

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



IDENTIFICACION DE TLR2 Y TLR4 EN EL TGI DE UN MODELO MURINO
INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON *ENCEPHALITOOZON*
CUNICULI.

TESIS

QUE PRESENTA

MC. CÉSAR DÁVILA MARTÍNEZ

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

ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

16 DE ENERO, 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA
CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INICIAL EN EL TGI DE
UN MODELO MURINO INFECTADO EXPERIMENTALMENTE CON
ENCEPHALITOOZON CUNICULI.

Aprobación de tesis por el comité particular de
MC. César Dávila Martínez



PhD Luis Edgar Rodríguez Tovar
Director de Tesis



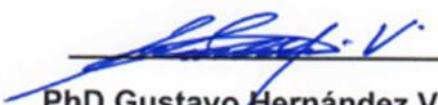
Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo



Dra Diana Elisa Zamora Ávila
Co-Director



PhD Gustavo Hernández Vidal
Co-Director



Dra. Alicia Magdalena Nevárez Garza
Co-Director

General Escobedo, Nuevo León, a 16 Enero de 2024

Este proyecto de investigación se realizó con el Cuerpo Académico Consolidado de Zoonosis y Enfermedades Emergentes (UANL-CA-343), del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UANL y el cuerpo Académico Consolidado de Morfología (UANL-CA-230), del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina-UANL.

DEDICATORIA

A mi esposa Adriana y a mis hijos Aryan y Aadrika.

AGRADECIMIENTO

**A mis asesores, por muchas cosas, pero sobre todo por su enorme
PACIENCIA**

**A mis compañeros y amigos, por ser parte de esta experiencia y muchas
veces ser impulsores**

A mi madre, que siempre tenías en mente que no todo estaba bien

**A mi hermano Bruno, por siempre estar disponible aún y cuando yo suelo
cerrar mis puertas**

A Adriana, por comprenderme, orientarme y no dejarme solo.

A Aryan y Aadrika, por hacerme ver que puedo hacer muchas cosas.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	11
RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN	16
1.1 Objetivo General	18
1.1.1 Objetivos particulares	18
1.2 Hipótesis	18
1.3 Justificación	18
2. REVISIÓN DE LITERATURA	19
2.1 <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	19
2.2 Ciclo biológico	20
2.3 Patogenia	24
2.4 Respuesta inmune Inespecífica	26
2.4.1 Macrófagos y Células dendríticas	27
2.5 Tejido linfoide asociado a mucosa gastrointestinal.	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1 Preparación del inóculo	37
3.2 Animales de experimentación	38
3.3 Modelo animal	39
3.4 Toma de muestras	41
3.5 Diagnóstico de la infección	42
3.6 Anticuerpos e inmunohistoquímica (IHQ)	42
3.7 Análisis estadístico	43
3.8 Carta aprobación por comité de bioética	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Muestras histológicas	45
4.2 Diagnóstico de la infección	45
4.2.1 Muestras tisulares	45
4.2 Inmunohistoquímica	60
4.2.1 Controles para TLR-2 y TLR-4	60
4.2.2 IHC para TLR-2 en vellosidades intestinales	63
4.2.3 IHC para TLR-4 en vellosidades intestinales	69

4.2.4 IHC para TLR-2 en GALT	75
4.2.5 IHC para TLR-4 en GALT	82
4.5 Conteo de células positivas	88
4.5.1 TLR-2.....	88
4.5.2 TLR-4.....	90
4.6 Análisis estadístico.....	92
5. DISCUSIÓN	98
6. CONCLUSIONES	106
7. BIBLIOGRAFÍA	107
APÉNDICE.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ciclo de vida de <i>E. cuniculi</i>	21
Figura 2.- Intestino delgado de ratón. Calcoflúor white 1H.	46
Figura 3.- Intestino delgado de ratón. Calcoflúor white 2H.	48
Figura 4.- Intestino delgado de ratón Calcoflúor white 4H.	50
Figura 5: Vellosidad intestinal, yeyuno. Ratón Balb/c. 2H.....	51
Figura 6: Sección de duodeno con azul tricromo.	53
Figura 7: Sección de yeyuno con azul tricromo.	55
Figura 8: Sección de íleon con azul tricromo	56
Figura 9: Vellosidad intestinal de ratón infectado con esporas de <i>E. cuniculi</i> (Gram modificada).	58
Figura 10: Controles negativos en intestino delgado de ratón Balb/c (IHQ). 60	
Figura 11: Cortes de porciones de intestino delgado de ratón. A: Control positivo para TLR-2.....	61
Figura 12: Duodeno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR- 2.....	63
Figura 13: Yeyuno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-2.	65
Figura 14: Íleon de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-2. 67	
Figura 15: Duodeno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR- 4.....	69
Figura 16: Yeyuno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-4.	71
Figura 17: Íleon de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-4 . 73	
Figura 18: Duodeno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR- 2.....	76
Figura 19: Yeyuno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-2	79
Figura 20: Íleon de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-2 . 80	
Figura 21: Duodeno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . ICH para TLR- 4.....	83
Figura 22: Yeyuno de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-4	85

Figura 23: Íleon de ratón Balb/c infectado con <i>E. cuniculi</i> . IHC para TLR-4 .	87
Figura 24: Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-2 en vellosidades de grupos Control e Infectados.	92
Figura 25: Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-2 en GALT de grupos Control e Infectados.....	93
Figura 26: Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-4 en vellosidades de grupos Control e Infectados.	95
Figura 27: Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-4 en GALT de grupos Control e Infectados.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Modelo animal.....	40
-----------------------------	----

Tabla 2: Promedios y porcentajes registrados en células de muestras de vellosidades de diferentes porciones de intestino delgado procesadas para detectar TLR-2..... 88

Tabla 3: Promedios y porcentajes registrados en células de muestras de vellosidades de diferentes porciones de intestino delgado procesadas para detectar TLR-4..... 90

ABREVIATURAS

ABC	Complejo avidina-biotina-peroxidasa
AT	Azul de Tricromo Modificado
CFW	Calcoflúor White
DAB	3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina
Dec-1	Receptores de dectina
DFPV	Difluoruro de polivinilideno
EcSWP1	Proteína de pared de espora de <i>E. cuniculi</i> 1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EnP1 y EnP2	Proteínas de endospora 1 y 2
FAE	Epitelio asociado a folículo
GALT	Tejidos linfoides asociados a mucosa gastrointestinal
Gm	Tinción de Gram Modificada
HE	Hematoxilina y Eosina
IFN- γ	Interferón gamma
IL-12	Interleucina 12
ILF	Folículos linfoides aislados

IRF3	Factor de transcripción regulatorio de interferón 3
LBP	Proteína de unión a LPS
LRR	Repeticiones ricas en leucina
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88
NF- κ B	Factor de transcripción Nuclear- κ B
PAMPs	Patrón molecular asociado a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehido
PI	Postinfección
PP	Placa de Peyer
PRRS	Patrón molecular asociado a patógenos
SARM	Proteína contenedora de conformaciones Armadillo y alfa estériles
SEA	Antígeno soluble de huevo de <i>Schistosoma</i>
SED	Domo subepitelial
TBST	Amortiguador salino Tris en polisorbato 20
Tfr-2	Receptores de transferrina 2

TGI	Tracto gastrointestinal
TIR	Receptor de interleucina 1 (Toll-Interleucina)
TIRAP	Proteína adaptadora contenedora de dominio TIR
TLR	Receptores del Tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α (alfa)
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	Proteína adaptadora relacionada a TIR inductora de interferón

RESUMEN

La infección producida por *Encephalitozoon cuniculi* en los humanos, remarca semejanza con la encefalitozoonosis en murinos, por lo tanto, este último es considerado como el modelo animal predilecto para el estudio de dicho padecimiento. En este trabajo se planteó el análisis de tejido linfoide asociado a mucosas intestinales murinas infectadas durante tiempos variables, para después, mediante técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica; evaluar los patrones e interacciones entre los elementos inmunológicos intestinales y el trayecto de la espora. Las técnicas de Calcofluor White, Azul de Tricromo Modificado y Gram; permitieron identificar las distintas ubicaciones de las esporas en los diferentes tiempos de infección; encontrándose esporas en lumen y en estructuras de las vellosidades intestinales. Lo anterior permitió visualizar posibles patrones de la diseminación de las esporas por el tracto intestinal, en donde las secciones de duodeno presentaron un pico inicial en la primera hora postinfección, para después declinar en los dos tiempos de registro ulteriores. En las porciones de yeyuno e íleon; las esporas se mantenían con una mayor frecuencia y distribución conforme aumentaba el tiempo de infección, llegando a ser identificadas incluso en el interior de las estructuras de las vellosidades. La inmunohistoquímica evidenció distintos resultados a los anteriormente mencionados y también conforme el tiempo postinfección se extendía. Los resultados pertenecientes a las muestras de vellosidades procesadas para identificar TLR-2, mostraron una positividad a este receptor. En el tejido linfoide asociado a mucosa gastrointestinal de las tres secciones analizadas; se detectaron cambios que sugerían un aumento

gradual en la expresión de TLR-2, tanto en el FAE (polos apicales y basales) como en el interior de sus estructuras.

En los resultados pertenecientes a las muestras para identificar TLR-4, las vellosidades presentaron las mismas características y cambios estructurales descritos en el apartado discutido para TLR-2, aunque con resultados variables en cuanto a sus inmunomarcajes y que la presencia de células con dicho marcaje en la lámina propia fue más escasa que en las muestras antes mencionadas.

En las muestras de GALT de este estudio, los cambios en la presencia de este receptor sugieren una interacción que pudiese estar relacionada con los efectos directos previamente descritos entre TLR-4 de células dendríticas y la espora o con efectos indirectos de la presencia de la espora en el medio intestinal que llevan a la liberación de citocinas que pudiesen influenciar la presentación de este receptor.

1. INTRODUCCIÓN

El filo Microsporidia está compuesto por microorganismos eucariotas unicelulares, esporulados, con un ciclo intracelular obligado y que comparten un origen fúngico en común (Lee *et al.*, 2008). El genoma de estos parásitos es muy reducido, así como el número de genes que lo conforman, lo cual resulta en organismos con un metabolismo celular mínimo (Corradi *et al.*, 2010). Los miembros de este grupo son denominados microsporidios y se caracterizan por poseer un aparato de extrusión único en su tipo, conformado por un organelo denominado filamento polar, con el cual adquiere la capacidad de inyectar su material infectante, el esporoplasma, dentro de las células que parasitan (germinación) (Franzen *et al.*, 2005). En especies de microsporidia como *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*), la invasión también se puede realizar mediante la invaginación de la propia membrana plasmática celular con una posterior germinación dentro de esta (Orlik *et al.*, 2010). *Encephalitozoon cuniculi* es el microsporidio más ampliamente distribuido entre los mamíferos (Hinney *et al.*, 2016) y del cual hasta ahora son conocidos cuatro genotipos: el genotipo I (“cepa de conejos”) fue encontrado principalmente en conejos, el genotipo II (“cepa de ratón”) encontrado en ratones, aunque también en zorros y gatos; el genotipo III (“cepa de perro”), el cual ha demostrado una alta mortalidad en primates, léminos y perros, además del recién descubierto genotipo IV (“cepa humana”), hasta ahora encontrado solamente en humanos, perros y gatos (Nell *et al.*, 2015; Talabani *et al.*, 2010). En el ratón, la transmisión se puede realizar por vía transplacentaria; oral, al consumir animales (canibalismo), alimento o agua contaminados con la

espora, o intranasal, al inhalar las esporas del medio ambiente (Meredith *et al.*, 2015; Whary *et al.*, 2015). En murinos, la infección con *E. cuniculi* normalmente es asintomática, lo cual da como resultado la problemática correspondiente a la infección crónica subclínica, que pudiese existir en animales de laboratorio o bioterios. Esto puede generar variables que llegan a alterar los resultados de sus respectivas investigaciones (Mathis *et al.*, 2005). Por otro lado, la signología de la presentación clínica (encefalitozoonosis) en esta especie consiste en la presencia de letargo, ascitis y pérdida de peso, llegando a causar la muerte en animales inmunocomprometidos (Lallo *et al.*, 2013). Las lesiones descritas se centran en focos de inflamación mononuclear en cerebro, hígado, pulmones, riñones e intestino. Posteriormente pueden desarrollar vasculitis, gliosis y formación de granulomas en corteza cerebral, así como nefritis intersticial y pielonefritis, y la presencia de granulomas en hígado y pulmones (Al-Sadi & Al-Mahmood, 2014; Vladutiu, 1993). No obstante, se desconocen muchos de los factores que se desencadenan durante los primeros minutos postinfección y en donde se prevé se llevan a cabo los procesos iniciales de la interacción entre el epitelio intestinal o el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT, por sus siglas en inglés) y la espora; lo anterior, considerando que la homeostasis de los microorganismos y la protección del hospedador a nivel intestinal, corren a cargo de la respuesta inmunológica de su superficie mucosa (Allaire *et al.*, 2018; Moura *et al.*, 2019) y que en el caso de *E. cuniculi* este patrón inicial parece ser importante para el control de la enfermedad (M. M. Moretto *et al.*, 2012).

1.1 Objetivo General

Determinar qué tipo(s) celular(es) inmunológicos participa(n) en la respuesta inmune inicial contra la espora de *Encephalitozoon cuniculi*.

1.1.1 Objetivos particulares

1.1.1.1 Desarrollar el modelo murino de infección experimental temprana con *Encephalitozoon cuniculi*.

1.1.1.2 Analizar la interacción entre los tipos celulares del ambiente digestivo y la espora de *Encephalitozoon cuniculi*.

1.2 Hipótesis

La espora de *Encephalitozoon cuniculi* estimula la activación temprana de las células del sistema inmune en el tracto digestivo murino.

1.3 Justificación

El estudio de la interacción de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* en las células del tracto intestinal nos permitirá entender el mecanismo de entrada de este microorganismo durante la fase inicial de la infección en un modelo murino infectado experimentalmente y comprender su posterior diseminación sistémica.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Encephalitozoon cuniculi*

El microsporidio, *Encephalitozoon cuniculi* es considerado como el de mayor distribución entre los mamíferos (Mehlhorn, 2016; Wasson & Peper, 2000), inicialmente se identificó en 1922 en conejos (Wright & Craighead, 1922). Este agente infeccioso intracelular se reportó en múltiples especies mamíferas alrededor del mundo, como ratas, ratones, caballos, camélidos, zorros, gatos, perros, ratas almizcleras, leopardos, babuinos y humanos (Didier, 2005; Magalhães et al., 2022; Marková et al., 2019). Tras muchos años de no generarse información de alto impacto respecto al tema, es en los años ochenta cuando la microsporidiosis humana vuelve a ser motivo de interés, luego de que *Enterocytozoon bieneusi* fuera identificado como el microorganismo causante de diarrea, emaciación y desgaste en un paciente humano inmunosuprimido y a su vez, positivo al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Desportes et al., 1985). Lo anterior marcó el inicio de una relación entre la encefalitozoonosis u otras microsporidiosis, con pacientes inmunodeficientes (por tratamientos inmunosupresores, VIH, linfocitopenias, etc.) (Mathis et al., 2005; Stentiford et al., 2016). En lo que al ser humano respecta, se han clasificado catorce microsporidios que llegan a infectarlo, ubicando a *E. cuniculi* (Genotipos I-IV), entre los más comunes (Baker, 2008; Bohumil et al., 2020). En los humanos, la encefalitozoonosis provoca severas lesiones renales, entéricas y respiratorias debido a la diseminación sistémica que esta produce (Hocevar et al., 2014) y con la posibilidad de invadir prácticamente todos los órganos del paciente (Didier & Weiss, 2006). En

pruebas serológicas de aglutinación y de ELISA en seres humanos, se han reportado resultados positivos, esto en poblaciones tanto inmunocompetentes como inmunosuprimidas (Abu-Akkada *et al.*, 2015; Carhan *et al.*, 2015; Feldman & Easton, 2006). Vale la pena remarcar que muchos de los individuos inmunocompetentes, son asintomáticos (Mathis *et al.*, 2005). A su vez, existen estudios que relacionan la infección presentada en personas seropositivas-asintomáticas (Kotkova *et al.*, 2013; Pan *et al.*, 2015; Sak *et al.*, 2011); con aquella manifestada en animales utilizados en laboratorios, tales como el ratón (Khan & Didier, 2000; van Gool *et al.*, 2004). Aunado a lo anterior, se ha remarcado la semejanza que existe entre la encefalitozoonosis de humanos y la generada en murinos, por lo cual, se ha utilizado a esta última especie como modelo animal predilecto para conocer su potencial infectocontagioso y su patogénesis, así como los elementos inmunológicos que dan pie a la encefalitozoonosis y su ulterior diseminación en las personas (Khan *et al.*, 2001; Kotkova *et al.*, 2013; Kotková *et al.*, 2018; Mathis *et al.*, 2005; Neto *et al.*, 2017).

2.2 Ciclo biológico

Una de las rutas de transmisión más importante es mediante el consumo de esporas ingeridas ya sea en alimento o agua contaminados (Kotkova *et al.*, 2013; Latney *et al.*, 2014). El epitelio digestivo se considera como el posible sitio primario de infección de la espora de *E. cuniculi*. Una vez que la espora se encuentra en este sitio, esta posee distintas vías por las cuales ganar

acceso al interior de una célula huésped. Actualmente se considera que ciertos eventos son necesarios para generar dichos procesos de invasión por parte de la espora, entre los que destacan múltiples factores ambientales (Leitch & Ceballos, 2008). Lo anterior desencadena una serie de efectos dentro de la espora infectante, entre los que destaca la utilización de su túbulo polar (filamento polar ya expuesto) (B. Han *et al.*, 2020). Una vez que atraviesa la membrana celular, esta estructura descarga al esporoplasma (extrusión) dentro de la célula blanco, depositándolo directamente en el citoplasma de esta (Figura 1) (Wasson & Peper, 2000).

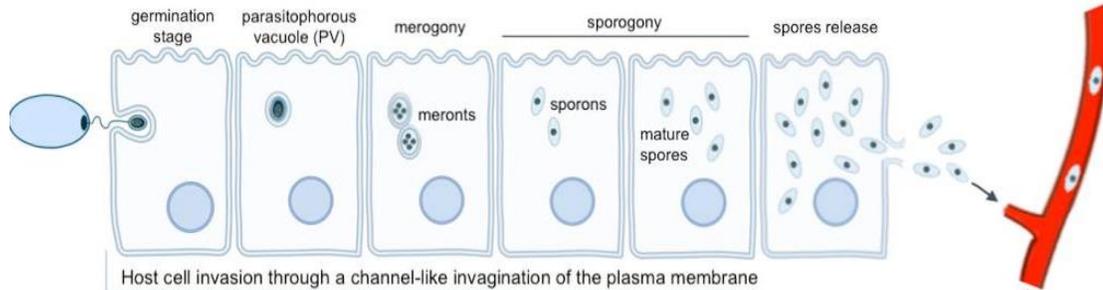


Figura 1.- Ciclo de vida de *E. cuniculi*. La espora expone su filamento polar al establecer contacto con la célula huésped y penetra a través de la membrana plasmática de esta para posteriormente inyectar el esporoplasma en su interior (etapa de germinación). El esporoplasma se desarrolla hacia la etapa de merogonia por fisión binaria dentro de la vacuola parasitófora (vacuola parasitófora y merogonia). El meronte madura a esporonte que posteriormente se dividirá en esporoblastos, los cuales se desarrollan durante la esporogonia para generar esporas maduras y así ser liberadas de la célula huésped. (Imagen tomada de Magalhães *et al.*, 2022)

El posible desencadenamiento de los eventos bioquímicos iniciales que llevan a la liberación del túbulo polar se cree dependen de factores microambientales, aunque esto no se encuentra definido actualmente. Se ha propuesto que el aumento en la presión osmótica dentro de la estructura de la espora o un cambio de pH en el entorno de esta ocasiona la súbita liberación del tubo polar. Dicho proceso permite que el esporoplasma no establezca contacto con el medio extracelular, evitando así el ser reconocido por los elementos del sistema inmunológico (Cali & Takvorian, 2014). Ya en el interior del citoplasma, el esporoplasma cursa por dos fases de diferenciación, comenzando por la merogonia (fase proliferativa), seguido por la esporogonia (fase infectiva). La primera de estas origina la proliferación y a su vez el crecimiento de la fase inmadura del *E. cuniculi*, conocido como meronte, por otro lado, la esporogonia es la etapa que incluye el desarrollo y maduración que lleva a la formación las esporas infectantes. El proceso antes mencionado se lleva a cabo en el interior de la vacuola parasitófora, que es la estructura que provee una separación entre el parásito y el resto de los componentes de la célula infectada y que está compuesta en su mayoría, por lípidos derivados de esta última (Bohne *et al.*, 2011). Después de 24-48 hrs, se produce el rompimiento de la célula hospedadora, provocado por la misma proliferación del agente en su interior, liberando las esporas infectantes al entorno celular y permitiendo también que estas puedan ingresar al sistema vascular (células endoteliales) o migrar a través del mismo sistema fagocítico mononuclear. En los casos en los que la célula huésped no es lisada, la infección se llega a distribuir por extensión directa de las esporas a las células circundantes o en su defecto por medio de

la fagocitosis de esporas inactivadas (Franzen *et al.*, 2005; Rodriguez-Tovar *et al.*, 2003). Se han propuesto otros medios por los cuales la espora logra infectar a células susceptibles, basados en otros microsporidios, como son la interacción de esporoplasmas previamente expulsados con la membrana plasmática de las células y su posterior endocitosis/fagocitosis (Takvorian *et al.*, 2013). Por último, se ha caracterizado como sinapsis de invasión, a un proceso de infección que involucra la extrusión del túbulo polar en el medio extracelular y el cual interactúa con la superficie de la célula blanco; desarrollando posteriormente una invaginación en la membrana de dicha célula y creando un microambiente protegido en el cual será depositado el esporoplasma que infectará a dicha célula (B. Han *et al.*, 2017).

