<sup>a</sup>), pero la arquitectura del granuloma cerebral solo identificó núcleos celulares, citoplasma y fibras de colágeno en los vasos sanguíneos a los 15 y 30 días post infección. Igualmente, se demostró la pérdida de tinción del parénquima cerebral que pudiera deberse a la pérdida de densidad neuronal alterando la visualización del neuropilo, lo cual fue más marcado a los 45 días post infección, debido a que las células afectadas son células que no se dividen como las neuronas, que se sustituyen eliminando sus restos y dejan espacios libres que pueden ocuparse por prolongaciones de astrocitos que rellenan el espacio perdido, proporcionando estructura y soporte, pero su visualización necesita técnicas especiales. (Allen & Eroglu *et al.*, 2017; Zachary *et al.*, 2022).

En el presente estudio la infección experimental con *E. cuniculi* en conejos Nueva Zelanda promueve la proliferación de células mononucleares en el lugar de las lesiones que con las células gliales promueven más infiltración leucocitaria para favorecer la eliminación de la espora, aunque esto pudiera contribuir al daño neuronal (Zhao *et al.*, 2020). Parece ser que, al resolverse la infección las lesiones granulomatosas se eliminan, pero el tejido muestra signos de lesión por los resultados demostrados con las demás tinciones. A diferencia de otras enfermedades granulomatosas, en nuestro estudio la lesión granulomatosa no persiste a los 45 días post infección, pero observamos quistes de esporas libres en ese periodo y pudiera ser que *E. cuniculi* persista en el parénquima cerebral generando nuevos granulomas en estados de inmunosupresión posteriores. Esto ocasionaría que se reincida la infección culminando con la muerte del huésped, pero para esta incógnita sería necesario el estudio de modelos de encefalitozoonosis con mayor tiempo de la infección.

Mediante inmunohistoquímica se observaron esporas de *E. cuniculi* dentro de vasos sanguíneos cerebrales desde los 15 días post infección. Esto pudiera sugerir que pueden ingresar al parénquima cerebral a través de la BHE mediante un mecanismo aún desconocido, tal y como lo reportado en microsporidiosis canina (McCully *et al.*, 1978). La inflamación crónica cerebral podría alterar la integridad de la como lo reportado con otros neurotrópicos que cuentan con estrategias para atravesar la barrera hematoencefálica (Galea *et al.*, 2021). Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis* invade el cerebro a través de un mecanismo similar al “caballos de Troya” en leucocitos infectados (Dando *et al.*, 2014). Por otro lado, *Listeria monocytogenes* (Dando *et al.*, 2014) presenta factores de virulencia importantes para la entrada directa al parénquima cerebral como la proteína de superficie “internalina” que se internaliza con el receptor de adhesión celular E-cadherina, también puede usar la actina de la célula huésped para facilitar la transferencia de célula a célula (Dando *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2018). Quizás *E. cuniculi* utilice algún mecanismo similar al de estos patógenos.

Por primera vez, la participación de astrocitos se analizó mediante inmunohistoquímica para la proteína ácida fibrilar glial en conejos infectados experimentalmente con *E. cuniculi*. Los astrocitos juegan un papel central en el mantenimiento de la fisiología

normal del SNC, controlan la respuesta inmune en la lesión cerebral y juegan un papel importante en enfermedades infecciosas. En otras especies se ha caracterizado la respuesta de las células gliales, como astrocitos y microglía, en equinos con encefalopatías causadas por distintos patógenos de acuerdo con alteraciones morfológicas mediante la detección inmunohistoquímica (Boos *et al.*, 2021). En cuanto a la infección por *E. cuniculi*, existe un reporte sobre la respuesta glial en *Lemniscomys barbarus* donde demuestran la activación de la microglía en la infección natural por *E. cuniculi* (Kitz *et al.*, 2018). En nuestro estudio fue de interés analizar el papel de los astrocitos en la encefalitozoonosis experimental en conejos. Para lograr el objetivo anterior se llevó a cabo un análisis de los astrocitos mediante el marcador de la proteína ácida fibrilar glial o GFAP en los grupos experimentales y se analizó la participación de células inmunopositivas en los granulomas cerebrales mediante los perfiles cuantitativos y morfológicos. Los astrocitos del grupo control se aparecieron sin cambios histológicos, ligeramente ramificados y con contacto mínimo entre las células y estrechamente relacionados con los vasos sanguíneos (Sofroniew & Vinters., 2010). Los estudios en otras especies de animales describen una morfología similar en el SNC sano, de perros, ratones y ratas (Hwang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2018). Las respuestas reactivas de los astrocitos, las observamos en la expresión o inmunomarcaje de GFAP en astrocitos ubicados en la periferia del granuloma, lo cual coincidió con el inicio de la desmielinización a los 15 días post infección. En este mismo día de post infección, los astrocitos reactivos también estuvieron presentes en la sustancia blanca mostrando alteraciones morfológicas que consistieron en un agrandamiento nuclear leve y más expresión de GFAP en los procesos de astrocitos de vasos sanguíneos, que presentaron disrupción de sus paredes e infiltrados leucocitarios o en la periferia de los granulomas, lo cual puede deberse a que en este tiempo de infección pudieran tener cambios metabólicos, estructurales y funcionales en respuesta a la lesión tisular. Se sabe que los astrocitos son capaces de proliferar y pueden generarse por progenitores locales que se acumulan alrededor de los bordes de tejido dañado que contiene células inflamatorias, pero los mecanismos celulares y moleculares que desencadenan la determinación de dónde se forma con precisión los bordes de la cicatriz de los astrocitos no se comprenden por completo, pero pudieran implicar interacciones complejas y un equilibrio de señales moleculares (Burda & Sofroniew., 2014). En cambio, a los 30 días

post infección, los animales presentaron astrogliosis grave acompañada de hipertrofia celular prominente y mayor número de células GFAP positivas y presentaron diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), comparado con los demás grupos experimentales. Estas observaciones nos indican que se formó una cicatriz con astrocitos compactos en la lesión granulomatosa madura y que la función de estos bordes pudiera servir para delimitar con precisión las áreas de tejido de lesión no funcional del tejido neural circundante (Burda & Sofroniew., 2014). A los 45 días post infección los astrocitos GFAP positivos se mantuvieron con una inmunoreactividad de GFAP significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) comparado con los grupos experimentales por el aumento de la intensidad de la tinción, procesos más ramificados, aumento del número de astrocitos, lo cual fue comprobado mediante el conteo de células positivas como en otros estudios (Díaz-Pérez *et al.*, 2016; Drögemüller *et al.*, 2008), lo cual nos puede indicar alteración de la BHE y del parénquima cerebral adyacente, donde persiste la lesión y la remodelación tisular depende de la resolución de la infección (Burda & Sofroniew., 2014). Las células GFAP positivas se observaron principalmente en el cuerpo calloso de la corteza cerebral en la región frontal y astrocitos que forman la unidad neurovascular, lo cual nos indica que pudieran estar cumpliendo diferentes funciones mediando la reparación (Zachary *et al.*, 2022). Por lo anterior demostramos que la expresión de GFAP es progresiva con el tiempo de infección. Estos hallazgos justifican la importancia de abordar las alteraciones morfológicas y cuantitativas de los astrocitos en diferentes escenarios patológicos de la encefalitozoonosis, siendo necesario analizar su papel en tiempos de infección más crónicos. El aumento en número, tamaño y cambios morfológicos en astrocitos nos indica que cumplen diferentes funciones como regular las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en el SNC de conejos infectados con *E. cuniculi*, tal y como ocurre en encefalopatías equinas (Boos *et al.*, 2021), ya que éstos, tienen funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso, función neuronal, regulación de concentraciones de iones y moléculas que atraviesen la BHE (Zachary *et al.*, 2022). Estos resultados podrían ayudar a identificar las alteraciones sufridas en los astrocitos cuando se sospecha de una infección por *E. cuniculi* o relacionar la gravedad de la enfermedad con las concentraciones séricas de GFAP como biomarcador en conejos como mascota infectados con *E. cuniculi* (Abdelhak *et al.*, 2022). Estos resultados indican que la

presencia directa de *E. cuniculi* induce una respuesta inflamatoria que conduce a la astrogliosis reactiva en el cerebro de conejos Nueva Zelanda. Además de la inflamación granulomatosa, existe un componente celular inflamatorio mixto que comprende neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas, células dendríticas y moléculas proinflamatorias en las leptomeninges.

