

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



DESCRIPCIÓN INMUNOLÓGICA Y ESTRUCTURAL A NIVEL ESPACIO-
TIEMPO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Encephalitozoon*
cuniculi EN EL TRACTO GASTRO-INTESTINAL DE
RATONES BALB/c

TESIS

QUE PRESENTA

M.C. ARMANDO TREJO CHÁVEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

GENERAL ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

FEBRERO, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



**DESCRIPCIÓN INMUNOLÓGICA Y ESTRUCTURAL A NIVEL ESPACIO-
TIEMPO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Encephalitozoon
cuniculi* EN EL TRACTO GASTRO-INTESTINAL DE
RATONES BALB/c**

TESIS

QUE PRESENTA

M.C. ARMANDO TREJO CHÁVEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

GENERAL ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

FEBRERO, 2021

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA

DESCRIPCIÓN INMUNOLÓGICA Y ESTRUCTURAL A NIVEL ESPACIO-
TIEMPO DE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *Encephalitozoon*
cuniculi EN EL TRACTO GASTRO-INTESTINAL DE
RATONES BALB/c

Aprobación de tesis por el comité particular de

M.C. Armando Trejo Chávez



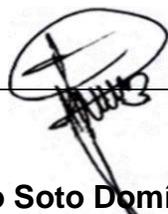
Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar
Director de Tesis



Dra. Alicia Magdalena
Nevárez Garza
Co - Director



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director



Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo



Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Director Externo

GENERAL ESCOBEDO, N.L. MÉXICO

FEBRERO, 2021

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

Proyecto financiado por el **Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, (PAICYT), 2015**, “Estudio histoquímico e Inmunohistoquímico de las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en el granuloma microsporidiano en un modelo experimental lepórico (*Oryctolagus cuniculus*)”. **Clave:** CT238-15.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su infinita misericordia y gracia divina, quién intervino para que este proyecto llegara a buen término.

Al Gobierno de México, por su apoyo constante para seguirnos preparando como profesionistas, afrontando retos y resolver problemáticas que el país necesita.

A mi asesor de tesis: PhD. Luis Edgar Rodríguez Tovar, por la confianza, apoyo y paciencia en el desarrollo de este proyecto.

A mi comité de tesis: Dr. Adolfo Soto Domínguez, Dr. Humberto Rodríguez Rocha, Dr. Uziel Castillo Velázquez y Dra. Alicia Magdalena Nevárez Garza, por las observaciones, comentarios y sugerencias en el desarrollo de este estudio.

A la Histotecnóloga Oneida Villarreal Alanís y a su equipo técnico del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por el apoyo brindado en la realización de este estudio.

Al PhD. Rafael Ramírez Romero y a la Dra. Cecilia Ramírez Hernández, por las facilidades otorgadas en la realización de actividades complementarias en el desarrollo de este estudio, en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Dr. Juan José Zárate Ramos, por la oportunidad que me brindó de realizar este posgrado, en cumplimiento de elevar el nivel académico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Dr. Emilio Olivares Sáenz, por su asesoría en el estudio estadístico de este estudio.

A la Dra. Diana Caballero Hernández, por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A mis compañeros académicos y alumnos, que directamente o indirectamente participaron en la realización de este estudio.

DEDICATORIA

Para mi amada Esposa Karina Flores Martínez, por su amor y apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

Para mis padres Juan Trejo Torres y Paula Chávez Castillo, a quienes tanto quiero y respeto.

Para mis hermanos José Luis Trejo Chávez y Nancy Trejo Chávez, que siempre me alentaron a seguir adelante.

Para mis sobrinos Jimena Trejo Ávila, Ameyalli Yuritzi Arzate Trejo y Erik Trejo Ávila, que siempre estuvieron apoyándome hasta terminar este trabajo.

Para mis suegras Doña Esther Costa Espinosa y Doña Rafaela Flores Martínez, quienes estuvieron alentándome siempre para concluir este estudio.

ABREVIATURAS

Ac(s)	Anticuerpo(s)
Ag	Antígeno
AT	Azul de tricromo
C	Centígrado
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
Cm	Centímetro
CW	Calcoflúor White
Ec	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
<i>E. cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
°	Grado
G	Gramo
Gi	Giemsa
Gr	Gram
HE	Hematoxilina y eosina
Hr	Hora

iNOS	Óxido Nítrico Sintasa
Kg	Kilogramo
Mg	Miligramo
µm	Micras
µl	Microlitro
ml	Mililitro
Mm	Milímetro
Min	Minuto
Nm	Nanómetro
NO ₂	Óxido de Nitrógeno
PAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
Rw	Romanowsky