2.3 Patogenia

Anteriormente se ha demostrado que el curso de la encefalitozoonosis está estrechamente relacionado con el estado inmunológico del hospedador (inmuno- competente e inmunosuprimido) (Gigley & Khan, 2011; M. M. Moretto *et al.*, 2015). Además, se conoce que *E. cuniculi* puede sobrevivir dentro de macrófagos, facilitando su dispersión a través del cuerpo del hospedador (Wasson & Peper, 2000). En ratones inmunocompetentes la encefalitozoonosis tiene un curso crónico, silencioso y progresivo, caracterizado por la diseminación de la espora hacia casi todos los órganos. Lo anterior, comienza durante los primeros 7 días PI (post- infección), cuando las lesiones características se concentran a nivel microscópico; el tejido renal

comienza a exhibir un infiltrado de células mononucleares en el intersticio. Al inicio de la segunda semana PI, los hepatocitos presentan cambio graso, así como una vasculitis moderada dentro de las venas portales. Es en este mismo periodo de tiempo, en el que el tejido pulmonar presenta un infiltrado mononuclear; mientras que en el lumen intestinal se detectan grandes cantidades de esporas (Schmidt & Shaddock, 1983). Después del décimo día PI, el parénquima hepático puede presentar inflamación granulomatosa focal y vasculitis, así como colangitis linfocítica en las zonas portales. En este periodo, los pulmones llegan a exhibir vasculitis en el intersticio, así como hiperplasia linfoide de los nódulos linfáticos peribronquiales; mientras que, en intestino, se presenta una enteritis linfocítica acompañada de una esplenitis granulomatosa. Para los quince días PI, las lesiones en tejido nervioso central se manifiestan como vasculitis en meninges, gliosis en corteza cerebral y granulomas a nivel cerebelar. Por otra parte, los pulmones comienzan a presentar vasculitis y neumonía granulomatosa. Es en esta etapa, también, en la que se comienza a apreciar la aparición de vesículas/vacuolas parasitóforas dentro de los enterocitos de las vellosidades intestinales (Al-Sadi & Al-Mahmood, 2014). Para el día 30 PI, la espora puede ser detectada por todo el cuerpo, generando congestión en meninges, cerebro, hígado y bazo, lo cual puede ser observado a nivel macroscópico (Kotkova *et al.*, 2013). Los pulmones, estómago e intestinos se encuentran pálidos. Microscópicamente se muestra vasculitis a nivel de tejido nervioso (cerebro y cerebelo) con presencia de granulomas a nivel de cerebro. Un mes más tarde, los animales se pueden encontrar anoréxicos y deprimidos; presentando a nivel

macroscópico, congestión de meninges, encéfalo e hígado (Al-Sadi & Al-Mahmood, 2014; Meredith *et al.*, 2015).

En ratones inmunosuprimidos la encefalitozoonosis causa un cuadro severo y fatal, caracterizado por la rápida diseminación de la espora por todo el cuerpo de los animales (Kotkova *et al.*, 2013). Estos ratones suelen morir desde la primera semana PI; presentando un infiltrado de células mononucleares en corteza cerebral y cerebelo, en este mismo periodo, aunado a una hiperplasia de folículos linfoides en submucosa intestinal (Lallo *et al.*, 2013).

En caso de sobrevivir hasta los días 10 y 15 PI; se evidencian cuadros de anorexia, estornudos y tos, mientras que a nivel microscópico; se observan colangitis, vasculitis y granulomas en hígado. Los intestinos, mientras tanto, muestran enteritis linfocítica y la presencia de vesículas/vacuolas parasitóforas del parásito dentro de los enterocitos (Al-Sadi & Al-Mahmood, 2014).

2.4 Respuesta inmune Inespecífica

En base al contexto anterior, se conocen algunas de las interacciones o propiedades celulares del hospedador, que son aprovechadas por la espora de *E. cuniculi* para contribuir a la generación de las lesiones ya mencionadas, así como su propia diseminación; a través de la previa infección de células epiteliales intestinales y a su vez la de macrófagos (Couzinet *et al.*, 2000; Franzen *et al.*, 2005). Considerando también que en estas últimas se ha demostrado que las esporas infectivas pueden inhibir la unión del fagosoma con el lisosoma (Franzen *et al.*, 2005), impidiendo su posterior destrucción y

por lo cual se estipula que dicho proceso es crucial en la distribución del agente. Cabe destacar que, en el hospedador, la respuesta o interacción inicial con *E. cuniculi* llega a implicar diversos mecanismos de la inmunidad inespecífica; es decir, los primeros contactos entre la espora y los distintos elementos de esta (células y moléculas), así como la condición inmunológica del individuo, suelen marcar el posible término o resurgimiento de la encefalitozoonosis (Kotkova *et al.*, 2013).

2.4.1 Macrófagos y Células dendríticas

Los macrófagos, llevan a cabo un papel importante en la destrucción o en su defecto, el soporte de las esporas infectantes y lo cual ha demostrado estar estrechamente relacionado con el microambiente propiciado por la interacción de las citocinas desplegadas en el entorno (Valencakova & Halanova, 2012). Como ejemplo de lo antes mencionado cabe destacar que en macrófagos humanos se ha identificado que la unión inicial de la espora a receptores TLR-2 conlleva a la translocación nuclear del Factor de transcripción Nuclear- κ B (NF- κ B, por sus siglas en inglés) y posterior liberación de citocinas proinflamatorias (TNF- α) (Didier & Khan, 2014; Fischer *et al.*, 2008). Lo anterior converge en la necesidad del organismo de recibir la señalización adecuada para generar la expresión de aquellas citocinas proinflamatorias necesarias para montar una respuesta inmunológica Th1 (IFN- γ o IL-12), para hacer frente a la encefalitozoonosis de manera eficaz y poder resistir o eliminar la infección,

preferentemente desde el inicio de dicha invasión (Gigley & Khan, 2011; Mathews *et al.*, 2009; M. M. Moretto *et al.*, 2015).

En modelos murinos se conoce la importancia de la funcionalidad de las células dendríticas en el control de la multiplicación de patógenos del género *Encephalitozoon*, a partir de la correcta diferenciación de macrófagos (Bernal *et al.*, 2016) o mediante la producción de la maduración de los linfocitos intraepiteliales (M. M. Moretto *et al.*, 2008, 2015), los cuales a largo plazo y como se ha demostrado anteriormente, generarán una respuesta inmunológica celular; la cual ha resultado ser decisiva en el proceso de destrucción de las células infectadas y por ende de la eliminación del patógeno (Ghosh & Weiss, 2012; Gigley & Khan, 2011; M. M. Moretto *et al.*, 2007).

2.4.1.1 Interacciones célula/espora

La inmunidad innata constantemente se considera como la primera línea de defensa frente al arribo de cualquier agente infeccioso; y su desempeño depende en gran medida de la capacidad que esta posea para reconocer la presencia de elementos microbianos o las moléculas relacionadas al daño celular del propio organismo. Es aquí donde recae la importancia de poseer “sensores” que le permitan al cuerpo el percatarse de la presencia de los elementos ya mencionados; estos receptores moleculares reciben el nombre de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) y su amplio espectro de conformaciones moleculares les permiten

entablar interacciones con la gran variedad de microorganismos existentes (Murphy & Weaver, 2017). Dichas uniones se generan con moléculas pertenecientes a productos o elementos estructurales de los microorganismos y los cuales suelen ser conformaciones conservadas, conocidas como Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) (Denman, 1992). Existen PRRs ubicados en el interior de ciertas células (intracelulares) o unidos a la membrana celular de estas (transmembrana). Dentro de las células que poseen estas características podemos comenzar identificando las células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas) y de ciertas células fagocíticas no profesionales (linfocitos, fibroblastos y células epiteliales), cuyas funciones recaen también en la detección de posibles invasores. Todas estas células poseen la capacidad de discriminar entre distintas variedades de microorganismos invasores a través de sus PRRs, detectando sus respectivos PAMPs (Beutler & Rehli, 2002; Murphy & Weaver, 2017) y posteriormente iniciando transducciones de señal determinadas por el tipo de interacción PRRs/PAMPs que se genera. Estas transducciones de señal son de gran importancia en el inicio de la expresión de citocinas pro o anti-inflamatorias, que a su vez determinarán el comportamiento fisiológico de numerosas células del organismo (inmunológicas y no inmunológicas) ante los distintos escenarios. Actualmente, se han estudiado gran cantidad de PRRs, en particular los pertenecientes al grupo de los Receptores Tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), los cuales han abierto múltiples cuestionamientos debido

a las numerosas características y propiedades que presentan (Akira & Takeda, 2004; Mukherjee *et al.*, 2019).

2.4.1.2 PAMPs de *Encephalitozoon cuniculi* y los receptores celulares de estos.

En cuanto al contexto de la infección microsporidiana, se han propuesto ligandos (PAMPs) presentes en la espora para ciertos PRRs celulares, como son la proteína de la pared de la espora de *E. cuniculi* 1 (EcSWP1, por sus siglas en inglés) (Bohne *et al.*, 2000), las proteínas de endospora 1 y 2 (EnP1 y EnP2, por sus siglas en inglés) y los O-manosil glicanos (Southern *et al.*, 2007; Taupin *et al.*, 2007), siendo estos últimos considerados como los principales iniciadores de la respuesta inmunitaria innata frente a la encefalitozoonosis. Por otro lado, al remarcar el origen filogenético de este microsporidio; cabe destacar que los miembros del reino Fungi (Lee *et al.*, 2008; Vergneau-Grosset & Larrat, 2016), poseen en su estructura, PAMPs característicos, como los β -glucanos, quitina y manoproteínas. La detección de estas moléculas le permite al hospedador, en algunos casos, percibir la presencia de agentes micóticos en el cuerpo (Gupta & Singh, 2011; Shepardson & Cramer, 2013).

Estudios recientes *in vitro* utilizando macrófagos murinos; han señalado a los receptores de transferrina (Tfr-2) y de dectina (Dec-1), como posibles ligandos para la espora de *E. cuniculi*, así como ciertos glucosaminoglucanos presentes

en las células hospedadoras para este microorganismo (B. Han & Weiss, 2017a; Southern *et al.*, 2007). Los PRRs más estudiados actualmente y relacionados a las interacciones ya mencionadas son los receptores TLR-2 y TLR-4 (Levitz, 2004; Taghavi *et al.*, 2017); tomando en cuenta también que los receptores pertenecientes al grupo de los TLR son reconocidos como los únicos con la capacidad de reconocer las infecciones iniciales y como los más potentes inductores de las respuestas inflamatorias (Kawai & Akira, 2011). En intestino de ratón; TLR-2 y TLR-4 han sido identificados en células de Paneth, células M, células madre intestinales, enterocitos, células caliciformes y células enteroendócrinas. En las siguientes secciones resaltaremos la relevancia de los TLRs previamente mencionados y cómo sus interacciones con los componentes de *E. cuniculi*, remarcando su importancia para este estudio.

2.4.1.2.1 TLR-2

Este receptor es considerado una proteína transmembrana tipo-1 evolutivamente conservada, que al igual que los demás TLRs transmembranales posee un dominio extracelular que alberga repeticiones ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés) que reconoce sus respectivos PAMPs y una porción citosólica del receptor de interleucina 1 (Toll-Interleucina) denominado TIR (por sus siglas en inglés). Este último es necesario para generar la transducción de señal que guiará la activación del factor de transcripción denominado NF- κ B; para inducir la transcripción de

citocinas proinflamatorias y quimiocinas, así como la regulación de moléculas coestimuladoras en células presentadoras de antígeno, como macrófagos y células dendríticas, que como resultado sensibilizan a las células T para su activación (Murphy & Weaver, 2017). Aunado a lo anterior, se ha considerado que su acción también se extiende a la detección de patógenos que han sido capturados dentro de lisosomas o endosomas (Park & Lee, 2013).

Cabe destacar que tanto TLR-2 como TLR-4, “formulan” una inmunidad innata específica del patógeno, a través del ligando detectado y para el cual se desarrollará posteriormente una inmunidad específica del antígeno en la inmunidad adquirida (Denman, 1992). Esta versatilidad en cuanto al tipo de respuesta se basa en la capacidad que les confiere el poder formar heterodímeros con otros tipos de TLRs, los cuales convenientemente amplían aún más la gama de PAMPs que son capaces de detectar (Mukherjee *et al.*, 2016).

En el caso específico de TLR-2, esta molécula forma un heterodímero en forma de “m” ya sea con TLR-1 o TLR-6 para el reconocimiento de lipopéptidos tri o diacilados provenientes de patógenos como bacterias Gram negativas, micoplasmas, etc. (Botos *et al.*, 2011). Aunado a lo anterior, podemos remarcar que TLR- 2 se involucra en el reconocimiento de una notable cantidad de PAMPs derivados de bacterias, hongos, parásitos e incluso virus; a través de moléculas como fosfolípidos, fosfatidilserina, glucolípidos, antígeno soluble de huevo de *schistosoma* (SEA, por sus siglas en inglés), lipofosfatidilserina, lipofosfoglicanos, fosfolipomananos, zimosan, glucolípidos,

hemaglutinina, peptidoglucanos, ácido lipoteicoico, entre otros (Mukherjee *et al.*, 2016).

2.4.1.2.2 TLR-4

Como se mencionó en la sección anterior, los miembros del grupo de los TLRs comparten muchos elementos característicos de su estructura, por consiguiente, en esta sección se mencionarán las características más relevantes de TLR-4.

En este receptor, su funcionalidad depende de formar un complejo molecular en la superficie celular con otras proteínas para así reconocer sus ligandos (Ej. LPS) (Abbas *et al.*, 2021; Denman, 1992). En el suero, los LPS se unen primeramente con la proteína de unión a LPS (LBP, por sus siglas en inglés), la cual transfiere el LPS a la molécula CD14. La CD14 es una proteína de membrana anclada a glucosilfosfatidilinositol, que también se encuentra en una forma soluble y lo cual le permite también unirse a complejos de LPS-LBP con alta afinidad. La molécula CD14, al carecer de un dominio intracelular para establecer una señalización; esta se asocia a TLR-4 para formar un complejo funcional receptor de LPS, lo cual también requiere la unión con la proteína MD-2 y se asocia con el dominio extracelular de TLR-4 y la cual se logra compartiendo la sujeción de los lípidos que conforman la porción principal del LPS (Park *et al.*, 2009; Vaure & Liu, 2014).

El receptor multimérico compuesto hasta este punto por dos copias del complejo TLR4-MD2-LPS resultan en la iniciación de la transducción de señal; reclutando adaptadores moleculares como el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88, por sus siglas en inglés), proteína adaptadora relacionada a TIR inductora de interferón (TRIF, por sus siglas en inglés), molécula adaptadora relacionada a TRIF (TRAM, por sus siglas en inglés), proteína adaptadora contenedora de dominio TIR (TIRAP, por sus siglas en inglés) y proteína contenedora de conformaciones armadillo y alfa estériles (SARM, por sus siglas en inglés) (Abbas et al., 2021).

Cabe destacar que se ha demostrado que la unión con CD14 y LBP solo acrecientan la señalización de TLR-4 dependiente de LPS y no son absolutamente necesarias para su unión y posterior señalización (Lizundia *et al.*, 2008).

En el caso particular de este receptor, se considera que su afinidad a sus PAMPs correspondientes se relacionan estrechamente a mutaciones en los genes que lo codifican, dando lugar a reconocimiento de no solo lipopolisacáridos (LPS) sino que también muchos otros componentes de patógenos como polímeros de ácido manurónico de bacterias Gram-, ácido teicurónico de bacterias Gram+, glucoproteínas, mananos, glucomananos, glucuronoxilomananos, proteínas de shock térmico, entre otros (Akira & Takeda, 2004; Vaure & Liu, 2014).

Una vez que reconocen un PAMP específico, tanto en TLR-2 como en TLR-4 (localizados en alguna célula en particular), se activan sus dominios TIR en

asociación con sus adaptadores (MyD88, TRIF, and SARM); lo que en consecuencia lleva a la activación de NF- κ B y/o el factor de transcripción regulatorio de interferón 3 (IRF3, por sus siglas en inglés) que en conjunto pueden llegar a generar la producción de IL-6, IL-12, TNF- α y/o interferon β (Abbas *et al.*, 2021; Mukherjee *et al.*, 2016).

En cuanto a las posibles interacciones entre la espora de *E. cuniculi* y los PRRs del hospedador, se ha estudiado aquella relacionada con el receptor TLR4 de células dendríticas murinas; el cual se ha visto sobre expresado y reconocido como un factor crucial en el reconocimiento y la respuesta inmune celular contra *E. cuniculi* (Lawlor *et al.*, 2010).

Una vez considerado esto y destacando que la vía de infección más común es la oral (Wasson & Peper, 2000), se estableció que, la interacción entre los receptores TLR-2 y 4 presentes en el intestino delgado de modelos murinos; pueden encaminar información importante sobre la infección temprana por *E. cuniculi*.

2.5 Tejido linfoide asociado a mucosa gastrointestinal

El epitelio que conforma el tracto gastrointestinal (TGI), posee la función de digerir y de absorber nutrientes contenidos en el lumen intestinal y a pesar de que le es posible el procesar cierta cantidad de moléculas externas, existen sitios del intestino delgado dedicados a la detección de patógenos contenidos en todo aquello que el individuo llegase a ingerir; estas estructuras linfoides

secundarias se conocen como tejidos linfoides asociados a mucosa gastrointestinal (GALT, por sus siglas en inglés). Actualmente se han descrito diferentes tipos de nodulaciones linfoides pertenecientes a los GALT, como son las placas de Peyer (PP), folículos linfoides aislados (ILF, por sus siglas en inglés) y los criptoparches (Cesta, 2006; Wagner *et al.*, 2018). Las PP son las más prominentes de estos sitios, distribuyéndose por toda la mucosa y submucosa del TGI, aunque con mayor densidad en la porción del yeyuno y orientadas comúnmente hacia la pared mesentérica. En particular, los roedores poseen de 6 -12 centros germinales en cada PP (Day & Schultz, 2014). Dichos centros consisten en una capa o multicapa de folículos linfoides, rodeados en su mayor parte por las áreas T para o interfoliculares y sobre cada folículo, un área menos organizada llamada domo subepitelial (SED, por sus siglas en inglés), el cual se encuentra limitado en la parte superior por un epitelio asociado a folículo (FAE, por sus siglas en inglés) y posee grandes cantidades de células dendríticas, células B *naive* y células CD4 (Chassaing *et al.*, 2014). Conformando el FAE, se encuentran distribuidas células epiteliales especializadas, que por la morfología de su membrana plasmática plegada (micropliegues), reciben el nombre de células M.