El entorno del SNC parenquimatoso está en un equilibrio inmunológico, éste presenta citocinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$  e IL-10 y está repleto de gangliósidos en las membranas de las neuronas que pueden activar la glía (Correale *et al.*, 2011). La expresión de TLR's en el cerebro sano es baja, limitada a astrocitos y a microglía, aunque en ratones también las neuronas pueden expresar TLR2 y TLR4, además, las neuronas son muy susceptibles a NOS o a ROS producidos por los macrófagos en respuesta a PAMS lo cual puede ser dañino y desencadenar su muerte (Ransohoff *et al.*, 2012). La localización de las células que expresan TLR's en el cerebro indica que estos son importantes en la detección de patógenos invasores, como lo visto en la microglía de roedores que expresa TLR1 a TLR9 en regiones expuestas a la circulación como el sistema ventricular, meninges y plexo coroideo (Carty & Bowie *et al.*, 2011). Se ha visto que la expresión de TLR's aumenta con la infección bacteriana y vírica para iniciar una respuesta inflamatoria (Carty *et al.*, 2011), también se ha sugerido que los macrófagos reconocen a las esporas de *E. cuniculi* mediante TLR2 (González-Machorro *et al.*, 2019). Por lo anterior, se decidió estudiar la presencia de TLR2 y TLR4 en nuestro trabajo para investigar si están implicados en el inicio de la respuesta inflamatoria granulomatosa por *E. cuniculi*. La detección de TLR2 en el grupo control se limitó a neuronas, plexo coroideo y células endimarias sin mostrar diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) con los demás grupos experimentales. En los granulomas de conejos con 15 días post infección, las células TLR2 positivas fueron células mononucleares que conformaban los granulomas y la morfología de las células positivas indicó que eran macrófagos que formaban casi la mayoría del granuloma. Lo cual indica que la formación del granuloma pudiera deberse a la vía TLR2/NF- $\kappa\beta$  promoviendo la producción de citocinas proinflamatorias y reclutando a otras células inmunitarias para continuar con la formación granulomatosa. Las células TLR2 positivas en los grupos de 15 y 30 días post infección mostraron diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) comparado con los demás grupos. En los granulomas del grupo C

las células TLR2 positivas se observaron en la periferia y en menor cantidad hacia el centro. Lo que indica la infección por *E. cuniculi* promueve una respuesta inflamatoria probablemente modulando la vía de señalización mediada por TLR2 como en la meningitis por *Streptococcus pneumoniae* (Zhao *et al.*, 2020). A los 45 días post infección no encontramos lesiones granulomatosas y las células positivas para TLR2 fueron neuronas, que continúan detectando DAM's y liberando señales de daño para las células gliales. A la fecha no hay estudios que se enfoquen en la participación de los receptores tipo Toll en la formación de granulomas microsporidianos, y es posible que la formación granulomatosa se lleve a cabo por la participación de TLR2 mediante la vía del NF- $\kappa$ B y en la regulación positiva y secreción de varias citoquinas que conducen al reclutamiento de leucocitos. Lo anterior, coincide con lo visto en los granulomas desde los 15 días post infección, y la participación de otros grupos celulares TLR2 positivos como linfocitos, células B, células dendríticas, células NK en los granulomas de 30 días post infección. En enfermedades bacterianas que causan meningitis como *Streptococcus spp.* del grupo B la respuesta de TLR's puede causar la meningitis, lo cual ha sido evaluado en modelos murinos, o en la meningitis causa por *Streptococcus pneumoniae* donde la expresión de TLR2 inducida por la bacteria fue mucho mayor que en ratones del grupo control (Zhao *et al.*, 2020). En modelos animales de tuberculosis, los receptores tipo Toll están involucrados en la respuesta inmune innata en la producción de citocinas y la inducción de la respuesta granulomatosa en pulmones (Boros *et al.*, 2003). Con base en lo anterior, nuestros resultados nos indican que la señalización de TLR2 está involucrada en la respuesta inflamatoria observada en conejos tras la infección con *E. cuniculi* en SNC.

Los TLR's son los más importantes receptores antigénicos, su activación puede conducir directamente a la eliminación de patógenos, pero también puede regular la respuesta inmunitaria subsiguiente, es decir, la inmunidad innata, al inducir la liberación de citocinas, producción de intermediarios de oxígeno reactivo, y moléculas de adhesión (Stenzel *et al.*, 2008), las cuales juegan un papel importante en el granuloma cerebral por *E. cuniculi* (Nevárez-Garza *et al.*, 2017; Dávila-Martínez *et al.*, 2020). Estas reacciones están destinadas a eliminar el patógeno y finalizar la respuesta inmunitaria, pero también pueden desencadenar posibles daños colaterales en el SNC en caso de una desregulación (Carty & Bowie., 2011). El TLR4 reconoce lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas,

pero también reacciona a la fibronectina, fibrinógeno,  $\beta$ -defensina,  $\beta$ -glucanos que se liberan de forma no específica en situaciones de daño tisular. El TLR4 se expresa en el SNC de ratones y humanos, como astrocitos, microglía, y neuronas. Antes de este trabajo, no se había definido la participación de este TLR´s en el granuloma cerebral causado por *E. cuniculi in vivo*; sin embargo, recientemente se reportó que macrófagos infectados con microsporidios pueden matar al invasor intracelular o no, dependiendo del estado de activación de la célula y de la existencia de mecanismos de supervivencia (González-Machorro *et al.*, 2019), los cuales son mediados por la expresión a nivel de superficie de receptores tipo Toll. En otras infecciones cerebrales, el TLR4 es importante para la supervivencia y eliminación eficaz de *Staphylococcus aureus* en el cerebro, promoviendo una producción adecuada de citocinas y quimiocinas que conduce al reclutamiento de leucocitos (Stenzel *et al.*, 2008). En un estudio de Lawlor *et al.*, 2010, mostraron que TLR4 desempeña un papel importante en la activación de células dendríticas esplénicas durante la infección por *E. cuniculi*, resultando en una respuesta inmune protectora. Por lo anterior, mediante inmunohistoquímica observamos que las células TLR4 positivas son células dendríticas o macrófagos. El inmunomarcaje se detectó en la periferia de los granulomas a los 30 días post infección en células que presentaban un diámetro de hasta 20  $\mu$ m, lo cual coincide con la participación de células dendríticas en la tuberculosis humana (Zaharie *et al.*, 2020), pero la expresión de TLR4 no mostró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), comparando la media de células positivas en los grupos experimentales. Esto puede deberse a que TLR4 es expresado en neuronas *per se*, y sirve como receptor de moléculas inflamatorias como ROS, o patrones moleculares asociados a daño, aunque también las células positivas son poblaciones de macrófagos como se describe en un estudio reciente sobre el reclutamiento de M1/M2 en granulomas cerebrales de conejos infectados experimentalmente con *E. cuniculi* (Soto-Domínguez *et al.*, 2022). La ubicación de células dendríticas que vimos en este estudio coincide con otro con la expresión de moléculas MHC-II en la periferia de granulomas cerebrales de conejos Nueva Zelanda infectados naturalmente (Soto-Domínguez *et al.*, 2020), por lo anterior, confirmamos la participación de células dendríticas en los granulomas de conejos Nueva Zelanda a los 30 días post infección con *E. cuniculi*. También observamos mediante el marcador GFAP la interrupción de la BHE y extravasación de leucocitos al parénquima



cerebral con formación granulomatosa adyacente de estos sitios con células CD11c+, TLR4+, TLR2+ en la periferia de granulomas de 30 días post infección.

Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno profesionales capaces de inducir respuestas inmunitarias protectoras (Tizard *et al.*, 2019). Se ha demostrado claramente la importancia de las CD como productoras de IFN- $\gamma$  en la respuesta inmunitaria intestinal en la infección oral por *E. cuniculi*, induciendo una respuesta de linfocitos intraepiteliales eficiente (Weiss *et al.*, 2022). En estos estudios se demostró que la activación de CD depende de TLR4 para regular la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y MHC-II, necesarias para la inducción de la inmunidad de células T CD8 (Weiss *et al.*, 2022). Las CD desempeñan un papel importante en varias enfermedades granulomatosas como en la tuberculosis, leishmaniasis y la esquistosomiasis (Boros *et al.*, 2013). El reclutamiento de CD derivadas de monocitos (MO-DC) al cerebro depende de CCR5 y de la expresión de ligandos de quimiocinas, una vez que llegan las MO-DC producen ligandos CXCR3, atraen linfocitos CD8+ y producen metabolitos tóxicos que juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades (Hirako *et al.*, 2019). Es importante destacar que no hay evidencia de que las CD residan en el parénquima sano del SNC (Correale *et al.*, 2011). Las células CD11b+ y CD11c+ se detectan fácilmente en las meninges del SNC y plexo coroideo (Agostino *et al.*, 2012). Las CD son abundantes en el SNC inflamado, observándose principalmente después de la interrupción de la BHE, lo que sugiere que muchas se derivan de la periferia, mientras que otras representan microglía residente inducida a expresar tales marcadores por citoquinas expresadas localmente como GM-CSF, IL-1, IL-13, IFN- $\alpha$  (Duddy *et al.*, 2001; Ransohoff *et al.*, 2012). Lo anterior coincidió con nuestro estudio en el cual observamos mediante el marcador GFAP la interrupción de la BHE y extravasación de leucocitos al parénquima cerebral con formación granulomatosa adyacente de estos sitios con células CD11c+, TLR4+ y TLR2+ en la periferia de granulomas de 30 días post infección.