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XVI
ÍNDICE DE TABLAS	XXI
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1. 1. JUSTIFICACIÓN	6
1. 2. Hipótesis	7
1. 3. Objetivo general	8
1. 4. Objetivos específicos	9
2. LITERATURA REVISADA	10
2. 1. AGENTE ETIOLÓGICO	10
2. 2. Características Generales del Género <i>Encephalitozoon</i>	10
2. 3. Características de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	11
2. 3. 1. Biología	11
2. 3. 2. Mecanismo de Infección	16
2. 3. 3. Ciclo de Vida	18
2. 3. 3. 1. Fase de Proliferación	19
2. 3. 3. 2. Fase de Diferenciación	20
2. 3. 4. Variabilidad Genética	21
2. 4. Encephalitozoonosis en Conejos	21
2. 4. 1. Características Generales de la Enfermedad	21
2. 4. 1.1. Epidemiología	21
2. 4. 1. 2. Seroprevalencia de Anticuerpos contra <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en Conejos	21
2. 4. 1. 3. Seroprevalencia de Anticuerpos contra <i>Encephalitozoon cuniculi</i> en Humanos ..	22
2. 4. 1. 4. Modo de Transmisión	23
2. 5. Distribución Geográfica	23
2. 5. 1. Potencial zoonótico	23
2. 6. Respuesta Inmunológica	25
2. 6. 1. Respuesta Inmune Celular	26
2. 6. 2. Respuesta Inmune Humoral	29
2. 7. Patogénesis y Enfermedad Clínica	30
2. 7. 1. Enfermedad Neurológica	31
2. 7. 2. Enfermedad Renal	32
2. 7. 3. Enfermedad Ocular	33

2. 7. 4. Enfermedad Intestinal	34
2. 8. Métodos de Diagnóstico	36
2. 8. 1. Técnica de Tinción	36
2. 8. 2. Histoquímicas	37
2. 8. 2. 1. Tinción de Hematoxilina y Eosina	38
2. 8. 2. 2. Cromotrópo-tinción. Tinción de Tricromo Modificado	38
2. 8. 2. 3. Tinción de Gram	38
2. 8. 2. 2. Agentes quimiofluorescentes. Calcoflúor-white	39
2. 9. Serología	39
2. 10. Tracto Digestivo del Ratón	40
2. 10. 1. Estómago	40
2. 10. 2. Intestino Delgado y Grueso	41
2. 10. 2. 1. Duodeno.....	42
2. 10. 2. 2. Yeyuno	42
2. 10. 2. 3. Íleon	43
2. 10. 2. 4. Colon	43
2. 10. 2. 5. Ciego	44
2. 10. 2. 6. Recto	44
2. 10. 3. Tejido Linfoide en Tracto Digestivo del Ratón	44
2. 10. 3. 1. Respuesta Inmune en el Tracto Digestivo del Ratón	45
2. 11. Características Hematológicas del Ratón	48
3. MATERIALES Y MÉTODOS	51
3. 1. Animales para Experimentación	51
3. 2. Modelo Experimental	51
3. 3. Preparación de las Esporas	52
3. 3. 1. Inoculación de las Esporas	53
3. 3. 2. Cosecha de las Esporas	54
3. 3. 3. Conteo de las Esporas	54
3. 4. Animales con Administración de Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	55
3. 5. Animales Control	56
3. 6. Sedación y Eutanasia	56
3. 7. Extracción de Sangre	57
3. 8. Análisis Estadístico	57
3. 9. Estudio Piloto	58
4. RESULTADOS	59

4. 1. Estudio Anatomopatológico	59
4. 2. Toma y Envío de Muestras	59
4. 3. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (45 minutos)	61
4. 3. 1. Estómago (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	61
4. 3. 2. Estómago (Tinción de Azul de Tricromo)	62
4. 3. 3. Estómago (Tinción de Gram)	63
4. 4. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (60 minutos)	65
4. 4. 1. Estómago (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	65
4. 4. 2. Estómago (Tinción de Azul de Tricromo)	66
4. 4. 3. Estómago (Tinción de Gram)	67
4. 5. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (120 minutos)	69
4. 5. 1. Estómago (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	69
4. 5. 2. Estómago (Tinción de Azul de Tricromo)	70
4. 5. 3. Estómago (Tinción de Gram)	71
4.5.4. Estómago (Calcoflúor-white)	72
4. 6. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (45 minutos)	75
4. 6. 1. Duodeno (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	75
4. 6. 2. Duodeno (Tinción de Azul de Tricromo)	76
4. 6. 3. Duodeno (Tinción de Gram)	77
4. 7. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (60 minutos)	79
4. 7. 1. Duodeno (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	79
4. 7. 2. Duodeno (Tinción de Azul de Tricromo)	80
4. 7. 3. Duodeno (Tinción de Gram)	81
4.7.4. Duodeno (Calcoflúor-white)	82
4. 8. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (120 minutos)	84
4. 8. 1. Duodeno (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	84
4. 8. 2. Duodeno (Tinción de Azul de Tricromo)	85
4. 8. 3. Duodeno (Tinción de Gram)	86
4. 9. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (45 minutos)	89
4. 9. 1. Yeyuno (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	89