Una vez considerado lo anterior y tomando en cuenta la utilización de modelos murinos en la aproximación al estudio de la encefalitozoonosis humana, se concluye que dichos elementos inmunológicos (TLR-2, TLR-4), no han sido estudiados en modelos murinos *in vivo*, a modo de caracterizar las posibles interacciones iniciales que pudiesen llevarse a cabo entre el organismo

hospedador y la espora de *E. cuniculi*; lo cual pudiese dar información relevante de una de las principales vías de entrada del microorganismo, tal y como se ha planteado anteriormente en conejos (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016a) y que permitiera aclarar en gran medida, la serie eventos que se desarrollan durante la infección temprana en ratones a nivel intestinal.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación del inóculo

La cepa de espora que se utilizó fue la comercial de *E. cuniculi* ATCC, 50789, la cual fue cultivada durante ocho semanas en la línea celular Vero (ATCC CCL-8, EUA), en cRPMI-1640 (SIGMA, EUA), en 5% de CO₂ y a 37°C (Lallo *et al.*, 2016; Molestina *et al.*, 2014). Posteriormente las cajas a cosechar se rasparon con un raspador celular (Corning, Nueva York, EUA), y la suspensión obtenida se transfirió a un tubo de fondo cónico con capacidad de 50 ml (Falcon®, Nueva York, EUA). Se centrifugó a 1,500 x g por 10 minutos a 4°C utilizando una centrifuga universal tipo 320R (Hettich Zentrifugen, Alemania). Posteriormente el sobrenadante fue removido mediante decantación para luego resuspender el pellet en 1 ml del medio cRPMI 1640. Dicha suspensión se pasó a través de una aguja de calibre 27 mm (Terumo, Tokio, Japón), y se depositó en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf, Nueva York, EUA) para luego homogeneizar nuevamente en un vortex (Labnet, Nueva Jersey, EUA). Este procedimiento se repitió una vez más para ser depositado en un tubo cónico de 50 ml al que se le añadieron 9 ml de medio cRPMI 1640 para obtener un volumen definitivo de 10 ml. Para eliminar la mayor parte de los restos

celulares se centrifugó una última vez con las mismas condiciones y posteriormente se le retiró el sobrenadante. La pastilla generada se resuspendió en 7.5 ml del medio cRPMI 1640. Para su utilización las esporas se contabilizaron en una cámara Neubauer (Hausser Scientific, Pensilvania, EUA) y se ajustaron a 2×10^6 esporas/ml. Las esporas se colectaron del medio de cultivo sobrenadante, se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga Mikro 220 (Hettich, Alemania) y posteriormente el sobrenadante se decantó y el pellet se resuspendió en 1 ml de PBS. Con una jeringa de 5 ml estéril, la suspensión se tomó y pasó a través de una aguja 27G en 3 ocasiones, con el fin de provocar la lisis de la célula huésped de forma mecánica. Luego de una segunda centrifugación a 1000g x 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se volvió a resuspender el pellet en 7.5 ml de PBS, posteriormente se almacenó a 4°C hasta el momento de su empleo (Pan *et al.*, 2015).

3.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 18 ratones Balb/c, de entre 35 a 45 días de edad, tanto hembras como machos, los cuales se alojaron en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UANL). Fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum*, el cual fue retirado 12 horas previas al experimento. Se les mantuvo con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y una temperatura de 23°C. Las condiciones de manejo se establecieron acorde a lo estipulado en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Se alojaron en jaulas de acrílico de 29x22x14cm con

tapa de rejilla metálica inoxidable (Birdcage, Birds Park, EUA), habilitadas con bebederos con capacidad para 60 ml (Redkite, México); en el cual se brindó agua limpia y de buena calidad; se les alimentó con dieta comercial (croquetas FormuLab Chows 5008, Purina, EUA).

3.3 Modelo animal

Se realizaron 3 grupos que contenían cinco animales cada uno y un cuarto grupo grupo control compuesto por tres animales, los cuales fueron inoculados por vía peritoneal con esporas infectantes o con solución salina fisiológica, respectivamente. Los 3 grupos de animales representaron los distintos tiempos postinfección (PI): 1hr, 2hrs y 4hrs (1H, 2H y 4H, respectivamente). Esto mismo se realizó para cada uno de los animales control (Al-Sadi & Al-Mahmood, 2014) (Tabla 1).

Grupos\PI	1 Hora	2 Horas	4 Horas
1H (n=5)	E	/	/
2H (n=5)	/	E	/
4H (n=5)	/	/	E
Control (n=3)	E(1)	E(1)	E(1)

Tabla 1.- Modelo animal. Distintos tiempos postinfección (PI) de los cuatro grupos de animales (1H, 2H, 4H y Control); en los cuales se realizó la eutanasia (E) correspondiente para cada grupo o en el caso del grupo control, a un integrante del grupo E(1). Las demás especificaciones se explican en el texto.

Los ratones fueron inoculados por vía peroral con una dosis de 10^6 esporas de *E. cuniculi* en 0.5 ml de PBS. Se utilizó una sonda esofágica número 24, de 2.5 cm y un diámetro de 1.25 mm (Kent Scientific, EUA) (Turner *et al.*, 2011). En los tiempos PI respectivos, se procedió a la sedación de los ratones con una combinación de Tiletamina+Zolazepam (Zoletil®100, Virbac, Francia), 100mg/Kg/IM (Cagle *et al.*, 2017; Shimizu, 2004). Se les tomó una muestra sanguínea (ver abajo), y posteriormente se realizó la eutanasia mediante dislocación cervical (Cressey, 2013; Soto-Domínguez *et al.*, 2020). Finalmente se procedió a la colección de las muestras intestinales.

3.4 Toma de muestras

Bajo anestesia, se obtuvieron 0.5 ml de sangre mediante punción cardíaca, debajo del esternón y cartílago xifoides con una venoclisis número 24 (Miniflex, Trokar, S.A., México). Las muestras sanguíneas fueron colocadas en tubos de 3 ml EDTA, (BD Vacutainer EDTAK3, BD Vacutainer, EUA). Posteriormente se hicieron frotis sanguíneos que se tiñeron con Azul de Tricromo, Calcoflúor White y Gram modificado (ver más adelante). Posteriormente, los ratones fueron sacrificados mediante la dislocación de las vértebras cervicales (Cressey, 2013). Se procedió a recolectar las muestras del tracto digestivo a todos los grupos de animales. Las muestras de tejido consistieron principalmente en porciones del tracto digestivo (duodeno, yeyuno e íleon), los cuales se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS a un pH de 7.4, se embebieron en parafina y se seccionaron a 4 micras de espesor. Se procedió

a seleccionar solo aquellas secciones que tenían placas de Peyer (PP) o folículos linfoides aislados (FLA), verificadas primeramente en secciones teñidas con hematoxilina y eosina (HE). El resto de los órganos (hígado, riñones, bazo, corazón, pulmones y encéfalo) fueron fijados y mantenidos en PFA.

3.5 Diagnóstico de la infección

Los frotis sanguíneos fueron teñidos con las siguientes técnicas: Calcoflúor White (CFW), Azul de Tricromo Modificado (AT) y Gram (Gm) (Ghosh *et al.*, 2014), con las cuales se verificó la presencia o ausencia de las esporas. Los cortes tisulares correspondientes a TGI pasaron a ser teñidos con las mismas técnicas ya mencionadas y con el mismo fin (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2017). Tanto los frotis como los cortes tisulares se revisaron con un microscopio de luz Primo Star (Zeiss, Alemania) con objetivos de 4, 10, 40 y 100x; revisando 20 campos por muestra.

3.6 Anticuerpos e inmunohistoquímica (IHQ)

Se utilizaron dos anticuerpos primarios; los cuales fueron el anticuerpo monoclonal de conejo anti-TLR4 (ab13556, ABCAM, EUA) y el anticuerpo policlonal de conejo anti-TLR2 (ab213676, ABCAM, EUA).

Se utilizaron secciones de las muestras de intestino (duodeno yeyuno e íleon) desparafinadas y posteriormente se montaron en laminillas revestidas con poli-

L-lisina. Posteriormente las muestras se rehidrataron, utilizando pases en alcoholes graduados. Seguido de esto se expusieron al proceso de desenmascaramiento de antígeno utilizando calor, sumergiéndolas en un buffer de citratos (pH 6, 10mM Ácido cítrico) y un posterior bloqueo de peroxidasa endógena, utilizando peróxido de hidrógeno al 3%. El siguiente procedimiento fue destinado al bloqueo de sitios de unión inespecíficos mediante la utilización de un suero equino al 0.5% contenido en el kit de segundo anticuerpo/revelado (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Labs, EUA). Posteriormente se colocó un tipo de anticuerpo primario en cada uno de los cortes tisulares, para después de una incubación de 24 horas, proceder a la aplicación del segundo anticuerpo biotinilado anti-conejo (Biotinylated Horse Anti-Rabbit IgG Antibody, BA- 1100, Vector Labs, EUA) seguido por el complejo enzima-biotina-avidina procedente del mismo kit y concluir con DAB (ImmPACMR DAB, Vector Laboratories, EUA). Al finalizar las muestras se deshidrataron, pasaron a ser montadas utilizando resina y visualizadas al microscopio de luz Primo Star (Zeiss, Alemania) con objetivos de 4, 10, 40 y 100x.

3.7 Análisis estadístico

Con el objetivo de obtener comparativas entre las distintas expresiones de los marcadores de superficie entre los grupos, se llevó a cabo un análisis de los resultados del conteo de células positivas en los cortes, el cual se llevó a cabo mediante el método descrito por Bologna y colaboradores (Bologna-Molina *et*

al., 2011) y aplicado en otros estudios (Mungenast *et al.*, 2020); y sus datos se analizaron por medio de un ANOVA de dos colas y la prueba de *t* de Student para obtener una comparativa de medias mediante el software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., EUA).

3.8 Dictamen de Aprobación por Comité de Bioética y Bienestar Animal

Número del dictamen: 017/2021.

Con fecha: 30/11/2021.

4. RESULTADOS

4.1 Muestras histológicas

Las muestras embebidas en parafina fueron cortadas en secciones de 5µm y procesadas con la técnica de HE (Dávila-Martínez *et al.*, 2020; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2017). Esto se realizó para identificar las estructuras intestinales asociadas con el MALT (PP, criptoplasmas y FLA).

4.2 Diagnóstico de la infección

4.2.1 Muestras tisulares

4.2.1.1 Calcoflúor White (CFW).

Las secciones mostraron la presencia de esporas. En duodeno, a la primera hora postinfección (1H), se observaron de 5-20 esporas (12.5 en promedio) por cada 20 campos (Apéndice A) en todos los cortes y en aquellos en los que fueron localizadas generalmente se mostraban en el lumen intestinal (Figura 2).

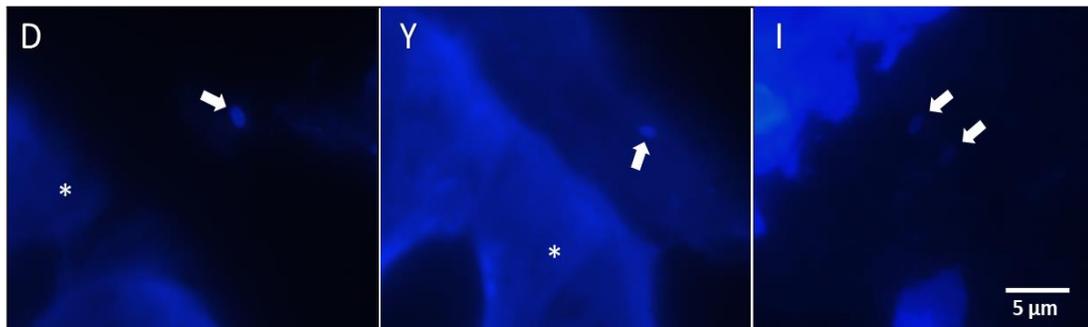


Figura 2.- Intestino delgado de ratón. Duodeno (D), Yeyuno (Y) e Íleon (I); 1H. Ratón Balb/c. Las esporas (flechas blancas) de *E. cuniculi*; se encuentran en distintas partes del lumen intestinal (fondo negro) y en las inmediaciones de las vellosidades (asterisco). 100x.

Sin embargo, al continuar con las secciones de duodeno de individuos con 2 y 4 horas post infección (2H Y 4H, respectivamente), las esporas se encontraron más escasas, registrando promedios de 10 y 7.5 esporas respectivamente (Apéndice A). En las porciones de yeyuno e íleon; las esporas se mantenían con una mayor distribución conforme aumentaba el tiempo PI; registrando a la primera hora (1H) 15 y 0 esporas respectivamente, y pasando a 27.5 y 17.5 en la segunda hora post infección (2H) respectivamente (Figura 3).



Figura 3.- Intestino delgado de ratón. Duodeno (D), Yeyuno (Y) e Íleon (I); 2H. Ratón Balb/c. Las esporas (flechas blancas) de las imágenes Y e I, se encuentran inmersas en las vellosidades; observándose en la primera de estas una espora rodeada por un espacio dentro del epitelio (asterisco), mientras que en la siguiente imagen (I) la espora se visualiza sin ningún otro elemento aparte. 100x. Calcoflúor White.

A la cuarta hora post infección (4H) con un conteo de 57.5 y 37.5 en yeyuno e íleon, respectivamente. En ~~los~~ últimos, las esporas se identificaron en lumen en contacto con la mucosa intestinal o en el borde de las microvellosidades (Figura 4), además de que cabe destacar que también fueron visualizadas numerosas estructuras sugerentes a *E cuniculi* distribuidas en el interior de la mucosa intestinal.

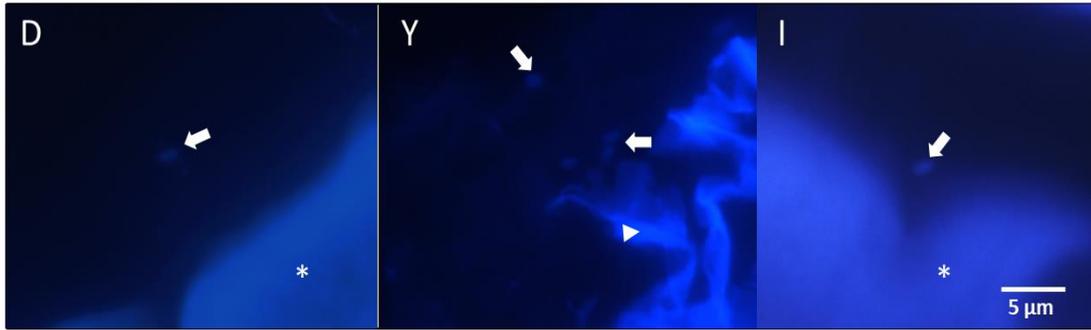


Figura 4.- Intestino delgado de ratón (CFW) Duodeno (D), Yeyuno (Y) e Íleon (I); 4 horas post infección (4H). En el lumen intestinal (fondo negro), se pueden identificar distintas cantidades de esporas (flechas blancas), así como su ubicación respecto al epitelio intestinal (D e I; asteriscos) o el contenido luminal (Y; cabeza de flecha blanca). 100x. Calcoflúor White.

4.2.1.2 Azul de Tricromo Modificado (AT)

La detección de esporas fue menos evidente mediante esta técnica; sin embargo, permitió la identificación de las estructuras y su relación con la ubicación de las esporas. Cabe destacar la observación de esporas en vasos quilíferos de vellosidades a nivel de yeyuno (Figura 5).

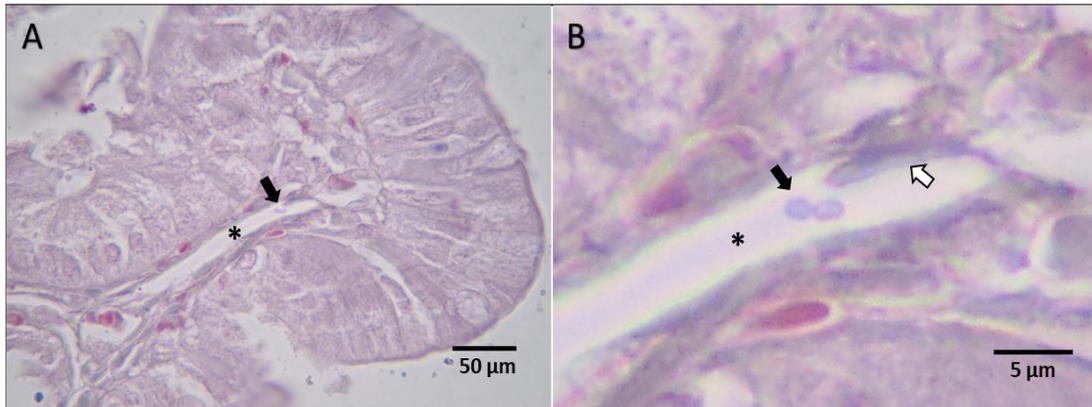


Figura 5.-Velloidad intestinal, yeyuno. Ratón Balb/c. 2H. A: se aprecian dos a esporas (flecha negra) en un vaso quilífero (asterisco). 40x. B: Ampliación de la sección anterior,). Azul de tricromo.

En el duodeno, las esporas se observaron en distintas ubicaciones del intestino delgado a partir de la primera hr PI (Grupo 1H). No obstante, su número disminuyó conforme se revisaron las secciones de animales con 2 hrs y 4 hrs PI (Grupos 2H y 4H, respectivamente) (Figura 6).

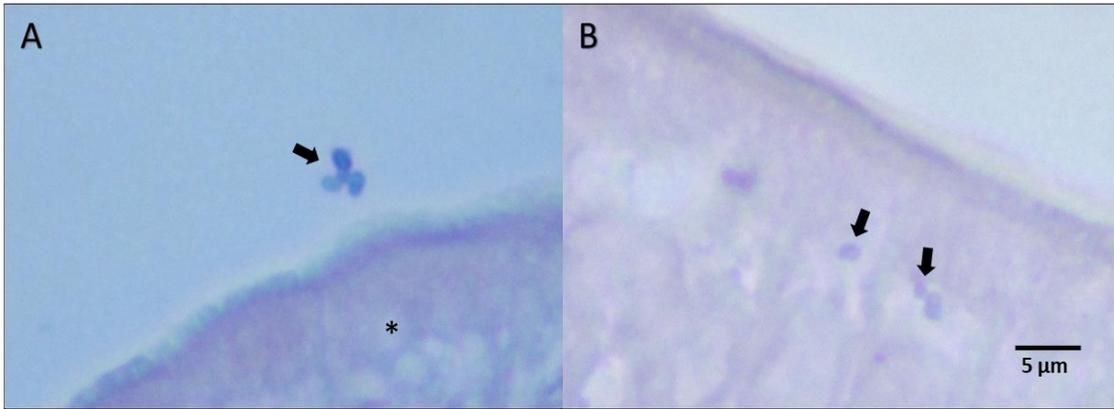


Figura 6.- Sección de duodeno en un ratón infectado con *E. cuniculi* (2H). A: Grupo de esporas (flecha) ubicadas en el lumen intestinal, adyacentes a las microvellosidades del epitelio duodenal (asterisco). B: Esporas (flechas negras) identificadas en el interior de enterocitos de una vellosidad. 100x. Azul de tricromo.

Por otro lado, las secciones de yeyuno e íleon mostraron la presencia de esporas hasta la 2da y 4ta hrs PI (Figura 7 y 8).