Las células B tienen funciones principales de secreción de anticuerpos a través de las células plasmáticas, secretar IL-10 o responder a LPS mediante la secreción de factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e IL-3. Además, tienen un rol importante en enfermedades inflamatorias agudas o crónicas a través de producción

de moléculas inmunomoduladoras como IL-10, IL-13 y IL-35 (Hunter *et al.*, 2022). Las células B facilitan la fagocitosis y actividad microbicida al asociarse con macrófagos M1 para producir citocinas proinflamatorias (Pereira *et al.*, 2019). No existen estudios sobre la participación de células B en el microambiente del granuloma microsporidiano. En este estudio, detectamos por primera vez células positivas a CD20 participando en el granuloma microsporidiano. En el grupo control, las células CD20 estaban ausentes en el parénquima cerebral. En cambio, a los 30 días post infección, las células CD20 positivas se ubicaron en la periferia de los granulomas, en las leptomeninges y en infiltrados perivasculares intraparenquimatosos. Su presencia a este tiempo de infección pudiera deberse a que estén cumpliendo funciones para el desarrollo del granuloma y regulen la interacción huésped-patógeno como en la tuberculosis (Phuah *et al.*, 2012). El análisis del conteo de células CD20 positivas en este grupo mostró una diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) comparado con los demás grupos experimentales. Observamos que las células B están en estrecho contacto con las células CD11c positivas en la periferia de los granulomas y también con los macrófagos. Esta ubicación pudiera deberse a que las células B modulan la formación y función del granuloma a través de la interacción con los demás componentes celulares, como se ha observado en infecciones granulomatosas por tuberculosis (Boros *et al.*, 2013). Las células B se filtran en los pulmones y cerebro de ratones y humanos infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, donde se organizan en folículos de células B ectópicas en la periferia de los granulomas, en estos sitios predomina la proliferación celular, en estrecho contacto con células T y macrófagos (Zaharie *et al.*, 2020). Está bien descrito que las células B son componentes celulares de otras enfermedades granulomatosas (Boros *et al.*, 2003). En el presente estudio, la presencia de células B a los 30 días post infección pudiera deberse a que están contribuyendo en la formación, función y modulación de la respuesta inmune dentro del granuloma cerebral microsporidiano a través de la interacción con macrófagos, células T, neutrófilos y astrocitos. En estudios *in vitro* se ha visto que las células B pueden contribuir en la polarización de macrófagos hacia M2 a través de la IL-10. Probablemente, las células B actúen en diferentes niveles en el granuloma microsporidiano, por ejemplo, contribuyendo a un nicho inmunosupresor dentro de los granulomas al inclinar los macrófagos hacia un perfil M2 como en la tuberculosis (Boros *et al.*, 2013), lo cual

coincide con la participación de macrófagos M2 hacia el centro del granuloma microsporidiano (Soto-Domínguez *et al.*, 2022). Para examinar directamente la función de las células B serían necesarios otros estudios comparando conejos inmunocompetentes frente a conejos deficientes en células B infectados con *E. cuniculi* y analizar las posibles consecuencias biológicas como en modelos con ratones XID (células B deficientes) (da Costa *et al.*, 2017). En este trabajo se demostró por primera vez que mediante inmunohistoquímica la participación de células B en granulomas de 30 días post infección, fueron localizadas principalmente en la periferia y en menor medida en el centro de los granulomas cerebrales de conejos infectados por *E. cuniculi*.

Las células NK son células inmunes innatas que tienen la capacidad de matar células infectadas por virus y células tumorales (Tizard *et al.*, 2019). Hay células NK limitadas al parénquima cerebral en condiciones normales, pero se ha demostrado que también se reclutan al parénquima cerebral en situaciones patológicas (Boros *et al.*, 2003). Las células NK residentes y reclutadas pueden activarse por IL-2, IL-15 e IL-19 para producir TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , perforina, granzimas y así poder lisar células blanco del huésped o directamente a los patógenos, como en infecciones causadas por *Cryptococcus neoformans* y matarlo directamente a través de la señalización ERK12 dependiente de PI3K (Wiseman *et al.*, 2007). Además, el  $\beta$ -1, 3-glucano, un componente de pared celular fúngica, se une a la NKp30 expresada en las células NK mediando la destrucción de *Cryptococcus neoformans*. Igualmente, las células NK secretan INF- $\gamma$  para activar macrófagos, llevando a la eliminación directa del hongo (Cheng *et al.*, 2022). En roedores, las células NK tienen un papel directo en la resistencia contra *Mycobacterium tuberculosis* (Feng *et al.*, 2006). Actualmente no se ha descrito la participación de células NK en el granuloma cerebral microsporidiano, por lo que fue de interés observarlas mediante inmunohistoquímica. El grupo control presentó células neuronales positivas para CD56, a los 30 días post infección las células CD56 positivas fueron células mononucleares que se ubicaron de forma diseminada en el granuloma, en los infiltrados mononucleares y en el parénquima cerebral adyacente, además, el análisis del conteo de células CD56 positivas en el grupo de 30 días post infección mostró diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) comparado con los demás grupos experimentales. Las células NK estuvieron en estrecho contacto con células dendríticas, macrófagos, células B y linfocitos en la periferia de los granulomas y en menor medida

hacia el centro, probablemente modulando en conjunto la actividad de lisis de células o atacando directamente a *E. cuniculi*, asimismo modulando a los macrófagos hacia un perfil M1. En modelos tuberculosos murinos, las células NK modulan la formación y función del granuloma a través de la interacción con los demás tipos celulares como macrófagos, linfocitos y células B (Boros *et al.*, 2013). En la esquistosomiasis, otra enfermedad granulomatosa, los huevos de *Schistosoma japonicum* inducen fibrosis hepática, pero las células NK secretan IFN- $\gamma$  para inducir apoptosis de células estrelladas hepáticas y bloquear el ciclo celular. Las células NK tienen un papel crítico en las primeras etapas de las infecciones por esquistosomiasis (Liu *et al.*, 2022; Hou *et al.*, 2012), lo cual coincide con lo visto a los 30 días post infección, tanto para el granuloma como para el parénquima cerebral, éstos muestran una alta cantidad de células CD56+ que pudieran expresar altas cantidades de IFN- $\gamma$  e inhibir la fibrosis. En tuberculosis, las células NK ayudan a controlar el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* a través de múltiples mecanismos y desempeñan un papel particularmente importante en personas inmunocomprometidas que carecen de la capacidad de generar respuestas suficientes de células T (Boros *et al.*, 2003). Está ampliamente descrito el papel de las células NK sobre *Mycobacterium tuberculosis*, ya que pueden inhibir su crecimiento liberando citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , producir proteínas citolíticas (perforina y granulisina), tener interacciones directas con receptores de superficie de las microbacterias (CD40/CD40L y Fas/FasL) y también cuentan con mecanismos indirectos mediados por IFN- $\gamma$  para dirigir macrófagos al provocar la activación de NADPH-oxidasa tipo 1 y tipo 2 (NOX1, 2), NOS2, lo que conduce a la formación de ROS y RON. Las células NK resultaron ser un componente importante para nuestro estudio, coincidiendo con otros estudios en otros órganos (Weiss *et al.*, 2022). Aunque cabe mencionar que se requieren más estudios para analizar el rol de las células NK en modelos de infección experimental deficientes en estas células y analizar el desarrollo del granuloma.

## 6. CONCLUSIONES

Los conejos infectados con esporas de *E. cuniculi* desarrollan lesiones granulomatosas en el SNC.

Los granulomas cerebrales se ubican en regiones del prosencéfalo y mesencéfalo desde los 15 días post infección y de forma diseminada en el encéfalo a los 30 días post infección, pero están ausentes a los 45 días post infección.

El granuloma cerebral microsporidiano carece de componentes de tejido conectivo.