4. 9. 2. Yeyuno (Tinción de Azul de Tricromo)	90
4. 9. 3. Yeyuno (Tinción de Gram)	91
4. 10. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (60 minutos)	93
4. 10. 1. Yeyuno (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	93
4. 10. 2. Yeyuno (Tinción de Azul de Tricromo)	94
4. 10. 3. Yeyuno (Tinción de Gram)	95
4.10.4. Yeyuno (Calcoflúor-white)	96
4. 11. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (120 minutos)	98
4. 11. 1. Yeyuno (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	98
4. 11. 2. Yeyuno (Tinción de Azul de Tricromo)	99
4. 11. 3. Yeyuno (Tinción de Gram)	100
4. 12. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (45 minutos)	103
4. 12. 1. Íleon (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	103
4. 12. 2. Íleon (Tinción de Azul de Tricromo)	104
4. 12. 3. Íleon (Tinción de Gram)	105
4. 13. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (60 minutos)	107
4. 13. 1. Íleon (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	107
4. 13. 2. Íleon (Tinción de Azul de Tricromo)	108
4. 13. 3. Íleon (Tinción de Gram)	109
4.13.4. Íleon (Calcoflúor-white)	111
4. 14. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (120 minutos)	112
4. 14. 1. Íleon (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	112
4. 14. 2. Íleon (Tinción de Azul de Tricromo)	113
4. 14. 3. Íleon (Tinción de Gram)	114
4. 15. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (45 minutos)	117
4. 15. 1. Ciego (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	117
4. 15. 2. Ciego (Tinción de Azul de Tricromo)	118
4. 15. 3. Ciego (Tinción de Gram)	119
4. 16. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (60 minutos)	121
4. 16. 1. Ciego (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	121
4. 16. 2. Ciego (Tinción de Azul de Tricromo)	122

4. 16. 3. Ciego (Tinción de Gram)	123
4.16.4. Ciego (Calcoflúor-white)	124
4. 17. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones Balb/c inoculados con Esporas de <i>E. cuniculi</i> (120 minutos)	126
4. 17. 1. Ciego (Tinción de Hematoxilina y Eosina)	126
4. 17. 2. Ciego (Tinción de Azul de Tricromo)	127
4. 17. 3. Ciego (Tinción de Gram)	128
4. 18. Observación de los Frotis Sanguíneos	131
4. 18. 1. Frotis Sanguíneos con Tinción de Gram	131
4. 18. 2. Frotis Sanguíneos con Tinción de Azul de Tricromo	133
4. 18. 3. Frotis Sanguíneos con Tinción de Romanowsky.....	135
4. 18. 4. Frotis Sanguíneos con Tinción de Calcoflúor-white	137
5. DISCUSIÓN	140
6. CONCLUSIONES	145
PERSPECTIVAS.....	147
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148
APENDICES	164

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	15
2. Germinación de una espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	18
3. Ciclo de vida de una espora de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	19
4. Inoculación de esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> por vía orogástrica en ratón Balb/c	56
5. Toma y Procesamiento de Muestras	60
6. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	62
7. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	63
8. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	64
9. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X	66
10. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X	67
11. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	68
12. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	70
13. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	71
14. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	72
15. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Calcoflúor-	

white. 100X.....	73
16. Esquema de Distribución de Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> y Hallazgos Celulares en Epitelio Gástrico de Ratones Balb/c	74
17. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	76
18. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	77
19. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	78
20. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	80
21. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	81
22. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	82
23. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Calcoflúor-white. 100X.....	83
24. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	85
25. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	86
26. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	87
27. Esquema de Distribución de Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> y Hallazgos Celulares en Epitelio Duodenal de Ratones Balb/c	88
28. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	90

29. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	91
30. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	92
31. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	94
32. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	95
33. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	96
34. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Calcoflúor-white. 100X.	97
35. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	99
36. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	100
37. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	101
38. Esquema de Distribución de Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> y Hallazgos Celulares en Epitelio Yeyunal de Ratones Balb/c	102
39. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	104
40. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	105
41. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	106
42. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados	

con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	108
43. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	109
44. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	110
45. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Calcoflúor-white. 100X.	111
46. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	113
47. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	114
48. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	115
49. Esquema de Distribución de Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> y Hallazgos Celulares en Epitelio Ileal de Ratones Balb/c	116
50. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	118
51. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	119
52. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (45 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	120
53. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	122
54. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	123
55. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Tinción de Gram.	