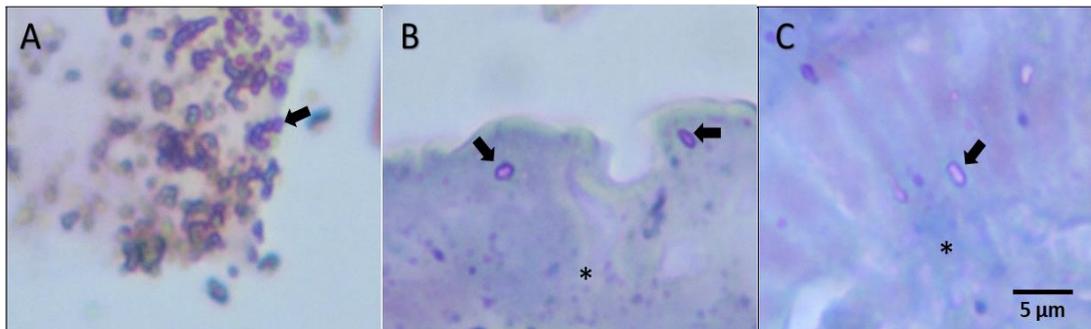


Figura 7.- Sección de yeyuno en un ratón infectado con *E. cuniculi*. A: Grupo de esporas (flecha) ubicadas en el lumen intestinal. B: Esporas (flechas) en el interior de enterocitos de una vellosidad. C: Esporas (flecha) en la porción basolateral de enterocitos, con respecto a lámina propia (asterisco) de yeyuno. Azul de tricromo.

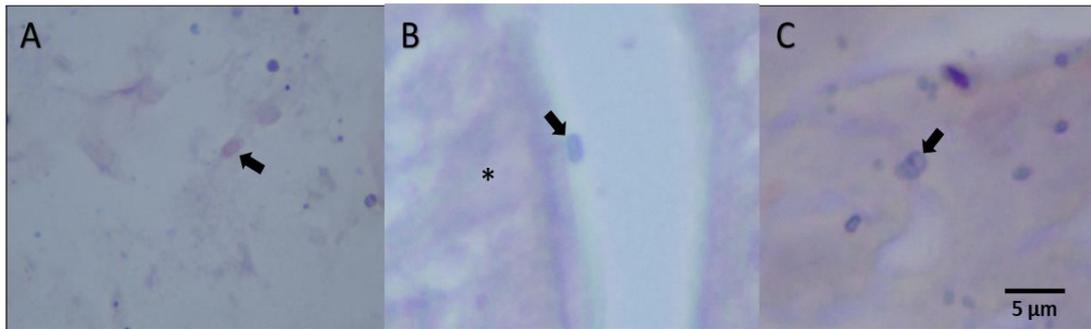


Figura 8.- Corte de íleon de un ratón infectado con *E. cuniculi*. A: Esporas (flecha) ubicadas en el lumen intestinal y formando parte del bolo alimenticio. B: Espora (flecha) identificadas en la porción luminal del borde de cepillo de un enterocito (asterisco). C: La flecha indica lo que parece ser un par de esporas localizadas en el interior de un enterocito. Azul de tricromo.

4.1.1.1 Tinción de Gram (Gm)

La aplicación de esta técnica demostró la presencia de múltiples esporas de *E cuniculi*; ya sea en cúmulos o de manera individual, dentro o fuera de las vellosidades intestinales (Figura 9).



Figura 9.- Vellosidad intestinal de ratón infectado con esporas de *E. cuniculi* (Gm). Esporas en el borde de cepillo de enterocitos (flecha) Enterocito con núcleo fragmentado (necrosis)(cabeza de flecha) adyacente a las esporas. Técnica de Brown y Brenn (Gram modificada: Gm). Imagen 40x.

Las estructuras identificadas se mantenían dispersas en la porción apical de las vellosidades, tanto en aparente contacto con las microvellosidades (en lumen), como en el interior de la misma vellosidad (epitelio y lámina propia). Como se apreció en la imagen presentada anteriormente, las estructuras se llegaron a encontrar en cúmulos o de manera individual; logrando en esta última, la apreciación de la morfología característica de la espora. Las muestras de los animales infectados no mostraron un patrón aparente como en las técnicas anteriores, ya que las esporas se encontraban en cantidades y ubicaciones variables, así como en secciones con tiempos de infección indistintos.

4.2 Inmunohistoquímica

4.2.1 Controles para TLR-2 y TLR-4

Se realizaron los controles positivos o negativos, así como la estandarización para el inmunomarcaje del estudio. Por lo tanto, los marcajes basales para TLR-2 y TLR-4 fueron los siguientes (Figura 10 y 11).

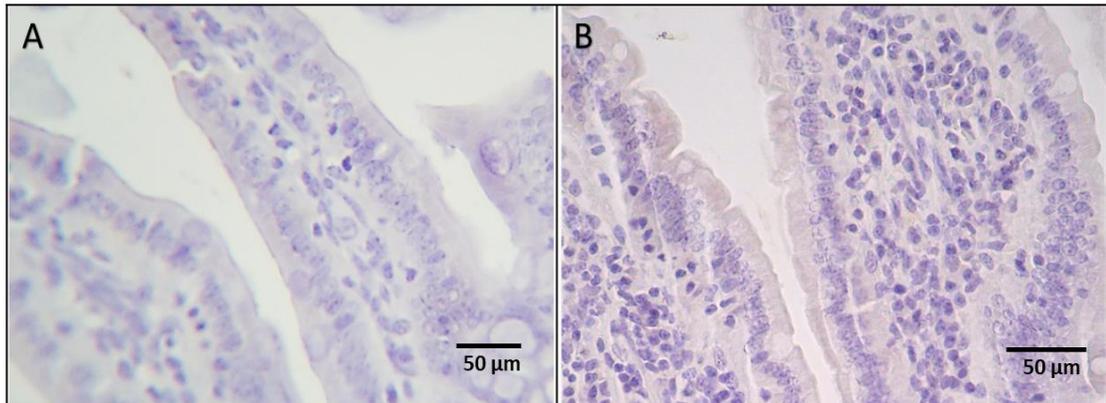


Figura 10.- Controles negativos en intestino delgado de ratón Balb/c (IHQ). A: Duodeno sin anticuerpo primario para TLR-2. B: Íleon, sin el anticuerpo primario para TLR-4. Contrate hematoxilina. 40x.

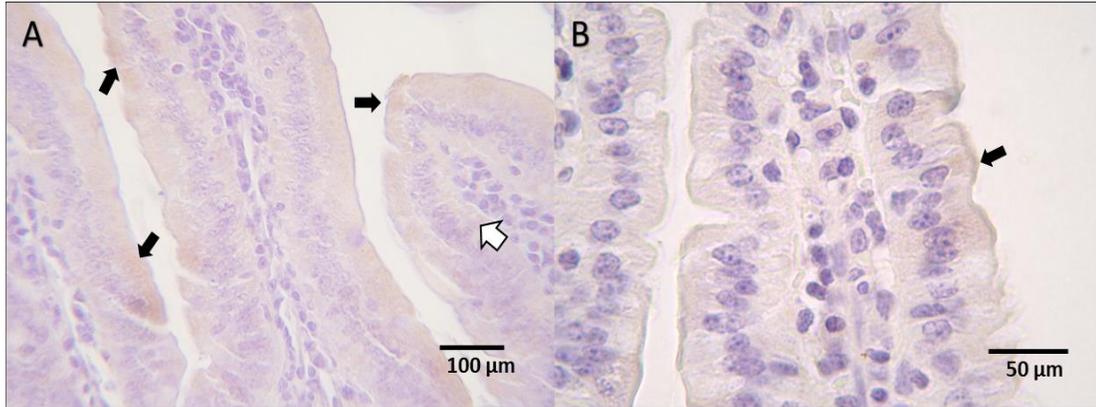


Figura 11.- Cortes de porciones de intestino delgado de ratón. A: Control positivo para TLR-2; se marcan las porciones apicales de algunos enterocitos positivos para dicho receptor (flechas negras), así como en algunas partes de la porción basolateral (flecha blanca) de los enterocitos y en algunas células de las criptas intestinales. B: Control positivo para TLR-4; se identifica la superficie apical de un enterocito positivo para este marcador. Imagen 40x.

La morfología de las vellosidades se mantuvo sin cambios histológicos aparentes.

4.2.2 IHC para TLR-2 en vellosidades intestinales

4.2.2.1 Duodeno

En el duodeno se observaron inmunomarcajes que diferían a lo observado en animales no infectados, principalmente en los grupos de animales 1H y 2H PI. En el grupo 1H PI, las reacciones positivas se registraron de manera más evidente en la porción apical de los enterocitos, así como en las porciones basolaterales de algunos de estos y en enterocitos de las criptas intestinales. En lámina propia, se identificaron marcajes discretos en células pertenecientes a esta (Figura 12).

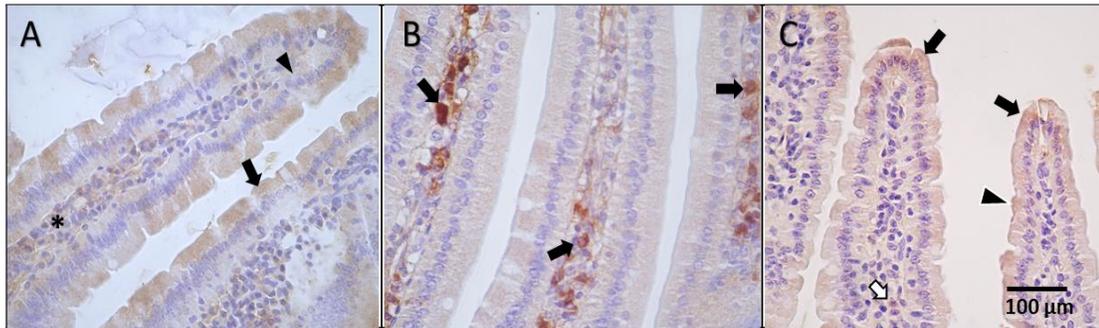


Figura 12.- Duodeno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-2. A: 1H. Inmunomarcaje positivo en las vellosidades intestinales, en la porción apical de enterocitos (→), así como en las porciones basolaterales de estos (▸) y en las células de la lámina propia (*). B: 2H. Inmunomarcaje positivo para TLR-2 en lamina propia de vellosidades dudenales (→). C: 4H. Señal positiva en punta (→) y porción lateral de las vellosidades intestinales. Se observan células mononucleares (ø) en la lámina propia. Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

Se identificaron células con inmunomarcaje positivo a TLR-2, que a simple vista correspondían a mononucleares.

En las muestras de los animales 2H, el inmunomarcaje se observó de manera uniforme en los enterocitos a lo largo de las vellosidades duodenales. La lámina propia mostró células positivas, para TLR-2, pudiendo identificarse macrófagos y células dendríticas. Las células caliciformes no mostraron cambios morfológicos aparentes.

En las secciones de los animales 4H, el inmunomarcaje se concentró en los enterocitos de la porción apical de las vellosidades, así como en lámina propia.

4.2.2.2 Yeyuno

Las muestras de yeyuno de los animales 1H mostraron uninmunomarcaje basal comparable a las muestras de los animales no infectados. Las áreas apicales de los enterocitos se observaron con una discreta reacción positiva a la DAB. La integridad de las vellosidades permaneció intacta.

A las 2 horas postinfección el inmunomarcaje abarcó la totalidad de los enterocitos en el yeyuno, específicamente en las superficies apicales y basolaterales de los mismos, mientras que en la lámina propia la reacción TLR-2- positiva incluyó células mononucleares, probablemente macrófagos, células plasmáticas y linfocitos intraepiteliales (Figura 13).

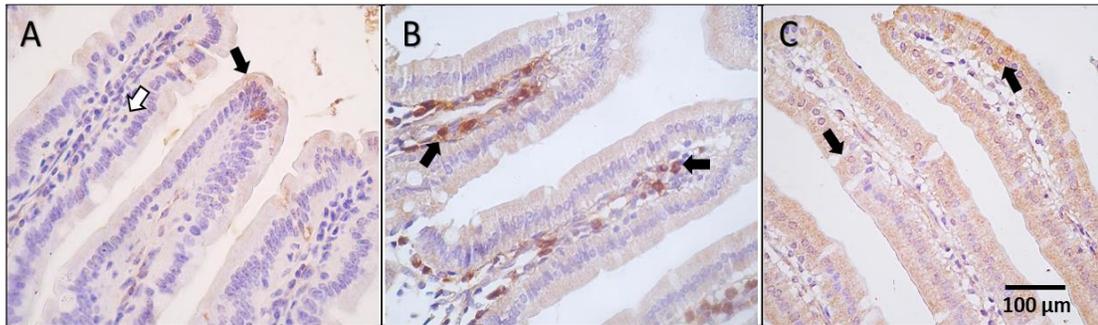


Figura 13.- Yeyuno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-2. A: 1H. Células positivas a TLR-2 en las vellosidades intestinales (→); mientras que en lámina propia se muestran escasas células inmunomarcadas (δ). B: 2H. La mayoría de las células epiteliales, así como también células pertenecientes a la lámina propia muestran inmunomarcaje positivo para TLR-2 (δ). C: 4H. Epitelio positivo a TLR-2; al generarse un marcaje en los enterocitos (→). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

En cuanto a las muestras de animales con 4 horas PI (4H); estas mostraron vellosidades con un epitelio positivo en su totalidad a TLR-2, en el cual también se apreciaban ciertos enterocitos con un inmunomarcaje aún más intenso en comparación a otros.

4.2.2.3 Íleon

En íleon de los animales 1H, se registraron inmunomarcajes para TLR-2 similares a las muestras, lo observado en el yeyuno durante el mismo tiempo PI.; visualizando grupos de células positivas a TLR-2. Las vellosidades no se mostraron con cambios morfológicos aparentes.

En cuanto a los cortes de los animales 2H; las vellosidades presentaron un inmunomarcaje más extenso, abarcando mayores áreas tisulares, en comparación con las muestras del grupo 1H, detectando una reacción positiva a lo largo del recubrimiento epitelial tanto en la superficie apical como la basolateral de los enterocitos.

En el grupo de muestras 4H, se observaron células positivas a lo largo de las vellosidades intestinales; sin embargo, fue más evidente en las porciones apicales de las mismas (Figura 14).

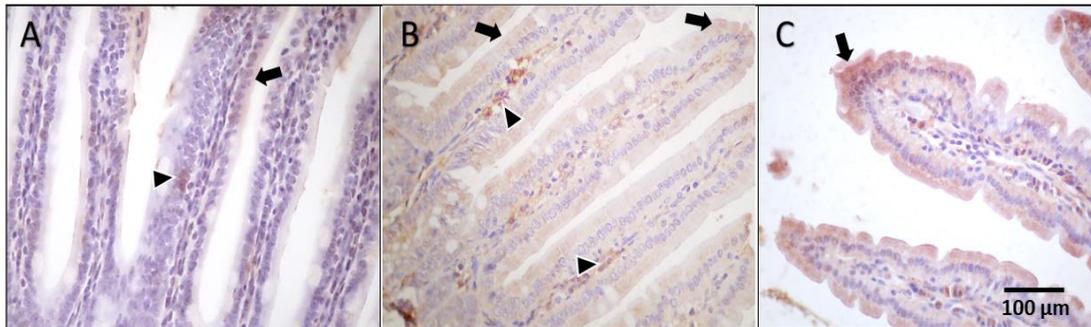


Figura 14.- Íleon de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-2. A: 1H. Inmunomarcajes en áreas del epitelio de revestimiento (→) y lámina propia (▸). B: 2H. Inmunomarcaje positivo en la mayoría del epitelio de revestimiento (→) y de células en lámina propia (▸). C: 4H. Velloidades con reacción positiva a TLR-2; siendo más intensa en regiones apicales (→). Avidina-Biotina contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.3 IHC para TLR-4 en vellosidades intestinales

4.2.3.1 Duodeno

En los cortes pertenecientes al grupo 1H, se aprecian grupos de células con positividad al receptor TLR-4, mayormente en su posición apical. A su vez, la integridad de las vellosidades se mantuvo dentro de lo normal y sin cambios celulares aparentes en el interior de la lámina propia.

En el grupo 2H, los inmunomarcajes se enfocaron en el área apical y basolateral de los enterocitos; mientras que las vellosidades intestinales se mantuvieron sin cambios.

Las muestras de los animales con 4 horas PI (4H), presentaron inmunomarcajes más evidentes que abarcaban la totalidad de los enterocitos, tanto en sus caras apicales como basolaterales. Es hasta este punto donde las reacciones positivas a TLR-4 se comienzan a visualizar en células de la lámina propia (Figura 15).

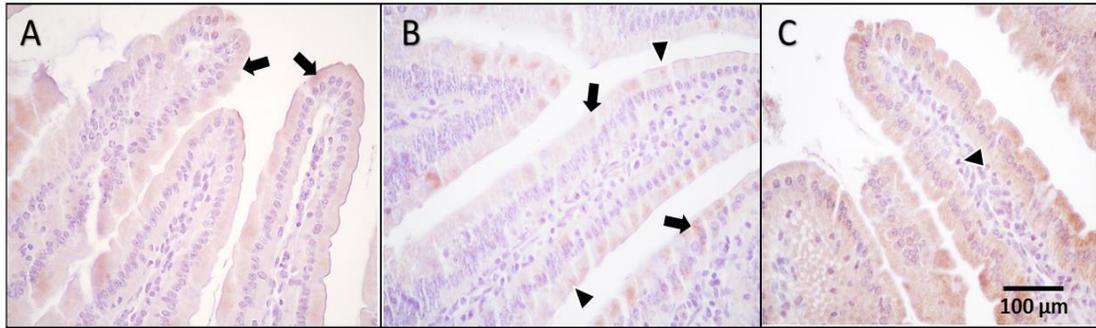


Figura 15.- Duodeno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-4. A: 1H. Vellosidades intestinales con áreas de inmunomarcaje positivo, en las regiones apicales de los enterocitos (→). Lámina propia sin cambios. B: 2H. Múltiples enterocitos que individualmente y en su porción apical, presentan un inmunomarcaje positivo a TLR-4 (▸), algunos de estos lo presentan también en su porción basolateral (→). C: 4H. Marcaje positivo para TLR-4 en toda la extensión del recubrimiento epitelial y en algunos elementos de la lámina propia (▸). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.3.2 Yeyuno

Los cortes pertenecientes a yeyuno de animales con 1 hora de infección (1H), tuvieron un inmunomarcaje positivo para TLR-4, principalmente en la punta de las vellosidades, No se presentaron cambios en lámina propia, ni células con un marcaje positivo.

En los cortes del grupo 2H, se incrementó el área de positividad para TLR-4, aunque, solo se limitó al recubrimiento epitelial.

En las muestras obtenidas del tercer grupo de animales (4H), también se encontraron enterocitos con inmunomarcajes en su totalidad, solo que, a diferencia del grupo anterior, esta positividad incluyó algunas células de la lámina propia (Figura 16).

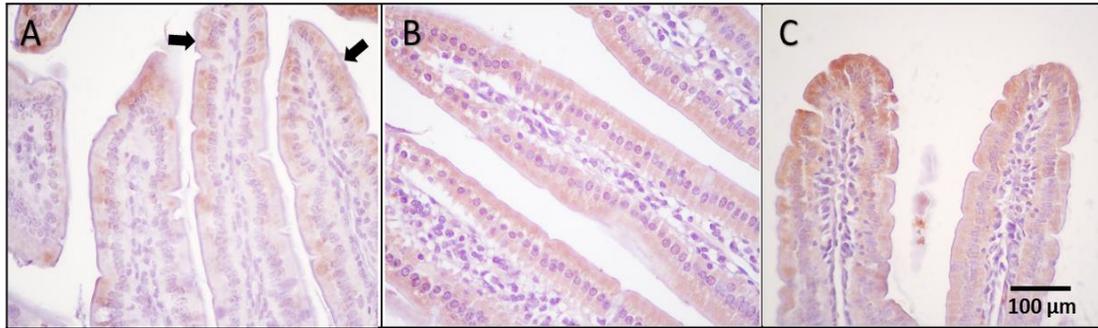


Figura 16.- Yeyuno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-4. A: 1H. Células positivas a TLR-4 en puntas de las vellosidades (→) y en porciones laterales de las mismas. Lámina propia sin cambios. B: 2H. Inmunomarcaje en la totalidad del recubrimiento epitelial y algunas células de la lámina propia. C: 4H. los enterocitos se encuentran con inmunomarcaje para TLR-4. Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.3.3 Íleon

Al revisar las secciones de Íleon procesadas para identificar TLR-4; en las muestras pertenecientes al grupo 1H, no se identificaron inmunomarcajes (Figura 17).