La formación del granuloma cerebral microsporidiano involucra la participación de receptores TLR2 y TLR4 que promueven la extravasación de leucocitos como los macrófagos, las células B, las células NK y las CD para cumplir funciones en la respuesta inmune del granuloma.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdelhak, A., Foschi, M., Otto, M., Yue, J. K., D'Anna, L., Huss, A., Oeckl, P., Ludolph, A. C., Kuhle, J., Petzold, A., Manley, G. T., Green, A. J., & Tumani, H. (2022). Blood GFAP as an emerging biomarker in brain and spinal cord disorders. *Nature Reviews Neurology*, 18(3), 158-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00616-3>
2. Ackermann, M.R. 2017. Inflammation and Healing. En Zachary, J.J., *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. (6° Ed.) (pp. 73-131). St. Louis, Misuri, EUA: Elsevier, Inc.
3. Adams, L. B. & Krahenbuhl, J. L. 2003. Human Leprosy. En Boros, D. L. *Granulomatous infections and inflammations: cellular and molecular mechanisms*. (pp. 207-244). Washington, D.C., EUA: ASM Press.
4. Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, 96(3), 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
5. Boillat, M., Hammoudi, P. M., Dogga, S. K., Pagès, S., Goubran, M., Rodriguez, I., & Soldati-Favre, D. (2020). Neuroinflammation-Associated Aspecific Manipulation of Mouse Predator Fear by *Toxoplasma gondii*. *Cell Reports*, 30(2), 320-334.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.12.019>
6. Boos, G. S., Failing, K., Colodel, E. M., Driemeier, D., Castro, M. B. D., Bassuino, D. M., Diomedes Barbosa, J., & Herden, C. (2021). Glial Fibrillary Acidic Protein and Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1 Immunostaining Score for the Central Nervous System of Horses With Non-suppurative Encephalitis and Encephalopathies. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.660022>
7. Boros, D. L. 2003. *Granulomatous infections and inflammations: cellular and molecular mechanisms*. Washington, D.C., EUA: ASM Press
8. Boros, D.L. 2013. New perspectives on ancient granulomas. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00345>

9. Burda, J., & Sofroniew, M. (2014). Reactive Gliosis and the Multicellular Response to CNS Damage and Disease. *Neuron*, 81(2), 229-248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
10. Carty, M. P., & Bowie, A. R. (2011). Evaluating the role of Toll-like receptors in diseases of the central nervous system. *Biochemical Pharmacology*, 81(7), 825-837. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.01.003>
11. Casadevall, A., Coelho, C., & Alanio, A. (2018). Mechanisms of *Cryptococcus neoformans*-Mediated Host Damage. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00855>
12. Chen, Z., Zhong, D. & Li, G. The role of microglia in viral encephalitis: a review. *J Neuroinflammation* 16, 76 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1443-2>
13. Cheng, M. I., Chen, C., Engström, P., Portnoy, D. A., & Mitchell, G. (2018). Actin-based motility allows *Listeria monocytogenes* to avoid autophagy in the macrophage cytosol. *Cellular Microbiology*, 20(9). <https://doi.org/10.1111/cmi.12854>
14. Correale, J., Villa, A., & Garcea, O. (2011). *Neuroinmunología clínica* (1.a ed.). Editorial Médica Panamericana.
15. Cronan, M. R. (2022). In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820134>
16. Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A. & Joachim, A. 2009. Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitol. Res.*, 104: 629-635. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1239-2>
17. D'Agostino, P. M., Gottfried-Blackmore, A., Anandasabapathy, N., & Bulloch, K. (2012). Brain dendritic cells: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 124(5), 599-614. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1018-0>
18. da Costa, L. F. V., Alvares-Saraiva, A. M., Dell'Armeline Rocha, P. R., Spadacci-Morena, D. D., Perez, E. C., Mariano, M., & Lallo, M. A. (2017). B-1 cell decreases susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *Immunobiology*, 222(2), 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.09.018>

19. Dalboni LC, Alvares Saraiva AM, Konno FTdC, Perez EC, Codeceira JF, Spadacci-Morena DD, et al. (2021) *Encephalitozoon cuniculi* aprovecha la eferocitosis para evadir la respuesta inmune. *PLoS ONE* 16 (3): e0247658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247658>
20. Dando, S. J., Mackay-Sim, A., Norton, R., Currie, B. J., St. John, J. A., Ekberg, J. A. K., Batzloff, M., Ulett, G. C., & Beacham, I. R. (2014). Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 691-726. <https://doi.org/10.1128/cmr.00118-13>
21. Dávila-Martínez, C., Castillo-Velázquez, U., Soto-Domínguez, A., Nevárez-Garza, A., Arce-Mendoza, A., Hernandez-Vidal, G., Zamora-Avila, D., & Rodriguez-Tovar, L. (2020). Immunohistochemical localization of TNF- $\alpha$  and IL-4 in granulomas of immunocompetent and immunosuppressed New Zealand white rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Cytokine*, 130, 155055. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155055>
22. Díaz-Pérez, R. N., Castillo-González, J. A., Carcaño-Díaz, K., García-Juárez, J., Salazar-Leal, M. E., Muñoz-Maldonado, G. E., Montes-de-Oca-Luna, R., Saucedo-Cárdenas, O., & Soto-Domínguez, A. (2016). Histopathological alterations in the striatum caused by *Karwinskia humboldtiana* (Buckthorn) fruit in an experimental model of peripheral neuropathy. *Histology and histopathology*, 31(4), 393–402. <https://doi.org/10.14670/HH-11-681>
23. Didier, E. S., & Khan, I. A. (2014). The Immunology of Microsporidiosis in Mammals. In *Microsporidia* (pp. 307–325). John Wiley & Sons, Inc.
24. Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., & Shadduck, J. A. (1995). Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*, 111 (Pt 4), 411–421. <https://doi.org/10.1017/s0031182000065914>
25. Dokuchaeva, A. A., Mochalova, A. B., Timchenko, T. P., Podolskaya, K. S., Pashkovskaya, O. A., Karpova, E. V., Ivanov, I. A., Filatova, N. A., & Zhuravleva, I. Y. (2022). In Vivo Evaluation of PCL Vascular Grafts Implanted in Rat Abdominal Aorta. *Polymers*, 14(16), 3313. <https://doi.org/10.3390/polym14163313>



26. Doshi, N., Thet, Z., Han, T., & Martin, J. (2019). A Case of Intestinal Microsporidiosis in a Renal Transplant Recipient. *Journal of Medical Cases*, 10(8), 229-233. <https://doi.org/10.14740/jmc3340>
27. Drögemüller, K., Helmuth, U., Brunn, A., Sakowicz-Burkiewicz, M., Gutmann, D. H., Mueller, W., Deckert, M., & Schlüter, D. (2008). Astrocyte gp130 Expression Is Critical for the Control of Toxoplasma Encephalitis. *The Journal of Immunology*, 181(4), 2683-2693. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.4.2683>
28. Duddy, M. E., Dickson, G., Hawkins, S. A., & Armstrong, M. A. (2001). Monocyte-derived dendritic cells: a potential target for therapy in multiple sclerosis (MS). *Clinical and Experimental Immunology*, 123(2), 280-287. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01433.x>
29. Dvm, J. Z. F., PhD. (2021). *Pathologic Basis of Veterinary Disease* (7th ed.). Mosby.
30. Ehlers, Schaible UE (2013) The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. *Front. Immun.* 3:411. doi: 10.3389/fimmu.2012.00411
31. Eng LF, Gerstl B, Vanderhaeghen JJ. A study of proteins in old multiple sclerosis plaques. *Trans Am Soc Neurochem* 1970; 1: 42.
32. Feng, C. G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A. G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H. A., Wynn, T. A., & Sher, A. (2006). NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950), 177(10), 7086–7093. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7086>
33. Galea, I. (2021). The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(11), 2489-2501. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00757-x>
34. Galván, AL, Sánchez, AM, Valentín, MA, Henriques-Gil, N., Izquierdo, F., Fenoy, S., & del Aguila, C. (2011). Primeros casos de microsporidiosis en trasplantados en España y revisión de la literatura. *Revista de microbiología clínica*, 49 (4), 1301–1306. <https://doi.org/10.1128/JCM.01833-10>
35. González-Castillo, J. (2021). Identificación de marcadores celulares de macrófagos M1 y M2 mediante inmunohistoquímica en granulomas en encéfalo de conejos Nueva Zelanda infectados experimentalmente con esporas de Encephalitozoon

cuniculi. (Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia). Universidad Autónoma de Nuevo León.