100X.....	124
56. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (60 minutos). Calcoflúor-white.100X.	125
57. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.....	127
58. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	128
59. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones BALB/c Inoculados con Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> (120 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	129
60. Esquema de Distribución de Esporas de <i>Encephalitozoon cuniculi</i> y Hallazgos Celulares en Epitelio Cecal de Ratones Balb/c	130
61. Frotis Sanguíneos del Grupo 1 (45 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	132
62. Frotis Sanguíneos del Grupo 2 (60 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	132
63. Frotis Sanguíneos del Grupo 3 (120 minutos). Tinción de Gram. 100X.....	132
64. Frotis Sanguíneos del Grupo 1 (45 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	134
65. Frotis Sanguíneos del Grupo 2 (60 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	134
66. Frotis Sanguíneos del Grupo 3 (120 minutos). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.....	134
67. Frotis Sanguíneos del Grupo 1 (45 minutos). Tinción de Romanowsky. 100X.....	136
68. Frotis Sanguíneos del Grupo 2 (60 minutos). Tinción de Romanowsky. 100X.....	136
69. Frotis Sanguíneos del Grupo 3 (120 minutos). Tinción de Romanowsky. 100X.....	136
70. Frotis Sanguíneos del Grupo 2 (60 minutos). Tinción de Calcoflúor-white. 100X.....	138
71. Esquema de Hallazgos Hematológicos en Ratones Inoculados con <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	139

INDICE DE TABLAS

1. Diseño experimental. Distribución de los grupos y las dosis utilizadas.....	52
--	----

RESUMEN

Encephalitozoon cuniculi es un microsporidio patógeno intracelular obligado, zoonótico, que necesita del metabolismo energético de la célula huésped, para poder sobrevivir. Para hacerlo, debe infectar una gama de células que metabólicamente reúnan las características que el agente necesite, así como, los mecanismos que utiliza para diseminarse a través del cuerpo. El propósito de este estudio, fue determinar los mecanismos y las rutas de acceso que siguieron las esporas de *Encephalitozoon cuniculi* en las diferentes estructuras histológicas de las distintas porciones del tracto digestivo de ratones BALB/c, al ser inoculados por vía oral. Así como, describir la interacción que este microorganismo tiene con células fagocíticas y otras del sistema inmunitario, además, demostrar su presencia en la sangre y la interacción con las células sanguíneas, a través del uso de diferentes métodos como la tinción de Hematoxilina y Eosina, e histoquímicas como: Gram, Azul de Tricromo, Romanowsky y un fluorocromo (Calcoflúor-white) a diferentes tiempos (45, 60 y 120 minutos), respectivamente. Por otro lado, describir los mecanismos involucrados en su proceso de diseminación, como la fagocitosis realizada por macrófagos intraepiteliales, así como el mecanismo de endocitosis, proceso utilizado muy frecuente por estos microsporidios, además de los trayectos que siguieron estos microorganismos hasta alcanzar el borde de los vasos sanguíneos y su presencia dentro de ellos. Además, de su interacción con los eosinófilos y los gránulos de las células de Paneth, estructuras que contienen abundante arginina, aminoácido que juega un papel importante en el

reconocimiento y control de dicho agente infeccioso, todo esto observado con las tinciones antes mencionadas. Eventos celulares importantes, descritos de una manera objetiva y con hallazgos que hasta el momento, no han sido descritos en forma detallada en la literatura reciente.

1. INTRODUCCIÓN

Los microsporidios, son actualmente un grupo de microorganismos constituidos por 197 géneros y aproximadamente 1300 a 1500 especies (Vávra, J & Lukeš, J., 2013). Según datos filogenéticos moleculares, estos microorganismos están relacionados con los hongos (Weiss, L.M., *et al.*, 1999; Keeling, P.J., *et al.*, 2000; Capella-Gutiérrez, S., *et al.*, 2012) y son patógenos intracelulares obligados (eucariotas unicelulares), los cuales afectan a numerosas especies animales como son: insectos (abejas) (Higes, M., *et al.*, 2013), peces (Shaw, R.W., *et al.*, 1997), aves (periquito australiano) (Black, S.S., *et al.*, 1997), así como a numerosos mamíferos carnívoros y herbívoros, domésticos y salvajes (Guscetti, F., *et al.*, 2003) incluyendo al hombre (Sodqi, M., *et al.*, 2004). En la actualidad a estos agentes patógenos, se les considera más como hongos que como protozoarios, clasificación basada en sus características moleculares y bioquímicas. Son considerados como células eucarióticas, a pesar de no poseer mitocondrias, ni aparato de Golgi. Durante todo su proceso evolutivo, estos microorganismos se adaptaron a la vida intracelular, dependiendo totalmente del proceso energético de la célula huésped (Weiss, L.M & Becnel, J.J., 2014). Estos agentes patógenos han causado pérdidas significativas en la industria de la seda y apícola (Gupta, S.K., *et al.*, 2016; Alaux, C., *et al.*, 2011), además de provocar trastornos importantes en los procesos de la investigación biomédica, al haberse detectado altos niveles de anticuerpos contra *E. cuniculi* en conejos, cobayos, hámster y ratas, tanto en criaderos, como laboratorios (Chalupský, J., *et al.*, 2016). Algo importante que caracteriza a estos microorganismos, es la etapa vegetativa o