Figura 17.- Íleon de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-4. A: 1H. Inmunomarcaje en la región apical de enterocitos (→). B: 2H. Señal positiva en algunos enterocitos (→). C: 4H. Reacciones para TLR-4 a lo largo del revestimiento epitelial (→). En lámina propia, el inmunomarcaje se presenta en algunas células (δ). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

En las muestras del siguiente grupo de animales (2H), el epitelio se mostró con focos de reacción positiva para TLR-4. Los inmunomarcajes no se observó en células de la lámina propia.

En la revisión de cortes procesados con 4 horas de infección (4H), se pudo evidenciar un cambio tajante respecto al grupo anterior (2H). El marcaje positivo a TLR-4 fue más evidente, sobre todo en superficies apicales y basales de casi todos los enterocitos, así como en el interior de estos. Siguiendo con la identificación de células positivas para TLR-4 en lámina basal; estas continuaron siendo escasas.

4.2.4 IHC para TLR-2 en GALT

Las estructuras identificadas como tejido linfoide asociado a mucosa intestinal correspondieron en su mayoría a folículos linfoides aislados, aunque también estuvieron presentes Placas de Peyer y criptoplasmas.

4.2.4.1 Duodeno

En la primera hora PI; TLR-2 en GALT se mantuvo de manera dispersa (Figura 18), sobre todo en centros germinativos, que pudieron corresponder con células plasmáticas y linfocitos. Algunos enterocitos del epitelio asociado a folículo también presentaron reacciones positivas para este receptor.

En las muestras de animales con 2 horas PI (2H), los GALT presentaron inmunomarcajes para TLR-2 de manera frecuente y distribuida, en

comparación con el grupo anterior (Figura 18). Se observó positividad dentro de los centros germinativos. En domos subepiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas, mostraron un inmunomarcaje más definido en comparación al tiempo PI anterior. Los enterocitos del epitelio asociado a folículo presentaron reacciones positivas a TLR-2, principalmente en sus porciones apicales. En los cortes de muestras pertenecientes a las muestras recuperadas a las 4 horas PI (4H), el inmunomarcaje se concentró principalmente en el epitelio asociado a folículo. (FAE), que en esta ocasión las superficies apicales y basolaterales reaccionaron a los reactivos de la técnica (Figura 18).

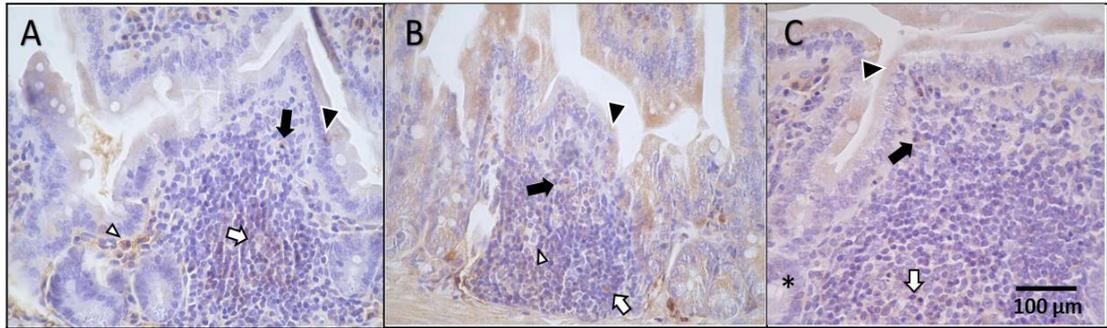


Figura 18.- Duodeno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-2. A: 1H. Foliculo linfoide aislado; con inmunomarcaje en células plasmáticas (→), linfocitos (δ), macrófagos (Δ) y enterocitos (▸). B: 2H. Foliculo linfoide aislado con inmunomarcaje positivo en células plasmáticas (→) y algunos linfocitos (δ), así como en enterocitos (▸) y macrófagos dentro del centro germinativo (Δ). Imagen 40x. C: 4H. Foliculo linfoide aislado con inmunomarcaje positivo en la totalidad de su epitelio (▸). En domo subepitelial; células plasmáticas (→) y linfocitos (δ) también se muestran positivos al marcador TLR-2. Criptas intestinales (asterisco). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.4.2 Yeyuno

Durante la primera hora PI el inmunomarcaje para TLR-2 se concentró en enterocitos de los FAE y en células de los folículos linfoides aislados (Figura 19). Varias de las células de centros germinativos fueron positivas. En las regiones de domos subepiteliales, algunos macrófagos y células dendríticas, también mostraron un inmunomarcaje definido. En muestras de animales con 2 horas PI (2H); las estructuras que componen los GALT presentaron inmunomarcajes para TLR-2 distintos a los observados en el tiempo PI anterior. Se visualizaron los FAE con una positividad que incluía la totalidad de los enterocitos, así como dentro de los centros germinativos que al igual que en las muestras anteriores, correspondían a células plasmáticas y linfocitos, aunque con una mayor presencia de macrófagos (algunos positivos al TLR-2). En domos subepiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas, mostraron un inmunomarcaje más definido en comparación al tiempo PI anterior (Figura 19).

En las muestras con 4 horas PI (4H); los GALT presentaron inmunomarcajes para TLR- 2 de manera similar al grupo anterior (2H) (Figura 19). Aunque en cuanto a los domos subepiteliales, los macrófagos presentes fueron más evidentes (con o sin positividad para TLR-2). Los enterocitos del epitelio asociado a folículo presentaron reacciones positivas al marcador

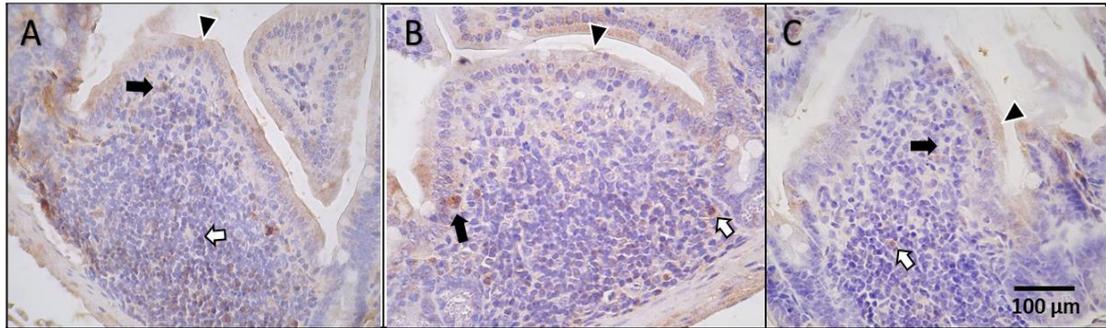


Figura 19.- Yeyuno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-2. A: 1H. Folículo linfoide aislado: Inmunomarcaje positivo presente en células plasmáticas (→) y linfocitos (δ). En el epitelio asociado a folículo (▸) se presentan porciones apicales positivas para TLR-2. B: 2H. Folículo linfoide aislado, con inmunomarcaje positivo para TLR-2 en macrófagos (→), linfocitos (δ) y enterocitos (▸). C: 4H. Criptoplaqa con inmunomarcajes para TLR-2 en las áreas del revestimiento epitelial (▸) y el domo subepitelial; en este último, específicamente en macrófagos y células plasmáticas (→). En centros germinativos se muestran linfocitos con dicho marcaje (δ), Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.4.3 Íleon

Las muestras de íleon correspondieron en muchas de las secciones, a placas de Peyer intestinales. En la primera hora PI el inmunomarcaje para TLR-2 se mostró en el FAE, mientras que, en las secciones de tiempos posteriores, las células positivas a TLR-2 se encontraron dispersas y numerosas (Figura 20). Se observaron células positivas en los centros germinativos que correspondían a células mononucleares, como células plasmáticas y linfocitos. En las regiones de domos subepiteliales, se observaron macrófagos y células dendríticas, con inmunomarcaje para TLR-2. En muestras con 2 horas PI (2H); se observó inmunomarcaje positivo en los GALT identificados. También se visualizaron en los FAE, específicamente en algunas áreas apicales de los enterocitos. En los centros germinativos se presentaron inmunomarcajes en macrófagos, células plasmáticas y linfocitos. En domos subepiteliales macrófagos y células dendríticas, se distinguió un inmunomarcaje positivo para TLR-2 (Figura 20). En la cuarta hora PI (4H) el inmunomarcaje para TLR-2 se mostró de manera generalizada los GALT, incluido el FAE (Figura 20). Igualmente, se identificó evidente positividad en los centros germinativos que correspondían a células plasmáticas y linfocitos. En las regiones de domos subepiteliales se lograron identificar macrófagos y células dendríticas con inmunomarcaje para TLR-2.

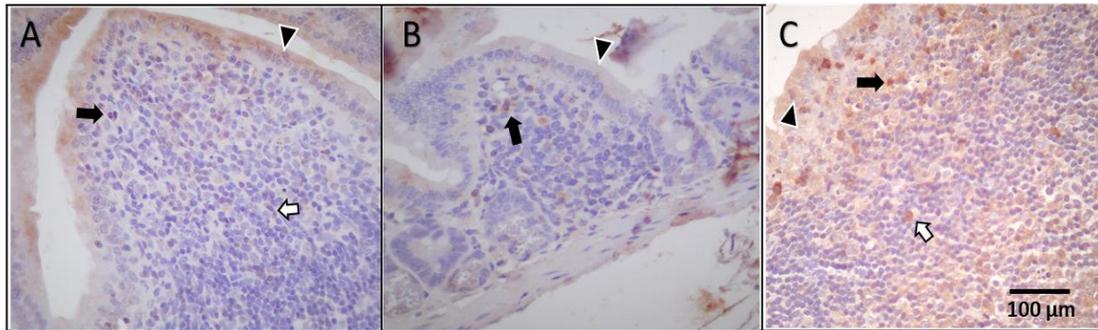


Figura 20.- Íleon de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-2. A: 1H. Placa de Peyer con inmunomarcajes para TLR-2 en células del domo subepitelial (→), así como en centros germinativos (ø) y en la porción apical de los enterocitos (▸). B: 2H: Folículo linfoide aislado, con inmunomarcaje positivo para TLR-2 en domo subepitelial(→) y en enterocitos del FAE (▸). C: 4H. Placa de Peyer con inmunomarcaje positivo para TLR-2 en domo subepitelial (→) y en centros germinativos (ø). Los enterocitos del FAE se muestran positivos para TLR-2 en su totalidad (▸). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.5 IHC para TLR-4 en GALT

4.2.5.1 Duodeno

En el grupo con 1 hora PI (1H) el inmunomarcaje para TLR-4 en el GALT (Figura 21). se evidenció en los centros germinativos, en células plasmáticas y linfocitos. En los domos subepiteliales, se observó en macrófagos y células dendríticas. Enterocitos del FAE también se observó positividad en la porción apical.

En las muestras con 2 horas PI (2H) los GALT presentaron inmunomarcajes para TLR- 4 con menor frecuencia y distribución, en comparación con el grupo anterior (Figura 21). Hubo escasa positividad en los centros germinativos que correspondían a células plasmáticas y linfocitos. En domos subepiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas, no mostraron un inmunomarcaje. Los enterocitos del FAE presentaron reacciones positivas a TLR-4, principalmente en sus porciones apicales.

En el grupo con 4 horas PI (4H); el inmunomarcaje para TLR-4 en el GALT (Figura 21) se mostró en centros germinativos. En las regiones de domos subepiteliales, se identificó en macrófagos y células dendríticas. Enterocitos del FAE también presentaron reacciones positivas para este receptor, tanto en regiones apicales como basales.

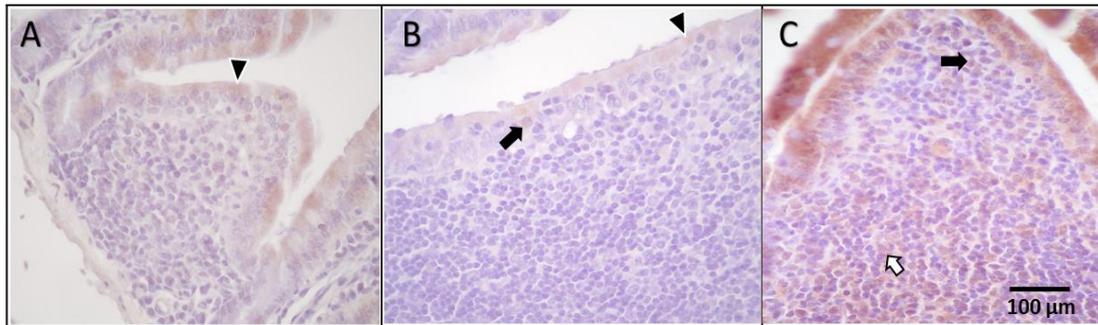


Figura 21.- Duodeno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. ICH para TLR-4. A: 1H. Inmunomarcaje en GALT, para TLR-4, donde se observan enterocitos (▶), con reacción positiva en la zona apical de sus citoplasmas. B: 2H. Placa de Peyer; se aprecia el inmunomarcaje positivo solo en células del FAE (▶), entre las que destaca una célula M (→). C: 4H. Inmunomarcaje en folículo linfoide aislado; ubicado en domo subepitelial (→) y enterocitos del FAE, así como en células que componen los centros germinativos (◊). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.5.2 Yeyuno

En las muestras con 1 hora PI; los GALT de yeyuno presentaron inmunomarcajes para TLR-4, aunque estos se encontraron limitados a ciertas áreas del FAE en sus regiones apicales (Figura 22). Se identificó poca positividad dentro de los centros germinativos que al igual que en las muestras anteriores, correspondían a células plasmáticas y linfocitos. En domos subepiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas, no mostraron un inmunomarcaje definido. En muestras con 2 horas PI; se presentaron inmunomarcajes para TLR-4 en los distintos GALT identificados. Se visualizaron los FAE con una positividad que solo se registraba en algunas áreas apicales de enterocitos. En los centros germinativos se presentaron escasos inmunomarcajes en macrófagos, células plasmáticas y linfocitos. En domos subepiteliales; algunos macrófagos y células dendríticas, mostraron un inmunomarcaje positivo para TLR-4 (Figura 22). En las muestras con 4 horas PI; los GALT presentaron inmunomarcajes para TLR-4 en áreas muy definidas (Figura 22). Generándose positividad dentro de los centros germinativos y que correspondían a células plasmáticas y linfocitos. En domos subepiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas, mostraron un inmunomarcaje poco conformado. Los enterocitos del epitelio asociado a folículo presentaron reacciones positivas a TLR-4 en la totalidad de sus estructuras.

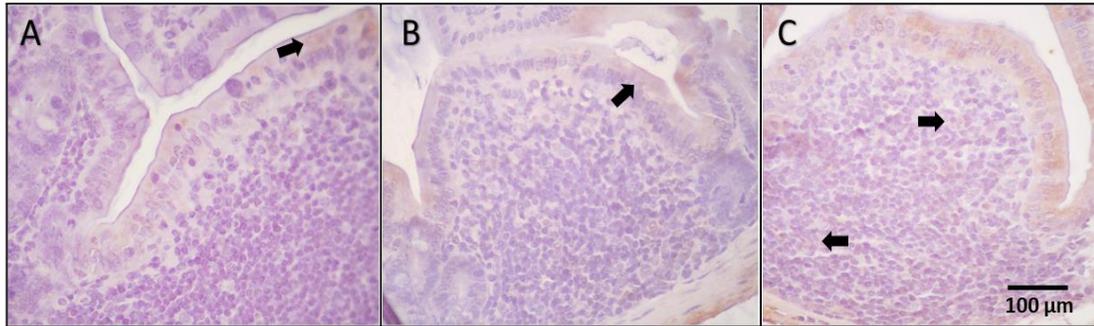


Figura 22.- Yeyuno de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-4. A: 1H. Inmunomarcaje en áreas apicales enterocitos (→) que conforman el FAE de una Placa de Peyer. B: 2H. Folículo linfoide aislado donde se registra el inmunomarcaje positivo para TLR-4 en regiones apicales de enterocitos (→) del FAE. C: 4H. Folículo linfoide aislado; con inmunomarcaje positivo para TLR-4 en células (→) del domo subepitelial y centros germinativos. Los enterocitos del FAE se muestran positivos para TLR-4; señal que se expresa en ambos polos celulares. Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.2.5.3 Íleon

En la primera hora PI (1H), las muestras de íleon no mostraron un inmunomarcaje superior a las muestras control; dichas reacciones para TLR-4 se mostraron de manera escasa y puntual en el FAE, mientras que, en las secciones internas, las células portadoras de este marcador se encontraron de manera diseminada y en cantidades muy escasas (Figura 23). En las regiones de domos subepiteliales, se lograron identificar algunos macrófagos y células dendríticas, algunas con inmunomarcaje para TLR-4. En la segunda hora PI (2H); el inmunomarcaje para TLR-4 en GALT, se concentró en superficies de enterocitos de los FAE y en escasas células del interior de los folículos linfoides aislados (Figura 23). Pocas de las células pertenecientes a los centros germinativos se identificaron como positivas. En las regiones de domos subepiteliales, algunos macrófagos y células dendríticas, también mostraron un inmunomarcaje definido. En las muestras con 4 horas PI (4H); los GALT presentaron inmunomarcajes para TLR-4 con características muy parecidas al grupo 2H, en donde el mayor inmunomarcaje se generó a lo largo del epitelio (Figura 23). En los centros germinativos solo se observaron sus elementos celulares habituales y que correspondían a macrófagos, células plasmáticas y linfocitos. En domos subepiteliales, tanto macrófagos como células dendríticas, no mostraron un inmunomarcaje. Algunos enterocitos del epitelio asociado a folículo presentaron reacciones positivas a TLR-4 en las porciones apicales de sus estructuras.

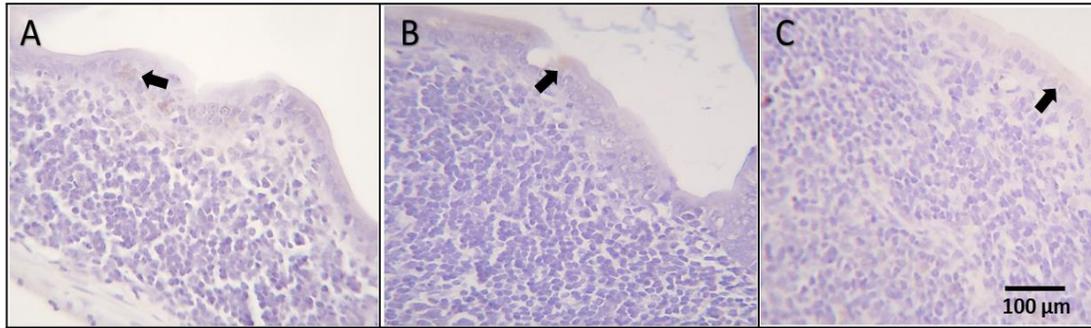


Figura 23.- Íleon de ratón Balb/c infectado con *E. cuniculi*. IHC para TLR-4. A: 1H. Folículo linfoide aislado con inmunomarcaje positivo para TLR-4 en porciones del FAE (→). B: 2H. Placa de Peyer con inmunomarcajes para TLR-4 en enterocitos; específicamente en su porción apical (→). C: 2H. Inmunomarcaje en Placa de Peyer; en la porción apical de los enterocitos de FAE (→). Avidina-Biotina. Contraste Hematoxilina. 40x.

4.5 Conteo de células positivas

4.5.1 TLR-2

Los conteos realizados para células positivas a TLR-2 están basados en los promedios registrados en muestras de vellosidades intestinales y en GALT (Tabla 2).

Muestra	Grupo	Número de células promediadas			Porcentajes	
		TLR-2+	TLR-2-	Total	%M	%C
Duodeno	1H	310	167	477	0.65	0.63
	2H	304	53	357	0.85	0.68
	4H	256	198	454	0.56	0.60
Yeyuno	1H	240	170	410	0.59	0.58
	2H	280	130	410	0.68	0.60
	4H	250	114	364	0.69	0.57
Íleon	1H	340	220	560	0.61	0.60
	2H	382	155	537	0.71	0.64
	4H	257	116	373	0.69	0.63
GALT Duodeno	1H	212	273	485	0.44	0.52
	2H	454	60	514	0.88	0.57
	4H	660	70	730	0.90	0.57
GALT Yeyuno	1H	722	182	904	0.80	0.70
	2H	800	125	925	0.86	0.73
	4H	409	45	454	0.90	0.71
GALT Íleon	1H	994	290	1284	0.77	0.68
	2H	220	50	270	0.81	0.67
	4H	1542	178	1720	0.90	0.65

Tabla 2.- Promedios y porcentajes registrados en células de muestras de vellosidades de diferentes porciones de intestino delgado procesadas para detectar TLR-2. La tabla indica los números enteros promediados para células positivas (TLR-2+) y células negativas (TLR-2-). Seguidos de los porcentajes resultantes tomando en cuanto el total de células TLR-2+, respecto al número de células TLR-2-, contabilizadas en las muestras de grupos infectados (%M) y seguido del porcentaje obtenido de los registros de las muestras control (%C).