36. 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
37. Greigert, V., Pfaff, AW, Abou-Bacar, A., Candolfi, E. y Brunet, J. (2018). Microsporidiosis intestinal en Estrasburgo de 2014 a 2016: aparición de un genotipo de *Enterocytozoon bienewisi* de origen asiático. *Microbios e infecciones emergentes* , 7 (1), 97. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0099-9>
38. Herrera Gutiérrez, A (2019). Expresión de receptores y genes de respuesta inmune innata de macrófagos murinos infectados experimentalmente con *Encephalitozoon cuniculi*. (Maestría en Ciencia Animal). Universidad Autónoma de Nuevo León.
39. Hirako, I. C., Assis, P. A., Galvão-Filho, B., Luster, A. D., Antonelli, L. R., & Gazzinelli, R. T. (2019). Monocyte-derived dendritic cells in malaria. *Current Opinion in Microbiology*, 52, 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.002>
40. 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.
41. Hou, X., Yu, F., Man, S., Huang, D., Zhang, Y., Liu, M., Ren, C., & Shen, J. (2012). Negative Regulation of *Schistosoma japonicum* Egg-Induced Liver Fibrosis by Natural Killer Cells. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(1), e1456. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001456>
42. Hunter, L., Hingley-Wilson, S., Stewart, G. R., Sharpe, S. A., & Salguero, F. J. (2022). Dynamics of Macrophage, T and B Cell Infiltration Within Pulmonary Granulomas Induced by *Mycobacterium tuberculosis* in Two Non-Human Primate Models of Aerosol Infection. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.776913>
43. Hwang, I. K., Choi, J., Li, H., Yoo, K., Kim, D. W., Lee, C. H., Yi, S. Y., Seong, J. K., Lee, I., Yoon, Y. S., & Won, M. H. (2008). Changes in Glial Fibrillary Acidic

Protein Immunoreactivity in the Detate Gyrus and Hippocampus Proper of Adult and Aged Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.965>

44. Jeklová, E., Levá, L., Kummer, V., Jekl, V., & Faldyna, M. (2019). Immunohistochemical Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in Ocular Structures of Immunocompetent Rabbits. *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(11), 988. <https://doi.org/10.3390/ani9110988>
45. Jeklova, 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*. *Veterinary research*, 51(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00806-9>
46. Kicia, M., Wesolowska, M., Jakuszko, K., Kopacz, Z., Sak, B., Květonova, D., Krajewska, M., & Kváč, M. (2014). Concurrent infection of the urinary tract with *Encephalitozoon cuniculi* and *Enterocytozoon bieneusi* in a renal transplant recipient. *Journal of clinical microbiology*, 52(5), 1780–1782. <https://doi.org/10.1128/JCM.03328-13>
47. Kim, J. W., Nam, S. M., Yoo, D. Y., Jung, H. Y., Hwang, I. K., Seong, J. K., & Yoon, Y. S. (2018). Strain-specific differential expression of astrocytes and microglia in the mouse hippocampus. *Brain and Behavior*, 8(5), e00961. <https://doi.org/10.1002/brb3.961>
48. Kitz, S., Grimm, F., Wenger, S., Hatt, J., Kipar, A., & Hetzel, U. (2018). *Encephalitozoon cuniculi* infection in Barbary striped grass mice (*Lemniscomys barbarus*). *Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde*, 160(6), 394-400. <https://doi.org/10.17236/sat00166>
49. Klemens, J., Ciurkiewicz, M., Chludzinski, E., Iseringhausen, M., Klotz, D., Pfankuche, V. M., Ulrich, R., Herder, V., Puff, C., Baumgärtner, W., & Beineke, A. (2019). Neurotoxic potential of reactive astrocytes in canine distemper demyelinating leukoencephalitis. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48146-9>
50. Kotková, M., Sak, B., Hlásková, L., Květoňová, D., & Kváč, M. (2018). Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine

model. *Experimental Parasitology*, 193, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.001>

51. Krautwald-Junghanns, M., Pees, M., Reese, S., & Tully, T. (2011). *Diagnostic Imaging of Exotic Pets: Birds - Small Mammals - Reptiles*. Schluetersche.
52. Künzel, F. & Joachim, A. 2010. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol. Res.*, 106: 299-309. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1679-3>
53. Künzel, F., & Fisher, P. G. (2018). Clinical Signs, Diagnosis, and Treatment of Encephalitozoon cuniculi Infection in Rabbits. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 21(1), 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2017.08.002>
54. Latney L, Bradley C, Wyre N. Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Vet Med (Auckl)*. 2014;5:169-180 <https://doi.org/10.2147/VMRR.S49842>
55. Leipig, M., Matiasek, K., Rinder, H., Janik, D., Emrich, D., Baiker, K. & Hermanns, W. 2013. Value of histopathology, immunohistochemistry, and real-time polymerase chain reaction in the confirmatory diagnosis of Encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(1): 16-26. <https://doi.org/10.1177/1040638712466394>
56. Liebich, H. (2019). *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds: Textbook and Colour Atlas* (5th ed.). 5m Publishing.
57. Liu, Y., Xu, J., Wu, M., Xu, B., & Kang, L. (2021). Empagliflozin protects against atherosclerosis progression by modulating lipid profiles and sympathetic activity. *Lipids in health and disease*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12944-021-01430-y>
58. Maestrini, G., Ricci, E., Cantile, C., Mannella, R., Mancianti, F., Paci, G., D'Ascenzi, C., & Perrucci, S. (2017). Encephalitozoon cuniculi in rabbits: Serological screening and histopathological findings. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50, 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.11.012>
59. Magalhães, T. R., Pinto, F. F., & Queiroga, F. L. (2022). A multidisciplinary review about Encephalitozoon cuniculi in a One Health perspective. *Parasitology Research*, 121(9), 2463-2479. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07562-z>

60. Maxie, M. G. (2016). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. Elsevier Gezondheidszorg.
61. McCully, R. M., Van Dellen, A., Basson, P. A., & Lawrence, J. (1978). Observations on the pathology of canine microsporidiosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 45(2), 75-91.
62. Michaela Kotková, Bohumil Sak, Lenka Hlásková, Dana Květoňová, Martin Kváč, Evidence of transplacental transmission of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in murine model, *Experimental Parasitology*, Volume 193, 2018, Pages 51-57, ISSN 0014-4894, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.001>
63. Montgomery, D. C. (2005). *Diseño y análisis de experimentos*. Wiley.
64. Morsy, E. A., Salem, H. M., Khattab, M. S., Hamza, D. A., & Abuowarda, M. M. (2020). *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed rabbits in Egypt. *Acta veterinaria Scandinavica*, 62(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-0509-6>
65. Mouton, P. R. (2014). *Neurostereology: Unbiased Stereology of Neural Systems*. Wiley-Blackwell.
66. Nevárez Garza, A. M. (2017). *Expresión cuantitativa de citocinas pro y antiinflamatorias en granulomas de conejos infectados con Encephalitozoon cuniculi mediante PCR en tiempo real. (Maestría en Ciencia Animal)*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
67. Niesman, I. R., Schilling, J. M., Shapiro, L. A., Kellerhals, S. E., Bonds, J. A., Kleschevnikov, A. M., Cui, W., Voong, A., Krajewski, S., Ali, S. S., Roth, D. M., Patel, H. H., Patel, P. M., & Head, B. P. (2014). Traumatic brain injury enhances neuroinflammation and lesion volume in caveolin deficient mice. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-39>
68. Osofsky, A., LeCouteur, R. A., & Vernau, K. M. (2007). Functional Neuroanatomy of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 10(3), 713-730. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2007.04.007>
69. Ozkan, O., & Alcigir, M. E. (2018). *Encephalitozoonosis* infection in a traditional rabbit farm with neurological manifestations. *Veterinary Parasitology*, 262, 26-29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.09.009>

70. Pagán, A.J. & Ramakrishnan, L. 2018. The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology*, 36: 639-645. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100022>
71. Pereira, A., Alvares-Saraiva, A. M., Konno, F. T. C., Spadacci-Morena, D. D., Perez, E. C., Mariano, M., & Lallo, M. A. (2019). B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile ameliorates microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(9), e0007674. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007674>
72. Phuah, J. Y., Mattila, J. T., Lin, P. L., & Flynn, J. L. (2012). Activated B Cells in the Granulomas of Nonhuman Primates Infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *American Journal of Pathology*, 181(2), 508-514. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.05.009>
73. Quintana, F. C., Yeste, A., & Mascalfroni, I. D. (2015). Role and therapeutic value of dendritic cells in central nervous system autoimmunity. *Cell Death & Differentiation*, 22(2), 215-224. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.125>
74. Ramakrishnan, L. 2012. Revisiting the Role of the Granuloma in Tuberculosis. *Nature Reviews*, 12: 352-366. <https://doi.org/10.1038/nri3211>
75. Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1164-1171. <https://doi.org/10.1172/jci58644>
76. Ransohoff, R. M., & Brown, M. A. (2012b). Innate immunity in the central nervous system. *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), 1164-1171. <https://doi.org/10.1172/jci58644>
77. Rauf, A., Badoni, H., Abu-Izneid, T., Olatunde, A., Rahman, M. M., Painuli, S., Semwal, P., Wilairatana, P., & Mubarak, M. S. (2022). Neuroinflammatory Markers: Key Indicators in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 27(10), 3194. <https://doi.org/10.3390/molecules27103194>
78. Reiling, N., Hölscher, C., Fehrenbach, A., Kröger, S., Kirschning, C. J., Goyert, S., & Ehlers, S. (2002). Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium*

tuberculosis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 169(7), 3480–3484.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3480>