de multiplicación (merogonia) y la espora (esporogonia). En su estado vegetativo, estas células poco visibles presentan características primitivas, como: la presencia de mitosomas (restos mitocondriales), que se encuentran dispersos en su citoplasma (Vávra, J., (2005). El aparato de Golgi, no se encuentra apilado si no que está formado por pequeñas vesículas opacas limitadas por una sola membrana, sus ribosomas se encuentran unidos al retículo endoplásmico o están dispersas en el citoplasma y también carecen de peroxisomas (Vávra, J., 1976). Además, las esporas contienen un aparato infeccioso, compuesto de numerosos organelos, los cuales durante su proceso de germinación, introduce su contenido en una célula huésped (Lom, J & Vávra, J., 1963a). Las esporas producidas exhiben una morfología oval o alargada, son pequeñas y miden aproximadamente de largo 2-7 μm y de ancho por 1.5-5 μm (Bigliardi, E & Sacchi, L., 2001). La espora le permite sobrevivir fuera del huésped, debido a su durabilidad y compleja estructura. Asimismo, tienen una estructura muy particular, formada por el tubo polar, la vacuola posterior y el esporoplasma o agente infeccioso, considerado como el núcleo del parásito. Las esporas que infectan a los mamíferos, presentan una pared celular engrosada, la cual le proporciona resistencia a las condiciones ambientales difíciles y le permite el aumento de la presión hidrostática, facilitando el proceso de la germinación o extrusión del filamento polar (Undeen, A & Frixione, E., 1991; Frixione, E., *et al.*, 1997).

La pared celular presenta dos estructuras: la endospora (capa interna) compuesta de quitina, considerada como un inmunoestimulante muy potente y la exoespora (capa externa), compuesta de una glicoproteína que le

proporciona resistencia a las condiciones del medio ambiente (Weiss, L.M & Becnel, J.J., 2014). Sin embargo, a la fecha aún no se conocen los mecanismos y/o mediadores celulares involucrados en la infección experimental en ratones Balb/c por vía oral con estos microorganismos, su función en la superficie intestinal y su procesamiento en las placas de Peyer, ni tampoco la capacidad de diseminación, a través de los vasos sanguíneos y/o linfáticos, para causar las diversas alteraciones o la muerte de los mismos.

Por lo que este estudio, nos permitirá entender y establecer mecanismos de bloqueo en la captación de antígenos, así como inhibición de fagocitosis, para implementar en un futuro, mecanismos de control y prevención de esta zoonosis.

1.1. Justificación

Al infectar ratones con esporas viables de *E. cuniculi per-os*, entenderemos los mecanismos y el tiempo que utilizan éstos antígenos, para ingresar al interior del epitelio gastrointestinal, ser captadas por las diferentes células fagocíticas presentes en la superficie gástrica e intestinal, su posterior procesamiento en las placas de Peyer y diseminación por vía sanguínea y/o linfática, a otros órganos.

1.2. Hipótesis

La presencia de las esporas infectantes de *E. cuniculi* y el tiempo de tránsito en el epitelio gastrointestinal murino, activará algunos mecanismos de ingreso a su interior, estimulará la activación de algunas células captadoras de antígenos y se determinará el sitio exacto de penetración, así como, las rutas de diseminación hacia otros órganos.

1.3. Objetivo General:

Identificar a nivel de espacio-tiempo, la presencia de esporas de *E. cuniculi* en las diferentes porciones del tracto gastrointestinal y en sangre, en ratones Balb/c infectados experimentalmente.

1.4. Objetivos Específicos:

1. Determinar el tiempo de infección experimental de *E. cuniculi*, en tracto digestivo de ratones Balb/c.
2. Describir algunos mecanismos que utiliza la espora de *E. cuniculi*, durante la captación, distribución y su presencia en los vasos sanguíneos, para su posterior diseminación a los órganos blanco.
3. Determinar estructuralmente, las interacciones entre la espora de *E. cuniculi* y las poblaciones celulares, presentes en el estómago e intestino murino.
4. Analizar la presencia de esporas de *E. cuniculi*, en sangre de ratones infectados.