4.5.2 TLR-4

Los conteos realizados en las muestras procesadas para TLR-4 están basados en los promedios registrados en cortes de vellosidades intestinales y aquellos que se encontraban en GALT (Tabla 3).

Muestra	Grupo	Número de células promediadas			Porcentajes	
		TLR-4+	TLR-4-	Total	%M	%C
Duodeno	1H	203	97	300	0.68	0.62
	2H	243	97	340	0.71	0.64
	4H	187	83	270	0.69	0.63
Yeyuno	1H	722	182	904	0.80	0.70
	2H	800	125	925	0.86	0.73
	4H	409	45	454	0.90	0.71
Íleon	1H	994	290	1284	0.77	0.68
	2H	220	50	270	0.81	0.67
	4H	1542	178	1720	0.90	0.65
GALT Duodeno	1H	190	420	610	0.31	0.25
	2H	140	409	549	0.26	0.27
	4H	190	403	593	0.32	0.26
GALT Yeyuno	1H	111	440	551	0.20	0.24
	2H	103	903	1006	0.10	0.23
	4H	170	744	914	0.19	0.23
GALT Íleon	1H	40	594	634	0.06	0.19
	2H	80	743	823	0.10	0.23
	4H	79	624	703	0.11	0.22

Tabla 3.- Promedios y porcentajes registrados en células de muestras de vellosidades de diferentes porciones de intestino delgado procesadas para detectar TLR-4. La tabla indica los números enteros promediados para células positivas (TLR-4+) y células negativas (TLR-4-). Seguidos de los porcentajes resultantes tomando en cuanto el total de células TLR-4+, respecto al número de células TLR-4-, contabilizadas en las muestras de grupos infectados (%M) y seguido del porcentaje obtenido de los registros de las muestras control (%C).

4.6 Análisis estadístico

Los resultados con ANOVA no mostraron una diferencia significativa en la mayoría de los datos, ya que solo uno de los factores (tiempo) se encontraba por debajo del valor p . Se llevó a cabo una comparación de medias a través de un t de Student; los cuales corresponden primeramente a los conteos registrados para TLR-2 en duodeno, yeyuno e íleon en vellosidades (Figuras 24) y en GALT (Figura 25).

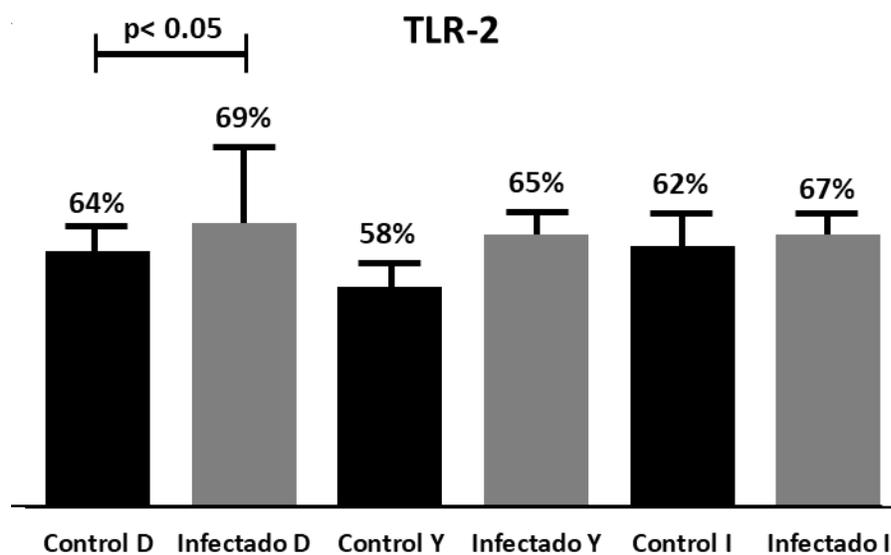


Figura 24.- Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-2 en vellosidades de grupos Control e Infectados. Los valores en duodeno (Control De Infectado D), presentaron una diferencia significativa ($p < .05$). En las comparaciones restantes, no se encontró una diferencia significativa.

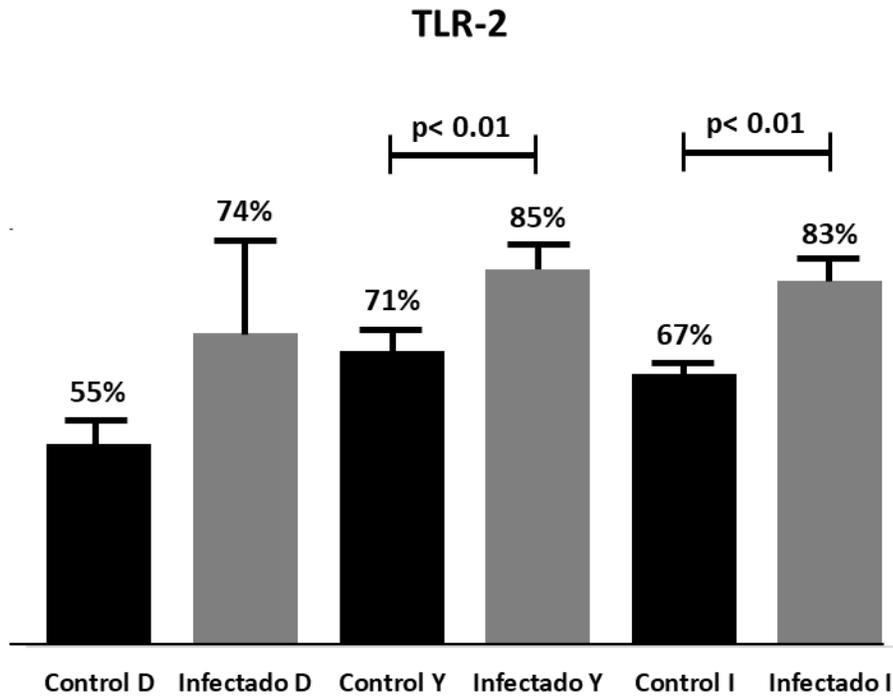


Figura 25.- Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-2 en GALT de grupos Control e Infectados. La comparación de valores en duodeno no demostró diferencia estadística. Mas no así en las correspondientes a secciones de yeyuno y de íleon; ambas con significancias de $p < 0.01$.

Se muestran los siguientes resultados estadísticos correspondientes a las mismas muestras, aunque procesadas para identificar TLR-4 en duodeno, yeyuno e íleon en vellosidades (Figuras 26) y posteriormente en GALT (Figuras 27).

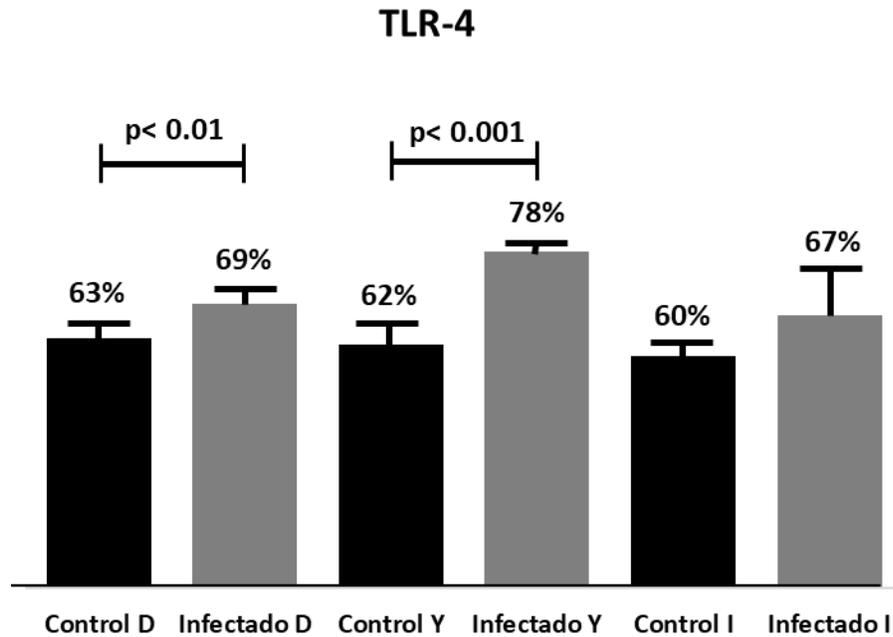


Figura 26.- Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-4 en vellosidades de grupos Control e Infectados. En la comparación de porcentajes en duodeno se encontró significancia estadística de $p < 0.01$. Mientras que, en las secciones de yeyuno, dicha comparación obtuvo una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$). En las secciones de íleon, no se obtuvo diferencia significativa.

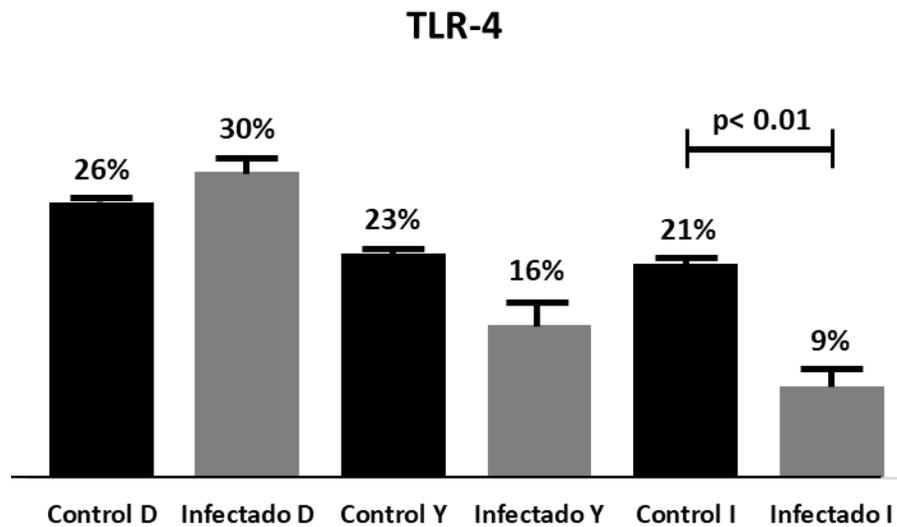


Figura 27.- Comparación de promedios de inmunomarcaje para TLR-4 en GALT de grupos Control e Infectados. En las comparaciones correspondientes a muestras de duodeno y de yeyuno, no se obtuvieron diferencias estadísticas. En íleon, se identificó una diferencia significativa ($p < 0.01$), siendo los valores de grupos control, los más elevados.

5. DISCUSIÓN

Al analizar los promedios del número de esporas para cada sección intestinal durante los distintos tiempos post inoculación, se demostró que las esporas transitaron a lo largo de las tres porciones intestinales durante el transcurso del experimento y a su vez, que dichos datos nos pueden describir su desplazamiento durante este periodo. Al enfocarnos en los detalles del proceso de tránsito de la spora por el tracto gastrointestinal (Padmanabhan et al., 2013; Schwarz et al., 1999), podemos sugerir que los inmunomarcajes representan alguna interacción entre determinantes antigénicos de la spora y del intestino en los ratones. En la primera hora postinfección (1H) se identificó la presencia de las esporas en las secciones de duodeno y yeyuno, mientras que en íleon estas se encontraban ausentes, coincidiendo con los tiempos de vaciado gástrico y tránsito intestinal previamente sugeridos en otros estudios (Schwarz et al., 2002; Woting & Blaut, 2018). En los demás tiempos de infección (2H y 4H), las porciones de duodeno mostraron una disminución en los conteos de esporas, en contraste con los incrementos graduales referidos para las secciones de yeyuno e íleon; ambas observaciones también concuerdan con las descripciones en las que la duración promedio del tránsito intestinal varía de 2-6 hrs (Padmanabhan et al., 2013; Schwarz et al., 2002) y difieren de aquellas observaciones en las que se establece un tránsito y vaciado total de tan solo 1 hora post inoculación (Myagmarjalbuu et al., 2013). En base a lo anterior, podríamos hacer referencia al número de esporas presentes en cada sección en un momento

determinado y compararlos con los resultados obtenidos en las respectivas muestras procesadas mediante inmunohistoquímica.

En estudios murinos, la expresión del receptor TLR-2 se ha clasificado como constitutiva en el epitelio intestinal (Hill & Diehl, 2018; Price *et al.*, 2018). En el presente estudio, las muestras provenientes de los animales control mostraron un escaso inmunomarcaje para TLR-2 en epitelio intestinal, el cual se ubicó en la porción apical de los enterocitos tanto en las vellosidades como en las criptas intestinales, así como en porciones apicales y basolaterales de los enterocitos de FAE de GALT, (Burgueño & Abreu, 2020; Cario *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2022). Por otro lado, el epitelio intestinal de las muestras provenientes de animales inoculados con las esporas presentó cambios importantes en la extensión de los inmunomarcajes, así como en su ubicación. Dichos cambios coincidieron con un aumento en el número de esporas en las diferentes secciones intestinales, siendo significativa en la porción duodenal ($p < .05$), posiblemente como resultado de una interacción específica, aun desconocida, entre la espora y un receptor intestinal. Lo anterior se puede considerar como un aumento en la expresión de TLR-2 que pudo ser influenciado por su estimulación con componentes estructurales de las esporas, epítomos, en el lumen intestinal (Ferguson & Foley, 2021; Hörmann *et al.*, 2014; Wolfgang *et al.*, 2000; Yanji *et al.*, 2006). Un posible efecto subsecuente del efecto mencionado, puede ser el aumento en la población de linfocitos intraepiteliales previamente descrito también en murinos después de la infección oral con *E.cuniculi*, la cual se vió acompañada de un incremento

en la producción de citocinas IFN- γ e IL-10 (M. Moretto *et al.*, 2004). Se han propuesto posibles epítomos contenidos en la espora (EcSWP1, EcSWP3, SWP3/EnP2) (Bohne *et al.*, 2011; Kaya *et al.*, 2011; Peuvel-Fanget *et al.*, 2006) o en el túbulo polar (PTP1-PTP5) (Frédéric *et al.*, 2001; B. Han & Weiss, 2017b; KEOHANE *et al.*, 1999) de *E. cuniculi* que pudieran estar generando la expresión de algunos de los principales PRRS. Lo anterior se ha reportado en macrófagos humanos expuestos a la espora, en donde la estimulación toma 1 hr en generar la traslocación de NF- κ B para producir TNF- α e IL-8 (Fischer *et al.*, 2008), lapso que en nuestro estudio podría ser relevante. Actualmente se han tomado como referencia ligandos que también se encuentran en otros miembros del reino Fungi, como lo son el zimosano y β -glucanos (β 1-3) (Liberti *et al.*, 2023; Taupin *et al.*, 2006; Zhong *et al.*, 2023). En modelos murinos, los β -glucanos actúan como ligandos del receptor dectina-1, receptor ubicado en células del linaje mieloide, como macrófagos/monocitos, células dendríticas y neutrófilos, y linaje linfoide (células $\gamma\delta$) (Mata-Martínez *et al.*, 2022). Esa unión de ligando-receptor dectina-1, en conjunto con TLR-2, inducirían la secreción de citocinas proinflamatorias como IL-12 y TNF- α (Gantner *et al.*, 2003), relación que Takeda calificó como una cooperación funcional (Takeda, 2004). Sin embargo, la respuesta proinflamatoria no es la única a considerar, ya que la activación de TLR-2 puede evocar tanto respuestas proinflamatorias como antiinflamatorias, las cuales dependen del tipo y el compartimiento celulares en el cual está siendo expresado tanto el ligando como el receptor (Colleselli *et al.*, 2023; Iliev, 2015). Dicha interacción proporciona un perfil de células dendríticas IL-10+ IL-12(p70)- IL-6 bajo y

macrófagos TGF-beta+, que inducirían una tolerancia inmunológica (Dillon, 2006). Netea y colaboradores describieron algo similar mediante la interacción de β -glucanos de *Candida albicans* y dectina-1/TLR-2, que como resultado desencadena la liberación de IL-10, la cual disminuye las propiedades microbicidas de los leucocitos, permitiéndole al microorganismo el evadir las respuestas del hospedador (Netea *et al.*, 2008). Lo anterior nos permite sugerir que, en el presente estudio, los cambios en el inmunomarcaje ubicados en la lámina propia y en epitelio intestinal (considerando que dectina-1 no ha sido descrita en epitelio intestinal murino, pero sí en células M), podrían ser indicios de las primeras interacciones de la espora con los receptores dectina-1 en cooperación funcional con TLR-2, quienes podrían “preparar” el entorno para una potencial infección. Esta idea cobra mayor importancia para el presente estudio al tomar en cuenta que ya se ha especificado mediante un modelo murino (ratones C57BL), que el microambiente antiinflamatorio promueve un entorno más permisivo para la multiplicación de *E. cuniculi* dentro de los macrófagos (M2) (Dalboni *et al.*, 2021), dando paso a la diseminación de la espora dentro del organismo hospedador (Franzen *et al.*, 2005).

Otros posibles ligandos para considerar en la interacción espora/TLR-2 y que pudieran estar implicados en los resultados observados en el presente estudio serían los anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI), localizados en la endospora de *E. cuniculi* (Brosson *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). En las membranas de *Toxoplasma gondii* o *Trypanosoma cruzi*, los GPI se han relacionado con la estimulación de TLR-2 murinos *in vitro* y una posterior

inducción de la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-12 y TNF- α) y óxido nítrico (NO) (Campos *et al.*, 2001), los cuales son cruciales para el control de la infección mediante una respuesta tipo Th1 (Cerbán *et al.*, 2020; Debierre-Grockiego *et al.*, 2007; Stahl *et al.*, 2014). Carrera y colaboradores también describieron una sobreexpresión de TLR-2 en células hepáticas de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, así como la disminución de dicha expresión en ratones C57BL/6 bajo las mismas condiciones (Carrera-Silva *et al.*, 2008). Se sugiere que el aumento de la expresión de TLR-2 visto en nuestro estudio ocurrió a nivel de mucosa debido a la interacción con la espora, ($p < .05$; solo en duodeno) y GALT (domo subepitelial y área perifolicular) ($p < .01$; yeyuno e íleon). Futuros trabajos esclarecerán la dirección del estímulo inmunológico generado mediante la estimulación de este receptor con la espora de *E. cuniculi*, que como ya se había mencionado haciendo referencia de otros microorganismos, esta puede ser antiinflamatoria o proinflamatoria.