79. Rivest S. (2003). Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain, behavior, and immunity*, 17(1), 13–19. [https://doi.org/10.1016/s0889-1591\(02\)00055-7](https://doi.org/10.1016/s0889-1591(02)00055-7)
80. 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. *Journal of Pathogens*, 2016:5768428. <https://doi.org/10.1155/2016/5768428>
81. Rodríguez-Tovar, L. E., Villarreal-Marroquín, A., Nevárez-Garza, A. M., Castillo-Velázquez, U., Rodríguez-Ramírez, H. G., Navarro-Soto, M. C., Zárate-Ramos, J. J., Hernández-Vidal, G. & Trejo-Chávez, A. 2017. Histochemical study of Encephalitozoon cuniculi spores in the kidneys of naturally infected New Zealand rabbits. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(3): 269-277. <https://doi.org/10.1177/1040638716668559>
82. Santaniello A, Cimmino I, Dipineto L, Agognon AL, Beguinot F, Formisano P, Fioretti A, Menna LF, Oriente F. Zoonotic Risk of Encephalitozoon cuniculi in Animal-Assisted Interventions: Laboratory Strategies for the Diagnosis of Infections in Humans and Animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021; 18(17):9333. <https://doi.org/10.3390/ijerph18179333>
83. Schneider, N. Y., Datiche, F., & Coureaud, G. (2018). Brain anatomy of the 4-day-old European rabbit. *Journal of Anatomy*, 232(5), 747-767. <https://doi.org/10.1111/joa.12789>
84. Selçuk, M. L., & Tıpırdamaz, S. (2020). A morphological and stereological study on brain, cerebral hemispheres and cerebellum of New Zealand rabbits. *Anatomia, histologia, embryologia*, 49(1), 90–96. <https://doi.org/10.1111/ah.12489>
85. Shek, J. W., Wen, G. Y., & Wisniewski, H. M. (1986). *Atlas of the Rabbit Brain and Spinal Cord*. Karger.
86. Sholeye, A. R., Williams, A. A., Loots, D. T., Tutu van Furth, A. M., van der Kuip, M., & Mason, S. (2022). Tuberculous Granuloma: Emerging Insights From

Proteomics and Metabolomics. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.804838>

87. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2009). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7-35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
88. Soto-Domínguez, A., Dávila-Martínez, C., Castillo-Velázquez, U., Nevárez-Garza, A.M., Rodríguez-Rocha, H., Saucedo-Cárdenas, O., Arce-Mendoza, A.Y., Zárate-Ramos, J.J. & Rodríguez-Tovar, L.E. 2020. Variation of the CD4, CD8 and MHC II cell population in granulomas of immunocompetent and immunosuppressed rabbits in *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 68: 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101387>
89. Springer, A., Heuer, L., Janecek-Erfurth, E., Beineke, A., & Strube, C. (2019). Histopathological characterization of *Toxocara canis*- and *T. cati*-induced neurotoxocarosis in the mouse model. *Parasitology Research*, 118(9), 2591-2600. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06395-7>
90. Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. McGraw-Hill Education.
91. Stenzel, W., Soltek, S., Sanchez-Ruiz, M., Akira, S., Miletic, H., Schlüter, D., & Deckert, M. (2008). Both TLR2 and TLR4 Are Required for the Effective Immune Response in *Staphylococcus aureus*-Induced Experimental Murine Brain Abscess. *The American Journal of Pathology*, 172(1), 132-145. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070567>
92. Suvarna, K. S., PhD, L. C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques: Expert Consult: Online and Print (8th ed.)*. Elsevier.
93. Tamim El Jarkass, H., & Reinke, A. W. (2020). The ins and outs of host-microsporidia interactions during invasion, proliferation and exit. *Cellular microbiology*, 22(11), e13247. <https://doi.org/10.1111/cmi.13247>
94. Tizard, I.R. 2018. *Veterinary Immunology (10a ed.)*. Missouri, EUA: Elsevier Saunders.
95. Trotta, T., Porro, C., Calvello, R., & Panaro, M. A. (2014). Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *Journal of Neuroimmunology*, 268(1-2), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.01.014>



96. Turner, O. C., Basaraba, R. J., & Orme, I. M. (2003). Immunopathogenesis of Pulmonary Granulomas in the Guinea Pig after Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, 71(2), 864-871. <https://doi.org/10.1128/iai.71.2.864-871.2003>
97. Urriza Ripa, Ilargi, Villarreal Calvo, María, Álvarez García, Jorge, Durán Urdániz, Gabriel, Ramos Arroyo, María Antonia, & Herranz Aguirre, Mercedes. (2016). Enfermedad de Bruton de diagnóstico precoz: importancia de una adecuada historia clínica y los antecedentes familiares. *Pediatría Atención Primaria*, 18(71), e111-e114. Recuperado en 19 de julio de 2021, de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1139-76322016000300013&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322016000300013&lng=es&tlng=es).
98. Vásquez Tsuji, Oscar, Rodríguez Herrera, Raymundo, Campos Rivera, Teresita, Mora Tiscareño, María Antonieta, Aguirre Maldonado, Emilio, Yamazaki Nakashimada, Marco Antonio, Valencia Rojas, Silvia, & Martínez Barbosa, Ignacio. (2001). Microsporidiosis generalizada por *Encephalitozoon* sp. en un paciente pediátrico con enfermedad de Bruton. *Boletín chileno de parasitología*, 56(1-2), 16-21. <https://dx.doi.org/10.4067/S0365-94022001000100005>
99. Verastegui, M. R., Mejia, A., Clark, T., Gavidia, C. M., Mamani, J., Ccopa, F., Angulo, N., Chile, N., Carmen, R., Medina, R., García, H. H., Rodriguez, S., Ortega, Y., & Gilman, R. H. (2015). Novel Rat Model for Neurocysticercosis Using *Taenia solium*. *The American Journal of Pathology*, 185(8), 2259-2268. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.015>
100. Waller, R., Baxter, L., Fillingham, DJ, Coelho, S., Pozo, JM, Mozumder, M., Frangi, AF, Ince, PG, Simpson, JE y Highley, JR (2019). La microglía Iba-1- / CD68 + es una característica destacada de las lesiones subcorticales profundas de la sustancia blanca asociadas a la edad. *PloS uno* , 14 (1), e0210888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210888>
101. Wang, H., Maeda, Y., Fukutomi, Y. & Makino, M. 2013. An in vitro model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma infection. *BMC Infect Dis*, 13:279. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-279>

- 102.** Weiss, L. M., & Becnel, J. J. (2014). *Microsporidia: Pathogens of Opportunity*. Wiley.
- 103.** Weiss, L. M., & Reinke, A. W. (2022). *Microsporidia: Current Advances in Biology*. Springer Publishing.
- 104.** Wilke, W. L., Frandson, R. D., & Fails, A. D. (2009). *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Wiley.
- 105.** Wiseman, J. C. D., Ma, L. L., Marr, K. J., Jones, G. J., & Mody, C. H. (2007). Perforin-Dependent Cryptococcal Microbicidal Activity in NK Cells Requires PI3K-Dependent ERK1/2 Signaling. *The Journal of Immunology*, 178(10), 6456-6464. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6456>
- 106.** Yang, Z. y Wang, KK (2015). Proteína ácida fibrilar glial: desde el ensamblaje del filamento intermedio y la gliosis hasta el neurobiomarcador. *Tendencias en neurociencias* , 38 (6), 364–374. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>
- 107.** Zaharie, S. D., Franken, D. J., van der Kuip, M., van Elsland, S., de Bakker, B. S., Hagoort, J., Roest, S. L., van Dam, C. S., Timmers, C., Solomons, R., van Toorn, R., Kruger, M., & Marceline van Furth, A. (2020). The immunological architecture of granulomatous inflammation in central nervous system tuberculosis. *Tuberculosis*, 125, 102016. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2020.102016>
- 108.** Zhao, S., Zhang, Z., Xu, D., Wang, Y., & Li, L. (2020). Selective Loss of Brain-Derived Neurotrophic Factor Exacerbates Brain Injury by Enhancing Neuroinflammation in Experimental *Streptococcus pneumoniae* Meningitis. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01357>

## APÉNDICE

### A. Técnicas y métodos

#### A.1. Propagación de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en cultivo celular Vero

Cultivo de células Vero:

1. Descongelar crio vial y temperar a 37°C.
2. Sembrar células en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.
3. Mantener en RPMI 1640 suplementado con 10% FBS y 1% antibiótico-antimicótico, a 37°C en una incubadora con 5% CO<sub>2</sub>.
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 10<sup>6</sup> 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 centrífuga.
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 microcentrífuga 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.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 a 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 de 100X con aceite de inmersión.

### **A.3. Tinción de Tricromo modificada o técnica de Weber (heces y orina).**

Pasos previos:

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

Proceso:

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

2.- Sumergir en metanol por 5 minutos.

3.- Secar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.

4.- Sumergir en Azul de Tricromo por 90 minutos.

5.- Escurrir el exceso (no demorar).