2. LITERATURA REVISADA

2.1. Agente Etiológico

2.2. Características Generales del Género *Encephalitozoon*

Tres especies del género *Encephalitozoon*, son las que actualmente se conocen y son: *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, y *Encephalitozoon intestinalis* (antes conocida como *E. septata*), y todas éstas infectan al ser humano (Harcourt-Brown, F.M., 2004; Künzel, F & Joachim, A., 2010). Las tres son similares morfológicamente, a excepción de *E. intestinalis*, la cual se caracteriza por secretar continuamente un material fibrilar electrodenso, que forma una red que rodea y aísla los septos en sus diferentes etapas de división (Cali, A., *et al.*, 1996). El género *Encephalitozoon* tiene el núcleo aislado en todas las etapas de su ciclo de vida, considerándose monomórfico. Su desarrollo tiene lugar en una vacuola parasitófora, estructura que se piensa se origina del propio huésped (Gamboa-Domínguez, A., *et al.*, 2003). La membrana limitante de la vacuola parasitófora, surge en forma primaria como una unidad de membrana, estrechamente ligada a la membrana plasmática y en donde se observa al meronte (Barker, R. J., 1975). La membrana externa que rodea al parásito se empieza a separar mostrando pequeñas áreas electrolúcidas entre la membrana plasmática y la membrana vacuolar. En el espacio vacuolar se aprecian los merontes adheridos a la membrana vacuolar, los cuales se dividen por fisión binaria y debido a la citocinesis retrasada, se forman pequeñas cadenas de merontes también llamados esporontes. Los esporontes se diferencian por una capa electrodenso en su membrana plasmática, el cual primero se deposita en filamentos y

después forma una capa homogénea que se separa de la membrana vacuolar. La esporogonia tiene lugar en el lumen de la vacuola, es diporoblástico y tetraporoblástico. La presencia o ausencia de una vacuola parasitófora y el número de vueltas del tubo polar dentro de la espora, ayuda a diferenciar las especies del género *Encephalitozoon* (Böhne, W., et al., 2011). El borde de la vacuola parasitófora que no está en contacto directo con las células del parásito, forma un toldo de ampollas que se extiende dentro del espacio vacuolar. La vacuola parasitófora de *E. intestinalis* es especial, está muy lobulada y contiene septos, consistentes en un material granular. Estas estructuras, van formando cámaras incompletas que encierran a parásitos individuales dentro de la vacuola y el material que los forma, se cree es secretado por los mismos parásitos (Harcourt-Brown, F.M., 2004). Otros trabajos reportan, que los septos tienen su origen en la compresión del escaso material reticulado disperso y electro-opaco, el cual está presente en las vacuolas parasitóforas de las diferentes especies de *Encephalitozoon*, desapareciendo durante la esporogonia de *E. cuniculi*, así como en el de *E. hellem* (Herve, O., et al., 1989).

2.3. Características de *Encephalitozoon cuniculi*

2.3.1. Biología

E. cuniculi, pertenece al *phylum* Microspora, es eucariota, intracelular obligado, formador de esporas y afecta comúnmente a los conejos. Normalmente, tiene tres formas de presentación, en los animales afectados: a) ocular iniciando con la formación de cataratas y uveítis al extenderse la lesión,

b) neurológica con discretas alteraciones del comportamiento a verdaderos cuadros de enfermedad vestibular y c) renal al cursar con enfermedad renal crónica progresiva (Harcourt-Brown, F.M., 2004). La Encefalitozoonosis está distribuida a nivel mundial, afecta a una amplia gama de especies, entre las que podemos citar a los conejos (Künzel, F & Joachim, A., 2010), ratas (Müller-Doblies, U.U., *et al.*, 2002), ratones, cuyes, hámster, lemmings (Hofmannová, L., *et al.*, 2014; Kitz, S., *et al.*, 2018), ganado (Reetz, J., 1995), caballos (Van Rensburg, I.B.J., *et al.*, 1991), cabras, ovejas, cerdos (Reetz, J., *et al.*, 2009), perros (Shaddock, J.A., *et al.*, 1978; Postma, G.C., *et al.*, 2018), gatos (Rebel-Bauder, B., *et al.*, 2011), zorros (Åkerstedt, J., *et al.*, 2002), felinos salvajes (Scurrrell, E.J., *et al.*, 2015), mustélidos (Bjerkås, I., 1990), monos (Anver, M.R., *et al.*, 1972), camélidos sudamericanos (Webster, J.D., *et al.*, 2008), focas (Seguel, M., *et al.*, 2015), reptiles (Richter, B., *et al.*, 2013) y recientemente también se ha descrito en aves (Malcekova, B., *et al.*, 2011). En el caso del ser humano, se considera como una enfermedad emergente, principalmente para aquellos individuos que cursan con una enfermedad inmunosupresora, como el VIH-SIDA (Didier, E.S., *et al.*, 1996), leucemia y todos aquellos que tienen su sistema inmunológico débil, como los pacientes que han recibido trasplantes o tratamiento antitumoral (Gamboa-Domínguez, A., *et al.*, 2003).