Al igual que el limitado inmunomarcaje para TLR-2, esta característica también se observó en las muestras tratadas para identificar TLR-4, lo cual coincide con lo descrito en la literatura respecto a la pobre expresión de este receptor y su ubicación, primordialmente en enterocitos de las vellosidades y en células mesenquimales de la lámina propia (células mononucleares) (Hill & Diehl, 2018; Price *et al.*, 2018); aunque difiere de las observaciones que indican una mayor presencia de este receptor en las porciones de íleon, particularmente en la zona apical de los enterocitos de las criptas de esta sección y en las células de Paneth (Chabot *et al.*, 2006; Ortega-Cava *et al.*, 2003). El promedio

de células positivas a TLR-4 (en duodeno y yeyuno) sufrió un incremento, inicialmente los inmunomarcajes fueron conformados por enterocitos y posteriormente por células de la lámina propia ($p < .01$ y $p < .001$, respectivamente). Lo cual sugiere un papel importante del receptor TLR-4 ubicado en mucosa intestinal. Se sabe que TLR-4 es crucial para la activación de células dendríticas intestinales frente a *E. cuniculi*, así como el reconocimiento de este y posterior desarrollo de una respuesta específica (mediada por IgA) (Lawlor *et al.*, 2010; M. M. Moretto *et al.*, 2007, 2012). Entre los factores importantes a los que conlleva dicha activación es la liberación de IL-12 e IFN- γ por parte de linfocitos, células NK, macrófagos, células dendríticas y células de exudado peritoneal (macrófagos, linfocitos y neutrófilos) (Braunfuchsová *et al.*, 1999; Didier & Shaddock, 1994; Fischer *et al.*, 2008; Y. Han *et al.*, 2020), lo que provoca la eliminación de la infección. Esto puede originarse debido a la activación de linfocitos intraepiteliales, las cuales se sabe bajo ese esquema, suprimen la presencia de la espora (M. M. Moretto *et al.*, 2012; M. M. Moretto & Khan, 2022). Para esto, la activación de macrófagos también se vuelve un factor importante, que involucra la utilización de dichos receptores (TLR-4) para poder generar los productos microbianos necesarios para contrarrestar la espora (González-Machorro *et al.*, 2019; Nevárez-Garza *et al.*, 2018). Se ha descrito en ratones que la activación de TLR-4, proporcionaría estímulos que favorecen la permeabilidad de la barrera intestinal y la liberación de elementos que promueven la proliferación celular e inflamación (Ferguson & Foley, 2021; Peterson & Artis, 2014), que, en el escenario de una encefalitozoonosis, se prevé una respuesta Th1 que

apuntaría a la resistencia del individuo frente a la enfermedad (Khan *et al.*, 1999; M. M. Moretto & Khan, 2022; Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016b).

Las descripciones correspondientes al EAF del GALT, ubican a TLR-4 en la porción basolateral (Abreu, 2010), dato que no coincidió con lo observado en las muestras control de este estudio, en donde el inmunomarcaje se ubicó a ambos polos de los enterocitos, aunque predominantemente en la región apical. Autores han identificado a algunas de esas células como células M (Burgueño & Abreu, 2020). Cabe mencionar que TLR-4 se ha considerado como un receptor intra y extracelular, al ser expresado en endosomas (aparato de Golgi) y en la membrana citoplasmática (Hornef *et al.*, 2002; Tam *et al.*, 2021), lo cual pudiera reflejar las diferencias observadas bajo las condiciones de nuestro experimento. En la porción interfolicular y de domo subepitelial (SED), se identificaron también células mononucleares expresando el receptor, que como lo aclara la literatura pudieran corresponder con macrófagos, células dendríticas y linfocitos (Jilling *et al.*, 2006). Aunque en GALTs duodenales se identificaron inmunomarcajes posteriores al momento de la inoculación con la espora, fue solo en las diferencias del inmunomarcaje de íleon respecto a su control, en donde se adquirió una diferencia significativa $p < .01$; siendo el registro del número de células que expresaban TLR-4 del grupo infectado, menor que su respectivo control. Lo mismo ocurrió en yeyuno, aunque sus datos no arrojaron una significancia estadística. A partir de esta característica, se debe mencionar que la activación de TLR-2 está relacionada a una regulación de TLR-4; tomando en consideración que las respuestas

orientadas a la activación de este último en su polarización basolateral inducen los ya mencionados aumentos en la permeabilidad que continuarían con una respuesta proinflamatoria (Ferguson & Foley, 2021; Nighot *et al.*, 2019). En base a lo anterior, se puede plantear que los resultados del estudio para ambos receptores (en GALT), sugieren que la expresión de TLR-2 en yeyuno e íleon ($p < .01$, en ambas secciones), pudo ejercer un efecto de regulación frente a TLR-4 en ambas porciones ($p < .01$, en íleon). Este esquema de resultados nos permite enfatizar en la necesidad de futuros trabajos que se encaminen en dilucidar la gama de respuestas que corresponden a la estimulación específicas de los receptores y las células aquí evidenciadas, bajo el contexto de una encefalitozoonosis a nivel gastrointestinal

6. CONCLUSIONES

Dentro de las primeras cuatro horas de una infección peroral con *E. cuniculi*, el epitelio de la mucosa intestinal duodenal presenta un aumento en la expresión de TLR-2 y TLR-4.

En GALT de yeyuno e íleon, el número de células que presentan TLR-2 aumentan durante las primeras cuatro horas posteriores a la inoculación de la espora.

Durante la interacción inicial de *E. cuniculi* con la mucosa del epitelio yeyunal, se genera una expresión de TLR-4.

En GALT a nivel de íleon, la presencia de células positivas para TLR-4 disminuye de manera significativa durante el transcurso del tránsito de la espora.

En GALT a nivel de íleon, la presencia de la espora podría promover una respuesta regulatoria de TLR-2 sobre la expresión de TLR-4.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). *Cellular and molecular immunology: Cellular and molecular immunology* (10th ed.). Elsevier.
- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131–144. <https://doi.org/10.1038/nri2707>
- Abu-Akkada, S. S., El Kerdany, E. D. H., Mady, R. F., Diab, R. G., Khedr, G. A. E., Ashmawy, K. I., & Lotfy, W. M. (2015). Encephalitozoon cuniculi infection among immunocompromised and immunocompetent humans in Egypt. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(4), 561–570.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Functions of toll-like receptors: Lessons from KO mice. In *Comptes Rendus - Biologies* (Vol. 327, Issue 6, pp. 581–589). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.04.002>
- Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S.-Y., Ko, H.-J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends in Immunology*, 39(9), 677–696. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002>
- Al-Sadi, H. I., & Al-Mahmood, S. S. (2014). Pathology of experimental Encephalitozoon cuniculi infection in immunocompetent and immunosuppressed mice in Iraq. *Pathology Research International*, 2014, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/857036>
- Baker, D. G. (2008). Flynn's Parasites of Laboratory Animals: Second Edition. In D. G. Baker (Ed.), *Flynn's Parasites of Laboratory Animals: Second Edition*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470344552>
- Bernal, C. E., Zorro, M. M., Sierra, J., Gilchrist, K., Botero, J. H., Baena, A., & Ramirez-Pineda, J. R. (2016). Encephalitozoon intestinalis inhibits dendritic cell differentiation through an IL-6-dependent mechanism. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00004>
- Beutler, B., & Rehli, M. (2002). Evolution of the TIR, Tolls and TLRs: Functional inferences from computational biology. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 270, pp. 1–21). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59430-4_1
- Bohne, W., Böttcher, K., & Groß, U. (2011). The parasitophorous vacuole of Encephalitozoon cuniculi: Biogenesis and characteristics of the host cell-pathogen interface. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(5), 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.006>

- Bohne, W., Ferguson, D. J. P., Kohler, K., & Gross, U. (2000). Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine- rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity*, *68*(4), 2268–2275. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.4.2268-2275.2000>
- Bohumil, S., Daniel, B., Markéta, P., Dana, K., Michael, R., Martin, K., Věra, T., Zuzana, H., & Martin, K. (2020). Unapparent Microsporidial Infection among Immunocompetent Humans in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(3), 1064–1070. <https://doi.org/10.1128/jcm.01147-10>
- Bologna-Molina, R., Damián-Matsumura, P., & Molina-Frechero, N. (2011). An easy cell counting method for immunohistochemistry that does not use an image analysis program. *Histopathology*, *59*(4), 801–803. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03954.x>
- Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. In *Structure* (Vol. 19, Issue 4, pp. 447–459). <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004>
- Braunfuchsová, P., Kopecký, J., Ditrich, O., & Koudela, B. (1999). Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitologica*, *46*(2), 91–95.
- Brosson, D., Kuhn, L., Prensier, G., VivarÃ“s, C. P., & Texier, C. (2005). The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: A surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiology Letters*, *247*(1), 81–90. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.031>
- Burgueño, J. F., & Abreu, M. T. (2020). Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *17*(5), 263–278. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0261-4>
- Cagle, L. A., Franzi, L. M., Epstein, S. E., Kass, P. H., Last, J. A., & Kenyon, N. J. (2017). Injectable Anesthesia for Mice: Combined Effects of Dexmedetomidine, Tiletamine-Zolazepam, and Butorphanol. *Anesthesiology Research and Practice*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9161040>
- Cali, A., & Takvorian, P. M. (2014). Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In L. M. W. and J. J. Becnel (Ed.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (1st ed., pp. 71–133). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch2>
- Campos, M. A. S., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procópio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., &

- Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of Toll-Like Receptor-2 by Glycosylphosphatidylinositol Anchors from a Protozoan Parasite. *The Journal of Immunology*, 167(1), 416–423.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>
- Carhan, A., Ozkan, O., & Ozkaya, E. (2015). The First Identification of Encephalitozoon cuniculi Infection in an Animal Care Worker in Turkey. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(2), 280–285.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26246827>
- Cario, E., Brown, D., McKee, M., Lynch-Devaney, K., Gerken, G., & Podolsky, D. K. (2002). Commensal-Associated Molecular Patterns Induce Selective Toll-Like Receptor-Trafficking from Apical Membrane to Cytoplasmic Compartments in Polarized Intestinal Epithelium. *The American Journal of Pathology*, 160(1), 165–173.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64360-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64360-X)
- Carrera-Silva, E. A., Carolina, C. R., Natalia, G., Pilar, A. M., Andrea, P., & Gea, S. (2008). TLR2, TLR4 and TLR9 are differentially modulated in liver lethally injured from BALB/c and C57BL/6 mice during Trypanosoma cruzi acute infection. *Molecular Immunology*, 45(13), 3580–3588.
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.05.004>
- Cerbán, F. M., Stempin, C. C., Volpini, X., Carrera Silva, E. A., Gea, S., & Motran, C. C. (2020). Signaling pathways that regulate Trypanosoma cruzi infection and immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1866(5), 165707.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165707>
- Cesta, M. F. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 599–608.
<https://doi.org/10.1080/01926230600865531>
- Chabot, S., Wagner, J. S., Farrant, S., & Neutra, M. R. (2006). TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *The Journal of Immunology*, 176(7), 4275–4283.
- Chassaing, B., Kumar, M., Baker, M. T., Singh, V., & Vijay-Kumar, M. (2014). Mammalian gut immunity. In *Biomedical Journal* (Vol. 37, Issue 5, pp. 246–258). Chang Gung Medical Journal. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.130922>
- Colleselli, K., Stierschneider, A., & Wiesner, C. (2023). An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Pro- and Anti-Inflammatory Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(15), 12464.
<https://doi.org/10.3390/ijms241512464>

- Corradi, N., Pombert, J.-F., Farinelli, L., Didier, E. S., & Keeling, P. J. (2010). The complete sequence of the smallest known nuclear genome from the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications*, 1(1), 77. <https://doi.org/10.1038/ncomms1082>
- Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., & Zimmerli, S. (2000). Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infection and Immunity*, 68(12), 6939–6945. <https://doi.org/10.1128/iai.68.12.6939-6945.2000>
- Cressey, D. (2013). Best way to kill lab animals sought. In *Nature* (Vol. 500, Issue 7461, pp. 130–131). <https://doi.org/10.1038/500130a>
- Dalboni, L. C., Alvares Saraiva, A. M., Konno, F. T. de C., Perez, E. C., Codeceira, J. F., Spadacci-Morena, D. D., & Lallo, M. A. (2021). *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. *PLoS One*, 16(3), e0247658–e0247658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247658>
- Dávila-Martínez, C., Castillo-Velázquez, U., Soto-Domínguez, A., Nevárez-Garza, A. M., Arce-Mendoza, A. Y., Hernandez-Vidal, G., Zamora-Avila, D. E., & Rodríguez-Tovar, L. E. (2020). Immunohistochemical localization of TNF- α and IL-4 in granulomas of immunocompetent and immunosuppressed New Zealand white rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Cytokine*, 130. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155055>
- Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). Veterinary Immunology. In *Veterinary Immunology*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b16892>
- Debierre-Grockiego, F., Campos, M. A., Azzouz, N., Schmidt, J., Bieker, U., Resende, M. G., Mansur, D. S., Weingart, R., Schmidt, R. R., Golenbock, D. T., Gazzinelli, R. T., & Schwarz, R. T. (2007). Activation of TLR2 and TLR4 by Glycosylphosphatidylinositols Derived from *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 179(2), 1129–1137. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1129>
- Denman, A. M. (1992). Cellular and Molecular Immunology. *Postgraduate Medical Journal*, 68(798), 305. <https://doi.org/10.1136/pgmj.68.798.305>
- Desportes, I., Charpentier, Y. Le, Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., & Modigliani, R. (1985). Occurrence of a New Microsporidan: *Enterocytozoon bienewisi* n. g., n. sp., in the Enterocytes of a Human Patient with AIDS. *The Journal of Protozoology*, 32(2), 250–254. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1985.tb03046.x>

- Didier, E. S. (2005). Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Tropica*.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.01.010>
- Didier, E. S., & Khan, I. A. (2014). The Immunology of Microsporidiosis in Mammals. In L. M. W. and J. J. Becnel (Ed.), *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* (1st ed., pp. 307–325). John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch11>
- Didier, E. S., & Shadduck, J. A. (1994). IFN-gamma and LPS induce murine macrophages to kill *Encephalitozoon cuniculi* in vitro. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 41(5), 34S.
- Didier, E. S., & Weiss, L. M. (2006). Microsporidiosis: Current status. In *Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 19, Issue 5, pp. 485–492).
<https://doi.org/10.1097/01.qco.0000244055.46382.23>
- Dillon, S. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 916–928.
<https://doi.org/10.1172/JCI27203>
- Feldman, S. H., & Easton, D. N. (2006). Occupational Health and Safety. In *The Laboratory Rat* (pp. 565–586). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/B978-012074903-4/50020-0>
- Ferguson, M., & Foley, E. (2021). Microbial recognition regulates intestinal epithelial growth in homeostasis and disease. *The FEBS Journal*.
<https://doi.org/10.1111/febs.15910>
- Fischer, J., Suire, C., & Hale-Donze, H. (2008). Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF- κ B and subsequent inflammatory responses. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.00733-08>
- Franzen, C., Mueller, A., Hartmann, P., & Salzberger, B. (2005). Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). *Parasitology*, 130, 285–292.
<https://doi.org/10.1017/S003118200400633X>
- Frédéric, D., Isabelle, P., Guy, M., Eric, P., & P, V. C. (2001). Microsporidian Invasion Apparatus: Identification of a Novel Polar Tube Protein and Evidence for Clustering of *ptp1* and *ptp2* Genes in Three *Encephalitozoon* Species. *Infection and Immunity*, 69(2), 1016–1024.
<https://doi.org/10.1128/iai.69.2.1016-1024.2001>
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., & Underhill, D. M. (2003). Collaborative Induction of Inflammatory Responses by Dectin-1

and Toll-like Receptor 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 197(9), 1107–1117. <https://doi.org/10.1084/jem.20021787>

- Ghosh, K., Schwartz, D., & Weiss, L. M. (2014). Laboratory Diagnosis of Microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition* (pp. 421–456). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch17>
- Ghosh, K., & Weiss, L. M. (2012). T cell response and persistence of the microsporidia. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Issue 3, pp. 748–760). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00318.x>
- Gigley, J. P., & Khan, I. A. (2011). Plasmacytoid DC from aged mice down-regulate CD8 T cell responses by inhibiting CDC maturation after encephalitozoon cuniculi infection. *PLoS ONE*, 6(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020838>
- González-Machorro, J. R., Rodríguez-Tovar, L. E., Gómez-Flores, R., Soto-Dominguez, A., Rodríguez-Rocha, H., Garcia-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). <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06310-0>
- Gupta, A. O., & Singh, N. (2011). Immune reconstitution syndrome and fungal infections. In *Current Opinion in Infectious Diseases* (Vol. 24, Issue 6, pp. 527–533). <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834ab20a>
- Han, B., Polonais, V., Sugi, T., Yakubu, R., Takvorian, P. M., Cali, A., Maier, K., Long, M., Levy, M., Tanowitz, H. B., Pan, G., Delbac, F., Zhou, Z., & Weiss, L. M. (2017). The role of microsporidian polar tube protein 4 (PTP4) in host cell infection. *PLoS Pathogens*, 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006341>
- Han, B., Takvorian, P. M., & Weiss, L. M. (2020). Invasion of Host Cells by Microsporidia. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00172>
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017a). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0018-2016>
- Han, B., & Weiss, L. M. (2017b). Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiology Spectrum*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016>

- Han, Y., Gao, H., Xu, J., Luo, J., Han, B., Bao, J., Pan, G., Li, T., & Zhou, Z. (2020). Innate and Adaptive Immune Responses Against Microsporidia Infection in Mammals. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1468. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01468>
- Hill, A. A., & Diehl, G. E. (2018). Identifying the Patterns of Pattern Recognition Receptors. *Immunity*, *49*(3), 389–391. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.08.027>
- Hinney, B., Sak, B., Joachim, A., & Kváč, M. (2016). More than a rabbit's tale - Encephalitozoon spp. in wild mammals and birds. In *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.01.001>
- Hocevar, S. N., Paddock, C. D., Spak, C. W., Rosenblatt, R., Diaz-Luna, H., Castillo, I., Luna, S., Friedman, G. C., Antony, S., Stoddard, R. A., Tiller, R. V., Peterson, T., Blau, D. M., Sriram, R. R., Da Silva, A., De Almeida, M., Benedict, T., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., ... Kuehnert, M. J. (2014). Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation a public health investigation. *Annals of Internal Medicine*, *160*(4), 213–220.
- Hörmann, N., Brandão, I., Jäckel, S., Ens, N., Lillich, M., Walter, U., & Reinhardt, C. (2014). Gut Microbial Colonization Orchestrates TLR2 Expression, Signaling and Epithelial Proliferation in the Small Intestinal Mucosa. *PLOS ONE*, *9*(11), e113080–e113080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113080>
- Hornef, M. W., Frisan, T., Vandewalle, A., Normark, S., & Richter-Dahlfors, A. (2002). Toll-like Receptor 4 Resides in the Golgi Apparatus and Colocalizes with Internalized Lipopolysaccharide in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *195*(5), 559–570. <https://doi.org/10.1084/jem.20011788>
- Iliev, I. D. (2015). Dectin-1 Exerts Dual Control in the Gut. *Cell Host & Microbe*, *18*(2), 139–141. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.010>
- Jilling, T., Simon, D., Lu, J., Meng, F. J., Li, D., Schy, R., Thomson, R. B., Soliman, A., Arditi, M., & Caplan, M. S. (2006). The Roles of Bacteria and TLR4 in Rat and Murine Models of Necrotizing Enterocolitis. *The Journal of Immunology*, *177*(5), 3273–3282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3273>
- Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. In *Immunity* (Vol. 34, Issue 5, pp. 637–650). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>

- Kaya, G., Eddie, N., Patrick, K., Jean-Francois, P., P, H. P., Ann, C., & M, W. L. (2011). Branching Network of Proteinaceous Filaments within the Parasitophorous Vacuole of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. *Infection and Immunity*, *79*(3), 1374–1385. <https://doi.org/10.1128/iai.01152-10>
- KEOHANE, E. M., ORR, G. A., TAKVORIAN, P. M., CALI, A. N. N., TANOWITZ, H. B., WITTNER, M., & WEISS, L. M. (1999). Polar Tube Proteins of Microsporidia of the Family Encephalitozoonidae. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*(1), 1–5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04569.x>
- Khan, I. A., & Didier, E. S. (2000). Insights into the Immune Responses to Microsporidia. *Rivers*, *9*, 135–157. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-7846-0_9
- Khan, I. A., Moretto, M., & Weiss, L. M. (2001). Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes and Infection*, *3*(5), 401–405.
- Khan, I. A., Schwartzman, J. D., Kasper, L. H., & Moretto, M. (1999). CD8+ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *162*(10), 6086–6091.
- Kotková, M., Sak, B., & Kváč, M. (2018). Differences in the intensity of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype II and III - Comparison using quantitative real-time PCR. *Experimental Parasitology*, *192*. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.07.019>
- Kotkova, M., Sak, B., Kvetonova, D., & Kvac, M. (2013). Latent Microsporidiosis Caused by *Encephalitozoon cuniculi* in Immunocompetent Hosts: A Murine Model Demonstrating the Ineffectiveness of the Immune System and Treatment with Albendazole. *PLoS ONE*, *8*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060941>
- Lallo, M. A., da Costa, L. F. V., & de Castro, J. M. (2013). Effect of three drugs against *Encephalitozoon cuniculi* infection in immunosuppressed mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *57*(7), 3067–3071. <https://doi.org/10.1128/AAC.00157-13>
- Lallo, M. A., Vidoto Da Costa, L. F., Alvares-Saraiva, A. M., Rocha, P. R. D., Spadacci-Morena, D. D., Konno, F. T. de C., & Suffredini, I. B. (2016). Culture and propagation of microsporidia of veterinary interest. In *Journal of Veterinary Medical Science* (Vol. 78, Issue 2). <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0401>