6.- Sumergir dentro de alcohol acido por 10 segundos. Después, dejar escurrir.

7.- Pasar la canastilla por dos recipientes con alcohol al 95%, cinco minutos cada uno.

8.- Dejar escurrir.

9.- Introducir en alcohol al 100% por 10 minutos, después de esto escurrir.

10.- Aclarar con xilol por otros 10 minutos.

11.- Escurrir la canastilla y dejar secar sobre una toalla de papel en un área ventilada.

12.- Montar con resina sintética.

13.- Etiquetar y dejar reposar una noche.

#### **A.4. Inclusión en parafina**

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

#### **A.5. Tinción de hematoxilina y eosina**

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

## **A.6. Tinción Violeta rápido de Cresilo**

**Fijación:** Alcohol, solución de Carnoy o solución de formol.

**Técnica:** Cortes en parafina gruesos (7 a 15  $\mu\text{m}$  de espesor).

### **Protocolo.**

1. Desparafinar las laminillas 20 minutos en estufa a 57°C.
2. Colocar las laminillas en Xilol 100% por 5 minutos.
3. Colocar las laminillas en Xilol-etanol 100% por 5 minutos.
4. Colocar las laminillas en alcohol 96% por 2 minutos
5. Colocar las laminillas en agua destilada por 2 minutos
6. Colocar las laminillas en violeta rápido de cresilo de 30 minutos.
7. Lavar con agua destilada.
8. Diferenciar en solución de ácido acético al 0.25% hasta que se haya removido el colorante (4-8 segundos).
9. Lavar y diferenciar en 2 cambios de alcohol 96% por 2 minutos c/u.
10. Pasar rápido en alcohol-xilol, revisar al microscopio.
11. Repetir los pasos 8 y 9 en caso de ser necesario.
12. Deshidratar y montar.

### **RESULTADOS:**

- **Sustancia de Nissl:** Azul púrpura obscuro.
- **Neuronas:** Azul púrpura pálido
- **Núcleo:** Azul púrpura

## **A.7. Método Klüver-Barrera**

**Fijación:** Formalina en buffer neutro al 10%

**Técnica:** Cortes de 7 a 15  $\mu\text{m}$  de espesor.

### **Protocolo.**

1. Desparafinar las laminillas 20 minutos en estufa a 57°C.
2. Colocar las laminillas en Xilol 100% por 5 minutos.
3. Colocar las laminillas en Xilol-etanol 100% por 5 minutos.
4. Colocar las laminillas en alcohol 96% por 2 minutos.
5. Pasar las laminillas a solución de Azul de Luxol (0.1%) y dejar toda la noche a temperatura ambiente, o en estufa a 57° C durante 90 minutos.
6. Enjuagar en alcohol 96% para remover el exceso de colorante.
7. Lavar en agua destilada hasta que la muestra deje de desteñirse
8. Revisar al microscopio y determinar el grado de sobrecoloración
9. Diferenciar enseguida por medio de una rápida inmersión en solución de carbonato de litio 0.05% (5-10 segundos).
10. Continuar la diferenciación en alcohol 70% (Opcional) hasta que la sustancia gris y blanca se distinga (Revisar a microscopio).
11. Lavar en agua destilada.
12. Repetir los pasos 9-11 en caso de no obtener un buen contraste.
13. Pasar las muestras en solución de violeta de cresilo 0.1% de 5 a 10 minutos.
14. Lavar y diferenciar en 2 cambios de alcohol 96% por 2 minutos c/u.
15. Deshidratar en 2 cambios de alcohol 100% por 2 minutos c/u.
16. Aclarar en 2 cambios de Xilol 100% por 2 minutos c/u.
17. Montar en resina Entellan.

### **RESULTADOS:**

**Mielina:** Azul intenso.

**Células nerviosas y gliales:** En tonos de rosa a violeta.



### **A.8. Tinción Tricrómico de Masson.**

Cortes de 5  $\mu\text{m}$ .

Protocolo:

1. Desparafinar con xilol e hidratar hasta llegar a agua destilada.
2. Usar como mordente el fijador de Bouin por 60 minutos a 57°C o toda la noche a temperatura ambiente.
3. Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
4. Enjuagar los cortes en agua destilada.
5. Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 minutos.
6. Lavar en agua corriente por 5 minutos o hacer 3 cambios de 15 segundos.
7. Enjuagar en agua destilada.
8. Teñir con la solución de fucsina escarlata por 5 segundos.
9. Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
10. Pasar los cortes a la solución de ácido fosfolímdico-fosfotúngstico durante 10 minutos.  
Enjuagar brevemente con agua destilada.
11. Teñir con la solución de azul de anilina durante 15 segundos.
12. Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
13. Pasar el ácido acético por 1 a 2 minutos.
14. Deshidratar en alcohol al 96% por unos segundos y cuidar que no se decolore.
15. Continuar con el alcohol absoluto hasta aclarar en xilol y montar en resina.

## **A.9. Tinción Pentacrómico de Movat (Russell-Movat Modificado)**

### **Procedimiento**

#### **Protocolo**

Preparar los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso y agitar suavemente.

1. Desparafinar las secciones e hidratar con agua destilada
2. Teñir con la solución de tinción elástica por 20 minutos.
3. Enjuagar con agua del grifo hasta quitar el exceso de la laminilla.
4. Sumergir las laminillas en solución diferenciadora de cloruro férrico (2%) de 15 a 20 veces y enjuagar con agua del grifo.
5. Comprobar al microscopio para una diferenciación adecuada, (repetir paso 4 si es necesario).
6. Enjuagar con 2 cambios de agua destilada.
7. Colocar la laminilla en la solución de tiosulfato de sodio (5%) e incubar por 1 minuto.
8. Enjuagar con agua del grifo por 2 minutos seguido de dos cambios en agua destilada.
9. Colocar la laminilla en solución de ácido acético (3%) e incubar por 2 minutos para equilibrar el tejido antes de teñir con la solución de azul alcian, pH 2.5.
10. Sin enjuagar, colocar la laminilla en solución de azul alcian, pH 2.5 e incubar por 25 minutos.
11. Enjuagar con agua del grifo por 2 minutos seguido de 2 cambios de agua destilada.
12. Colocar la laminilla en la solución de fucsina ácida escarlata de Biebrich e incubar por 2 minutos.
13. Enjuagar la laminilla en 2 cambios de agua destilada.
14. Colocar la laminilla en la solución de ácido acético (1%) por 5-10 segundos con agitación.
15. Enjuagar rápidamente con agua destilada.
16. Diferenciar el portaobjetos en 2 cambios de solución de ácido fosfotúngstico (5%) por 3 a 7 minutos cada uno.
17. Comprobar las laminillas al microscopio para ver si se diferencian correctamente, el colágeno debe ser transparente pero las fibras elásticas aún deben estar teñidas. Repetir el paso 15 si es necesario.
18. Enjuagar la laminilla brevemente con agua destilada.

19. Sumergir la laminilla varias veces (3-5 segundos) en solución de ácido acético (1%).
20. Sacudir el exceso de solución de ácido acético (1%) y sin enjuagar aplicar la solución amarilla de Metanil e incubar por 15 minutos.
21. Enjuagar el portaobjetos en 3 cambios de alcohol absoluto.
22. Limpiar y montar en resina sintética.

### **RESULTADOS:**

**Fibras elásticas:** negro a azul/negro

**Núcleo:** azul/negro

**Colágeno:** amarillo a rojo

**Fibras reticulares:** Amarillo

**Mucina:** azul brillante

**Fibrina:** rojo brillante

**Musculo:** rojo

**Tejido control:** Pulmón, piel, colon, corazón, o cualquier tejido vascular.

#### **A.10. HC de esporas en tejido**

Pasos previos:

- 1.- Obtener las secciones fijadas en laminillas recubiertas con poli-L-lisina y secadas por no menos de 4 horas.
- 2.- Comenzar a calentar el Buffer de Citratos (pH 6, Ac. cítrico 10Mm) hasta que alcance los 80°C.
- 3.- Preparar una cámara húmeda a 35-40°C.
- 4.- En caso necesario, colocar las laminillas en una rejilla de metal para realizar los pasos iniciales (pasos 1,2 y 3 del procedimiento).

Procedimiento:

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

- 11.- Lavar gentilmente con PBS.
- 12.- Agregar Anticuerpo secundario, cubrir la muestra con el anticuerpo secundario conjugado a biotina (1:50) (2 gotas o 100µl) e incubar dentro de la cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente.
- 13.- Lavar con PBS.
- 14.- Agregar el reactivo que contiene el complejo enzima- biotina avidina e incubar dentro de la cámara húmeda por 30 minutos.
- 15.- Lavar con PBS y agregar el sustrato de peroxidasa por 3-7 minutos (cuando se genere la reacción deseada. ¡Carcinogénico! Utilizar guantes y protección necesarios). Contrateñir.
- 16.- Lavar con agua de la llave.
- 17.- Deshidratar con alcoholes graduales (70%, 96%, 100% y 100%) y aclarar con xilol. 5 minutos c/u.
- 18.- Montar con resina sintética.