E. cuniculi, es un microorganismo que contiene un genoma reducido de apenas 2.9 mb, más pequeño que el genoma de la bacteria *Escherichia coli*, que es de 4.7 mb (Biderre, C., *et al.*, 1995; Smith, C.L., *et al.*, 1987). Debido a la falta de algunos genes, este parásito carece de algunas rutas biosintéticas, como la fosforilación oxidativa, la cadena transportadora de electrones y el ciclo

del ácido tricarboxílico. No obstante, cuenta con otras rutas, como son la de la pentosa fosfato y la glucólisis, importantes en la utilización de la glucosa para generar ribosa, necesaria en la biosíntesis de nucleótidos y ácidos nucleicos, así como el metabolismo de la trehalosa (Katinka, M.D., *et al.*, 2001). Sus ribosomas carecen de la subunidad 5.8 del rRNA, característica de las células eucarióticas; sin embargo, tienen una sola subunidad grande típica de las células procarióticas (Vossbrinck, C. R & Woese, C. R., 1986), también carecen de peroxisomas y aparato de Golgi, a pesar de ello, cuentan con una estructura llamada polaroplasto, al parecer con las mismas funciones del aparato de Golgi (Corradi, N & Keeling, P.J., 2009).

En general, las esporas de *E. cuniculi* miden de 2.5 a 3 μm de longitud por 1.5 a 2 μm de ancho y se encuentran delimitadas por una pared gruesa, que a su vez está compuesta por dos capas: una delgada capa externa llamada (exospora), que es una estructura electrodensa, compuesta principalmente por glicoproteínas, una de ellas es la SWP1, localizada en la superficie celular de los esporontes en desarrollo (Böhne, W., *et al.*, 2000) y una capa intermedia gruesa electrolúcida, compuesta por α -quitina y proteínas complejas, después se encuentra una membrana plasmática interna, delimitando al esporoplasma (Didier, E.S., *et al.*, 1998; Vávra, J., 1976; Vávra, J & Larsson, J.I.R., 1999) donde se alberga el núcleo y el citoplasma de la célula, que finalmente se transfiere a la célula huésped cuando se produce la infección y otras estructuras presentes que son los ribosomas.

Además, presentan elementos que conforman su sistema de infección, como son: a) un filamento polar largo (tubo polar o eyector), el cual está

enrollado en espiral formando cinco vueltas y adherido fuertemente en la periferia del esporoplasma, alojado en el ápice de la espora mediante su disco de anclaje, el cual es una estructura que une el tubo polar a la célula, durante la germinación (Thelohan, P., 1894) y está compuesta por varios bloques de proteínas y que para esta especie en particular, se han identificado tres, que son: PTP1 (proteína de tubo polar 1), PTP2 y PTP3 (Delbac, F., *et al.*, 1997; 2001; Peuvel, I., *et al.*, 2002), b) un polaroplasto, que es una estructura membranosa (numerosos compartimentos semejantes a láminas) y que están en la mitad anterior de la espora y c) una vacuola posterior, que es una gran estructura que ocupa entre un tercio y la mitad del volumen celular y está localizada muy cerca del polo posterior (Leitch, G. J., *et al.*, 1993; Weiss, L.M & Becnel, J.J., 2014). En la figura 1, se observa la estructura de una espora de *E. cuniculi*.