- Latney, L., Nicole R. Wyre, N., & Charles Bradley, C. (2014). Encephalitozoon cuniculi in pet rabbits: diagnosis and optimal management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 169. <https://doi.org/10.2147/VMRR.S49842>
- Lawlor, E. M., Moretto, M. M., & Khan, I. A. (2010). Optimal CD8 T-cell response against Encephalitozoon cuniculi is mediated by toll-like receptor 4 upregulation by dendritic cells. *Infection and Immunity*, 78(7), 3097–3102. <https://doi.org/10.1128/IAI.00181-10>
- Lee, S. C., Corradi, N., Byrnes III, E. J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F. S., Keeling, P. J., & Heitman, J. (2008). Microsporidia Evolved from Ancestral Sexual Fungi. *Current Biology*, 18(21), 1675–1679. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.09.030>
- Leitch, G. J., & Ceballos, C. (2008). Effects of host temperature and gastric and duodenal environments on microsporidia spore germination and infectivity of intestinal epithelial cells. *Parasitology Research*, 104(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1156-4>
- Levitz, S. M. (2004). Interactions of Toll-like receptors with fungi. In *Microbes and Infection* (Vol. 6, Issue 15, pp. 1351–1355). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.014>
- Liberti, A., Pollastro, C., Pinto, G., Illiano, A., Marino, R., Amoresano, A., Spagnuolo, A., & Sordino, P. (2023). Transcriptional and proteomic analysis of the innate immune response to microbial stimuli in a model invertebrate chordate. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1217077>
- Lizundia, R., Sauter, K. S., Taylor, G., & Werling, D. (2008). Host species-specific usage of the TLR4-LPS receptor complex. *Innate Immunity*, 14(4), 223–231. <https://doi.org/10.1177/1753425908095957>
- 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>
- Marková, J., Macháčová, T., Bártová, E., Sedlák, K., Budíková, M., Silvestre, P., Laricchiuta, P., Russo, M., & Veneziano, V. (2019). Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Encephalitozoon cuniculi in Animals from Captivity (Zoo and Circus Animals). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(3). <https://doi.org/10.1111/jeu.12688>

- Mata-Martínez, P., Bergón-Gutiérrez, M., & del Fresno, C. (2022). Dectin-1 Signaling Update: New Perspectives for Trained Immunity. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812148>
- Mathews, A., Hotard, A., & Hale-Donze, H. (2009). Innate immune responses to Encephalitozoon species infections. In *Microbes and Infection* (Vol. 11, Issue 12, pp. 905–911). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.06.004>
- Mathis, A., Weber, R., & Deplazes, P. (2005). Zoonotic potential of the microsporidia. In *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.3.423-445.2005>
- Mehlhorn, H. (2016). Encephalitozoon cuniculi. In *Encyclopedia of Parasitology* (pp. 888–890). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4_1035
- Meredith, A. L., Cleaveland, S. C., Brown, J., Mahajan, A., & Shaw, D. J. (2015). Seroprevalence of Encephalitozoon cuniculi in Wild Rodents, Foxes and domestic cats in three sites in the United Kingdom. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(2), 148–156. <https://doi.org/10.1111/tbed.12091>
- Molestina, R., Becnel, J. J., & Weiss, L. M. (2014). Culture and Propagation of Microsporidia. In *Microsporidia: Pathogens of Opportunity: First Edition* (pp. 457–467). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118395264.ch18>
- Moretto, M. M., Harrow, D. I., Hawley, T. S., & Khan, I. A. (2015). Interleukin-12-producing CD103+ CD11b- CD8+ dendritic cells are responsible for eliciting gut intraepithelial lymphocyte response against Encephalitozoon cuniculi. *Infection and Immunity*, 83(12), 4719–4730. <https://doi.org/10.1128/IAI.00820-15>
- Moretto, M. M., & Khan, I. A. (2022). *Immune Response to Microsporidia* (pp. 373–388). https://doi.org/10.1007/978-3-030-93306-7_13
- Moretto, M. M., Khan, I. A., & Weiss, L. M. (2012). Gastrointestinal Cell Mediated Immunity and the Microsporidia. *PLOS Pathogens*, 8(7), e1002775–e1002775. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002775>
- Moretto, M. M., Lawlor, E. M., & Khan, I. A. (2008). Aging mice exhibit a functional defect in mucosal dendritic cell response against an intracellular pathogen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 181(11), 7977–7984.
- Moretto, M. M., Weiss, L. M., Combe, C. L., & Khan, I. A. (2007). IFN- γ -Producing Dendritic Cells Are Important for Priming of Gut Intraepithelial Lymphocyte Response Against Intracellular Parasitic Infection. *The*

Journal of Immunology, 179(4), 2485–2492.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2485>

Moretto, M., Weiss, L. M., & Khan, I. A. (2004). Induction of a Rapid and Strong Antigen-Specific Intraepithelial Lymphocyte Response during Oral *Encephalitozoon cuniculi* Infection. *The Journal of Immunology*, 172(7), 4402–4409. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4402>

Moura, M. L. C. de, Alvares-Saraiva, A. M., Pérez, E. C., Xavier, J. G., Spadacci-Morena, D. D., Moysés, C. R. S., Rocha, P. R. D., & Lallo, M. A. (2019). Cyclophosphamide Treatment Mimics Sub-Lethal Infections with *Encephalitozoon intestinalis* in Immunocompromised Individuals. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 10, p. 2205). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02205>

Mukherjee, S., Huda, S., & Sinha Babu, S. P. (2019). Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. In *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 90, Issue 1). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/sji.12771>

Mukherjee, S., Karmakar, S., & Babu, S. P. S. (2016). TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2), 193–204. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.10.011>

Mungenast, F., Meshcheryakova, A., Beer, A., Salzmann, M., Tamandl, D., Gruenberger, T., Pietschmann, P., Koperek, O., Birner, P., Kirsch, I., Robins, H., Mittlboeck, M., Jaritz, M., Bergmann, M., Zimmermann, P., & Mechtcheriakova, D. (2020). The Immune Phenotype of Isolated Lymphoid Structures in Non-Tumorous Colon Mucosa Encrypts the Information on Pathobiology of Metastatic Colorectal Cancer. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/cancers12113117>

Murphy, K., & Weaver, C. (2017). Janeway 'S immunobiology 9th Edition. *Garland Science: Taylor & Francis Group*, 1–855.

Myagmarjalbuu, B., Moon, M. J., Heo, S. H., Jeong, S. I., Park, J.-S., Jun, J. Y., Jeong, Y. Y., & Kang, H. K. (2013). Establishment of a Protocol for Determining Gastrointestinal Transit Time in Mice Using Barium and Radiopaque Markers. *Korean J Radiol*, 14(1), 45–50. <https://doi.org/10.3348/kjr.2013.14.1.45>

Nell, B., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., & Maaß, G. (2015). *Encephalitozoon cuniculi* causes focal anterior cataract and uveitis in dogs. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*. <https://doi.org/10.15654/TPK-141053>

- Netea, M. G., Brown, G. D., Kullberg, B. J., & Gow, N. A. R. (2008). An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews. Microbiology*, *6*(1), 67–78. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1815>
- Neto, A. F., Dell'Armeline Rocha, P. R., Perez, E. C., Xavier, J. G., Peres, G. B., Spadacci-Morena, D. D., Alvares-Saraiva, A. M., & Lallo, M. A. (2017). Diabetes mellitus increases the susceptibility to encephalitozoonosis in mice. *PLoS ONE*, *12*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186954>
- Nevárez-Garza, A. M., Castillo-Velázquez, U., Soto-Domínguez, A., Montede-Oca-Luna, R., Zamora-Ávila, D. E., Wong-González, A., & Rodríguez-Tovar, L. E. (2018). Quantitative analysis of TNF- α IL-4, and IL-10 expression, nitric oxide response, and apoptosis in *Encephalitozoon cuniculi*-infected rabbits. *Developmental and Comparative Immunology*, *81*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.004>
- Nighot, M., Rawat, M., Al-Sadi, R., Castillo, E. F., Nighot, P., & Ma, T. Y. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Permeability Is Mediated by TAK-1 Activation of IKK and MLCK/MYLK Gene. *The American Journal of Pathology*, *189*(4), 797–812. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.12.016>
- Orlik, J., Böttcher, K., Gross, U., & Bohne, W. (2010). Germination of phagocytosed *E. cuniculi* spores does not significantly contribute to parasitophorous vacuole formation in J774 cells. *Parasitology Research*, *106*(3), 753–755. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1736-y>
- Ortega-Cava, C. F., Ishihara, S., Rumi, M. A. K., Kawashima, K., Ishimura, N., Kazumori, H., Udagawa, J., Kadowaki, Y., & Kinoshita, Y. (2003). Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *The Journal of Immunology*, *170*(8), 3977–3985.
- Padmanabhan, P., Grosse, J., Asad, A. B. M. A., Radda, G. K., & Golay, X. (2013). Gastrointestinal transit measurements in mice with ^{99m}Tc-DTPA-labeled activated charcoal using NanoSPECT-CT. *EJNMMI Research*, *3*(1), 60. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-60>
- Pan, Y., Wang, S., Liu, X., Li, R., Sun, Y., & Gadahi, J. A. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in humans and rabbits in China. *Iranian Journal of Parasitology*, *10*(2), 290–295.
- Park, B. S., & Lee, J. O. (2013). Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 45, Issue 12). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.97>

- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B. S., Lee, H., & Lee, J. O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, *458*(7242), 1191–1195. <https://doi.org/10.1038/nature07830>
- Peterson, L. W., & Artis, D. (2014). Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(3), 141–153. <https://doi.org/10.1038/nri3608>
- Peuvel-Fanget, I., Polonais, V., Brosseau, D., Texier, C., Kuhn, L., Peyret, P., Vivarès, C., & Delbac, F. (2006). EnP1 and EnP2, two proteins associated with the *Encephalitozoon cuniculi* endospore, the chitin-rich inner layer of the microsporidian spore wall. *International Journal for Parasitology*, *36*(3), 309–318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.10.005>
- Price, A. E., Shamardani, K., Lugo, K. A., Deguine, J., Roberts, A. W., Lee, B. L., & Barton, G. M. (2018). A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity*, *49*(3), 560-575.6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.016>
- Rodríguez-Tovar, L. E., Castillo-Velázquez, U., Arce-Mendoza, A. Y., Nevárez-Garza, A. M., Zarate-Ramos, J. J., Hernández-Vidal, G., Rodríguez-Ramírez, H. G., & Trejo-Chávez, A. (2016a). Interferon γ and interleukin 10 responses in immunocompetent and immunosuppressed New Zealand White rabbits naturally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Developmental and Comparative Immunology*, *62*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.003>
- Rodríguez-Tovar, L. E., Castillo-Velázquez, U., Arce-Mendoza, A. Y., Nevárez-Garza, A. M., Zarate-Ramos, J. J., Hernández-Vidal, G., Rodríguez-Ramírez, H. G., & Trejo-Chávez, A. (2016b). Interferon γ and interleukin 10 responses in immunocompetent and immunosuppressed New Zealand White rabbits naturally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Developmental & Comparative Immunology*, *62*, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.05.003>
- 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: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *29*(3), 269–277. <https://doi.org/10.1177/1040638716668559>

- Rodriguez-Tovar, L. E., Wadowska, D. W., Wright, G. M., Groman, D. B., Speare, D. J., & Whelan, D. S. (2003). Ultrastructural evidence of autoinfection in the gills of Atlantic cod *Gadus morhua* infected with *Loma* sp. (phylum Microsporidia). *Diseases of Aquatic Organisms*, *57*(3), 227–230. <https://doi.org/10.3354/dao057227>
- Sak, B., Kváč, M., Kučerová, Z., Květoňová, D., & Saková, K. (2011). Latent microsporidial infection in immunocompetent individuals - a longitudinal study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(5), e1162–e1162. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001162>
- Schmidt, E. C., & Shadduck, J. A. (1983). Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infection and Immunity*, *40*(3), 936–942. <https://doi.org/10.1128/iai.40.3.936-942.1983>
- Schwarz, R., Kaspar, A., Seelig, J., & Künnecke, B. (2002). Gastrointestinal transit times in mice and humans measured with ²⁷Al and ¹⁹F nuclear magnetic resonance. *Magnetic Resonance in Medicine*, *48*(2), 255–261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mrm.10207>
- Schwarz, R., Schuurmans, M., Seelig, J., & Künnecke, B. (1999). ¹⁹F-MRI of perfluorononane as a novel contrast modality for gastrointestinal imaging. *Magnetic Resonance in Medicine*, *41*(1), 80–86. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2594\(199901\)41:1<80:AID-MRM12>3.0.CO;2-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2594(199901)41:1<80:AID-MRM12>3.0.CO;2-6)
- Shepardson, K. M., & Cramer, R. A. (2013). Fungal cell wall dynamics and infection site microenvironments: Signal integration and infection outcome. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 16, Issue 4, pp. 385–390). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.03.003>
- Shimizu, S. (2004). Routes of Administration. In *The Laboratory Mouse* (pp. 527–542). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012336425-8/50085-6>
- Soto-Domínguez, A., Dávila-Martínez, C., Castillo-Velázquez, U., Nevárez-Garza, A. M., Rodríguez-Rocha, H., Saucedo-Cárdenas, O., Arce Mendoza, A. Y., Zarate-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*. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101387>
- Southern, T. R., Jolly, C. E., Lester, M. E., & Hayman, J. R. (2007). EnP1, a microsporidian spore wall protein that enables spores to adhere to and

infect host cells in vitro. *Eukaryotic Cell*, 6(8), 1354–1362.
<https://doi.org/10.1128/EC.00113-07>

- Stahl, P., Schwarz, R. T., Debierre-Grockiego, F., & Meyer, T. (2014). *Trypanosoma cruzi* parasites fight for control of the JAK-STAT pathway by disarming their host. *JAK-STAT*, 3(4), e1012964.
<https://doi.org/10.1080/21623996.2015.1012964>
- Stentiford, G. D., Becnel, J. J., Weiss, L. M., Keeling, P. J., Didier, E. S., Williams, B. A. P., Bjornson, S., Kent, M. L., Freeman, M. A., Brown, M. J. F., Troemel, E. R., Roesel, K., Sokolova, Y., Snowden, K. F., & Solter, L. (2016). Microsporidia – Emergent Pathogens in the Global Food Chain. In *Trends in Parasitology* (Vol. 32, Issue 4, pp. 336–348).
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.12.004>
- Taghavi, M., Khosravi, A., Mortaz, E., Nikaein, D., & Athari, S. S. (2017). Role of pathogen-associated molecular patterns (PAMPS) in immune responses to fungal infections. *European Journal of Pharmacology*, 808, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.11.013>
- Takeda, K. (2004). Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
- Takvorian, P. M., Buttle, K. F., Mankus, D., Mannella, C. A., Weiss, L. M., & Cali, A. (2013). The multilayered interlaced network (MIN) in the sporoplasm of the microsporidium *annaliia algerae* is derived from golgi. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(2), 166–178.
<https://doi.org/10.1111/jeu.12019>
- Talabani, H., Sarfati, C., Pillebout, E., Van Gool, T., Derouin, F., & Menotti, J. (2010). Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in a renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology*.
<https://doi.org/10.1128/JCM.02539-09>
- Tam, J. S. Y., Coller, J. K., Hughes, P. A., Prestidge, C. A., & Bowen, J. M. (2021). Toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists as potential therapeutics for intestinal inflammation. *Indian Journal of Gastroenterology*, 40(1), 5–21. <https://doi.org/10.1007/s12664-020-01114-y>
- Taupin, V., Garenaux, E., Mazet, M., Maes, E., Denise, H., Prensier, G., Vivares, C. P., Guerardel, Y., & Metenier, G. (2006). Major O-glycans in the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing -1,2 linkages. *Glycobiology*, 17(1), 56–67. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl050>
- Taupin, V., Garenaux, E., Mazet, M., Maes, E., Denise, H., Prensier, G., Vivarès, C. P., Guérardel, Y., & Méténier, G. (2007). Major O-glycans in

the spores of two microsporidian parasites are represented by unbranched manno-oligosaccharides containing α -1,2 linkages. *Glycobiology*, 17(1), 56–67. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl050>

Tian, X., Zhang, Z., & Li, W. (2022). Expression of TLR2 and TLR5 in distal ileum of mice with obstructive jaundice and their role in intestinal mucosal injury. *Archives of Medical Science*, 18(1), 237–250. <https://doi.org/10.5114/aoms.2019.85648>

Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., & Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: Routes of administration and factors to consider. In *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* (Vol. 50, Issue 5, pp. 600–613).

Valencakova, A., & Halanova, M. (2012). Immune response to Encephalitozoon infection review. In *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 35, Issue 1, pp. 1–7). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.11.004>

van Gool, T., Biderre, C., Delbac, F., Wentink-Bonnema, E., Peek, R., & Vivarès, C. P. (2004). Serodiagnostic Studies in an Immunocompetent Individual Infected with Encephalitozoon cuniculi. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1086/421117>

Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316>

Vergneau-Grosset, C., & Larrat, S. (2016). Microsporidiosis in vertebrate companion exotic animals. In *Journal of Fungi* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/jof2010003>

Vladutiu, A. O. (1993). The severe combined immunodeficient (SCID) mouse as a model for the study of autoimmune diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 93(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1993.tb06488.x>

Wagner, C., Bonnardel, J., Da Silva, C., Martens, L., Gorvel, J. P., & Lelouard, H. (2018). Some news from the unknown soldier, the Peyer's patch macrophage. *Cellular Immunology*, 330, 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.012>

Wasson, K., & Peper, R. L. (2000). Mammalian Microsporidiosis. *Veterinary Pathology*, 37(2), 113–128. <https://doi.org/10.1354/vp.37-2-113>

Whary, M. T., Baumgarth, N., Fox, J. G., & Barthold, S. W. (2015). Chapter 3 - Biology and Diseases of Mice. In *Laboratory Animal Medicine: Third*

Edition (pp. 43–149). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00003-1>

- Wolfgang, B., P, F. D. J., Karoline, K., & Uwe, G. (2000). Developmental Expression of a Tandemly Repeated, Glycine- and Serine-Rich Spore Wall Protein in the Microsporidian Pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity*, *68*(4), 2268–2275. <https://doi.org/10.1128/iai.68.4.2268-2275.2000>
- Woting, A., & Blaut, M. (2018). Small Intestinal Permeability and Gut-Transit Time Determined with Low and High Molecular Weight Fluorescein Isothiocyanate-Dextrans in C3H Mice. *Nutrients*, *10*(6), 685. <https://doi.org/10.3390/nu10060685>
- Wright, J. H., & Craighead, E. M. (1922). Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Medicine*, *36*(1), 135–140. <https://doi.org/10.1084/jem.36.1.135>
- Xu, Y., Takvorian, P., Cali, A., Wang, F., Zhang, H., Orr, G., & Weiss, L. M. (2006). Identification of a new spore wall protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity*, *74*(1), 239–247. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.239-247.2006>
- Yanji, X., Peter, T., Ann, C., Fang, W., Hong, Z., George, O., & M, W. L. (2006). Identification of a New Spore Wall Protein from *Encephalitozoon cuniculi*. *Infection and Immunity*, *74*(1), 239–247. <https://doi.org/10.1128/iai.74.1.239-247.2006>
- Zhong, X., Wang, G., Li, F., Fang, S., Zhou, S., Ishiwata, A., Tonevitsky, A. G., Shkurnikov, M., Cai, H., & Ding, F. (2023). Immunomodulatory Effect and Biological Significance of β -Glucans. *Pharmaceutics*, *15*(6), 1615. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061615>

APÉNDICE

A. Representación del curso de la espora