#### **A.11. Sistema de detección LSAB: Protocolo TLR2, TLR4.**

- 4.- Recuperar los antígenos con el buffer de citratos, 80 min a 80°C (se puede apagar la placa calefactora 15 min antes de culminar dicho tiempo, sin afectar el proceso) (Placa a 170°C).
5. Lavado con PBS, 5 min
- 5.- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 30 min en coppling.
- 6.- Lavar con PBS, 5 min.
7. Bloqueo con avidina 15 minutos en cámara húmeda
8. Lavar con PBS, 5 min
9. Bloqueo con biotina 15 minutos en cámara húmeda
10. Lavar con PBS 5 min
- 11.- Bloquear sitios de unión inespecíficos, 45 min en cámara húmeda después y escurrir (no lavar).
- 12.- Añadir anticuerpo Primario, en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C, por una noche.
- 13.- Lavar con PBS 3-5 min y volver a calentar la cámara húmeda.
- 14.- Añadir Ac secundario, 45 min en cámara húmeda.
- 15.- Lavar con PBS, 5 min.
- 16.- Añadir ABC, 45 min en cámara húmeda.
- 17.- Lavar con PBS, 5 min y retirar exceso de líquido antes de siguiente paso.
- 18.- Revelar con solución sustrato-cromógeno, estandarizar tiempos (2 min).
- 19.- Lavar con agua destilada, 2 min dos veces.
- 20.- Contrateñir con Hematoxilina de Harrys, 40 segundos.
- 21.- Lavar con agua corriente y con un flujo constante.
- 22.- Enjuagar en agua destilada.

**A. 12. Sistema de detección LSAB: Protocolo Células B (CD20), células NK (CD56)  
(usar cortes de 4  $\mu\text{m}$ )**

- 1.- Recuperar los antígenos con el buffer de citratos, calentar 20 minutos sin las laminillas (90°C), después 10 minutos con las laminillas (90°C) y dejar enfriar 10 minutos (Placa a 220°C).
2. Lavado con PBS, 5 min
- 3.- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 30 min en coppling.
- 4.- Lavar con PBS, 5 min.
- 5.- Bloquear sitios de unión inespecíficos, 30 min en cámara húmeda después y escurrir (no lavar).
- 6.- Añadir anticuerpo Primario, en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C, por una noche.
- 7.- Lavar con PBS 3-5 min y volver a calentar la cámara húmeda.
- 8.- Añadir Ac secundario, 30 min en cámara húmeda.
- 9.- Lavar con PBS, 5 min.
- 10.- Añadir ABC, 30 min en cámara húmeda.
- 11.- Lavar con PBS, 5 min y retirar exceso de líquido antes de siguiente paso.
- 12.- Revelar con solución sustrato-cromógeno, estandarizar tiempos (2 min).
- 13.- Lavar con agua destilada, 2 min dos veces.
- 14.- Contrateñir con Hematoxilina de Harrys, 40 segundos.
- 15.- Lavar con agua corriente y con un flujo constante.
- 16.- Enjuagar en agua destilada.
- 17.- deshidratar, aclarar y montar.

### **A.13. Sistema de detección LSAB: Protocolo GFAP (usar cortes de 4 $\mu\text{m}$ )**

- 1.- Recuperar los antígenos con el buffer de citratos, calentar 20 minutos a (95°C), dejar enfriar 10 minutos.
2. Lavado con PBS, 5 min (en todos los lavados realizar 5 inmersiones y continuar con el siguiente paso).
- 3.- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, 10 min en coppling.
- 4.- Un Lavado con PBS, 5 min.
- 5.- Bloquear sitios de unión inespecíficos, 30 min en cámara húmeda, solo escurrir (no lavar).
- 6.- Añadir anticuerpo Primario, en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C, por una noche (1:1000).
- 7.- Lavar con PBS 5 min y volver a calentar la cámara húmeda. 8.- Añadir Ac secundario, 30 min en cámara húmeda.
- 9.- Lavar con PBS, 5 min.
- 10.- Añadir ABC, 30 min en cámara húmeda.
- 11.- Lavar con PBS por 5 min y retirar exceso de líquido antes de siguiente paso.
- 12.- Revelar con solución sustrato-cromógeno (3 min).
- 13.- Lavar con agua destilada, 2 min tres veces.
- 14.- Contrateñir con Hematoxilina de Harrys, 2 minutos.
- 15.- Lavar con agua corriente y con un flujo constante.
- 16.- Enjuagar en agua destilada.
- 17.- deshidratar, aclarar y montar.



#### **A.14. Sistema de detección LSAB: Protocolo CD11c**

- 1.- Recuperar los antígenos con el buffer de citratos, 60 min a 65°C, enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente.
2. Un lavado con PBS por 5 min .
- 3.- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, 30 min en coppling.
- 4.- Un lavado con PBS, 5 min.
- 7.- bloqueo con avidina 15 minutos en cámara húmeda
- 5.- Un lavado con PBS, 5 minutos
6. bloqueo con biotina 15 minutos en cámara húmeda.
- 7.- Un lavado con PBS 5 minutos.
- 8.- Bloquear sitios de unión inespecíficos, 45 min en cámara húmeda después y escurrir (no lavar).
- 9.- Añadir anticuerpo Primario, en cámara húmeda y en refrigeración a 4°C, por una noche.
- 10.- Lavar con PBS 3-5 min y volver a calentar la cámara húmeda.
- 11.- Añadir Ac secundario, 45 min en cámara húmeda.
- 12.- Un lavado con PBS, 5 min.
- 13.- Añadir ABC, 45 min en cámara húmeda.
- 14.- Un lavado con PBS, 5 min y retirar exceso de líquido antes de siguiente paso.
- 15.- Revelar con solución sustrato-cromógeno, estandarizar tiempos (2 min).
- 16.- Lavar con agua destilada, 2 min dos veces.
- 17.- Contrateñir con Hematoxilina de Harrys, 2 minutos.
- 18.- Lavar con agua corriente y con un flujo constante.
- 19.- Enjuagar en agua destilada.
- 20.- Deshidratar, aclarar y montar.

## **B. Preparación de soluciones y reactivos**

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

#### **B.2. Alcohol ácido**

Para preparar 100 ml

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

0.5 ml de Ac. Acético.

#### **B.3. Buffer de Citratos**

\*Para preparar 1litro se utilizó.

10mM Ácido cítrico (1.9βg de Citric acid ACS reagent, ≥99.5% (Sigma-Aldrich, EUA))

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

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

Ajustar pH a 6.0

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

#### **B.4. Solución de peróxido de hidrógeno para Bloqueo**

\*Para preparar 100ml

10% de peróxido de hidrógeno al 3% (10ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Uso doméstico)

50% PBS (50ml)

40% de metanol (40ml)

#### **B.5. Fosfato bufferado salino (PBS)**

Para 200ml se utilizó

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

#### **B.6. Solución TRIS-buffer salino con Tween 20 (TBS)**

Para 200ml

10ml EnvisionMR Flex Wash Buffer 20x

190ml Agua tridestilada

### **B.7. Solución recuperadora de antígeno (TRS)**

Para 100ml

10 ml DakoMR Target Retrieval Solution High pH 10x concentrate 90ml Agua tridestilada

### **B.8. Soluciones tinción violeta rápido de cresilo**

#### **Violeta rápido de cresilo 0.5 %**

0.5 grs de Violeta rápido de cresilo en  
100 ml de agua destilada

#### **Solución diferenciadora 0.025 %**

250 µl de ácido acético glacial  
100 ml de alcohol 100%

### **B.9. Soluciones tinción Klüver-Barrera**

#### **Solución de Luxol Fast Blue 0.1%**

Disolver 0.1 gramos de Luxol FB en 100 ml de alcohol 96%, adicionar 500 µl de ácido acético 10%.

#### **Solución de Violeta de Cresilo 0.1%**

Disolver 0.1 gramos de violeta de cresilo en 100 ml de agua destilada, al estar preparada adicionar 500 µl de ácido acético concentrado, filtrar la solución (lista para usarse).

#### **Solución de Carbonato de Litio 0.05% (Solución diferenciadora)**

Disolver 0.05 gramos de carbonato de litio en 100 ml de agua destilada.

**B.10. Solución de tinción elástica para la técnica de Pentacrómico de Movat**

30 ml de solución de hematoxilina (5%), adicionar 15 ml de solución de cloruro férrico (10%) y 15 ml de solución de yodo Lugol. La solución de yodo Lugol provocará la tinción de todos los viales y etiquetas del kit con el tiempo, no afecta negativamente al rendimiento del producto.