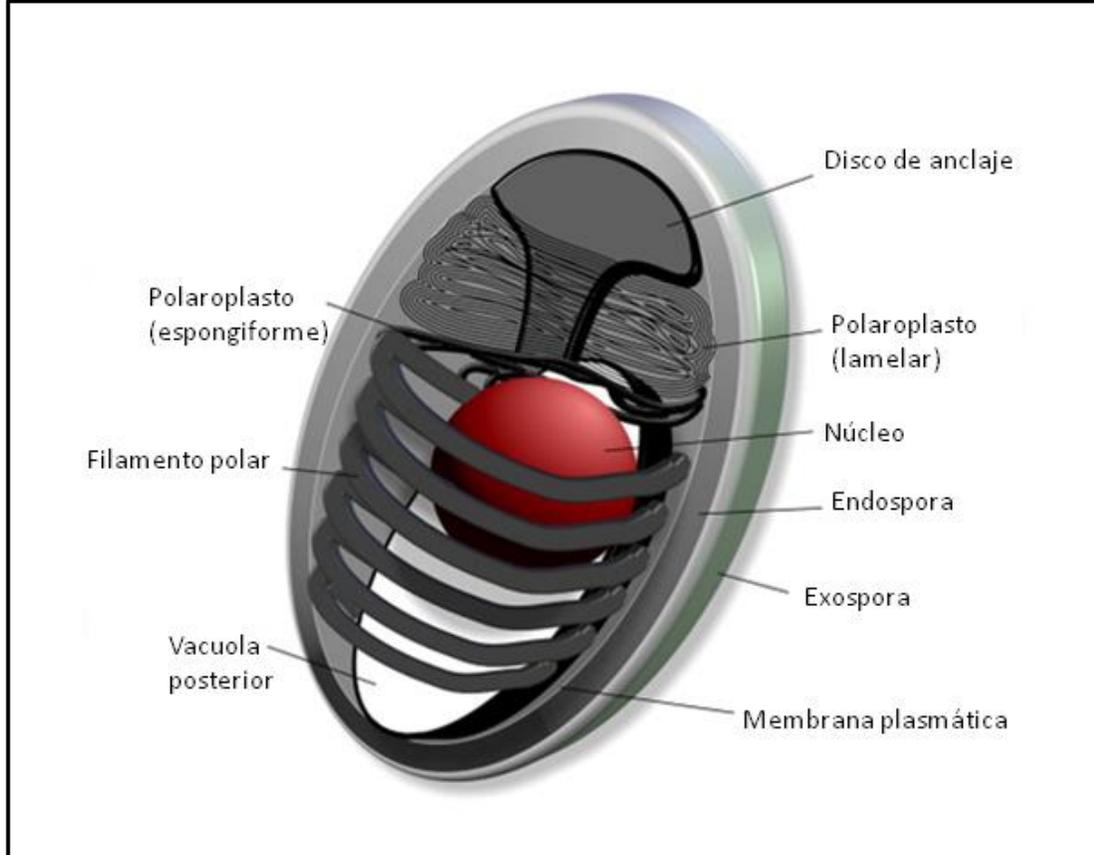


Figura 1. Espora de *Encephalitozoon cuniculi*. Se destaca una exospora (verde olivo), una endospora (gris claro), su complejo aparato de extrusión (filamento polar) (gris oscuro), un núcleo (rojo), una vacuola posterior (blanco), un polaroplasto (gris claro ondulado) y un disco de anclaje (forma de media luna y de color gris oscuro). (Mathews, *et al.*, 2009).

Al ser un organismo intracelular obligado tiene la capacidad de infectar numerosos tipos celulares, dentro de las cuales se consideran a las células endoteliales, células epiteliales, cardiomiocitos, fibroblastos pulmonares y macrófagos (Visvesvara, G.S., 2002). Por lo tanto, se ha llevado a cabo el aislamiento del agente, utilizando distintas líneas celulares como son: el cultivo de células de riñón de mono (E6) o el cultivo de células de riñón de perro Madin-Darby (De Groote, M.A., *et al.*, 1995; Hollister, W.S., *et al.*, 1995). Para

realizar este proceso de infección, el agente realiza dos mecanismos de penetración: el primero de ellos es invadir activamente a la célula mediante la germinación de sus esporas e inoculación del material infectante, mientras que el otro mecanismo, es a través de un proceso fagocítico (Couzinet, S., *et al.*, 2000).

2.3.2. Mecanismo de Infección

Primeramente, en el intestino la espora tiene que ser activada bajo ciertos estímulos, siendo la mayoría aún desconocidos. A pesar de ello, se han realizado algunos experimentos, tratando de inducir la germinación de las esporas bajo ciertas condiciones, como: a) ambientes con pH extremo (muy ácidos o alcalinos, cambios repentinos de los mismos) y b) alteraciones significativas en la concentración de aniones y cationes (Williams, 2009). En la actualidad, se sabe que esta germinación, utiliza procesos osmóticos dependientes de calcio (Weider, E & Bird, W., 1982). Asimismo, también pudieran estar involucradas moléculas ionóforas, así como, acuaporinas membranales, que al parecer aumentan la presión osmótica, desencadenando la turgencia intracelular (Dall, D.J., 1983; Frixione, E., *et al.*, 1997), incrementando el engrosamiento del poroplasto y la vacuola posterior (Keohane, E.M & Weiss, L.M., 1999; Lom, J & Vávra, J., 1963; Ohshima, K., 1937). El fenómeno germinativo al parecer requiere de un proceso energético, quizá de la hidrólisis de la trehalosa, que se encuentra dentro de las esporas (Undeen, A.H., 1990). Cabe mencionar, que esta molécula actúa más como una fuente energética de supervivencia (Méténier, G & Vivarès, C.P., 2001).

La germinación inicia cuando la pared de la espora, empieza a empujar sobre su porción apical, al tubo polar el cual es evertido. Mientras tanto, la expansión de la vacuola posterior induce al esporoplasma a avanzar por el túbulo polar. La punta de esta estructura, sigue avanzando hasta que introduce el esporoplasma en el citoplasma de la célula huésped. En aproximadamente dos segundos, el proceso de germinación e inoculación termina y el esporoplasma estará dentro de una vacuola parasitófora naciente, la cual tiene poros por donde se permitirá la libre difusión de moléculas pequeñas como ATP, carbohidratos, aminoácidos y péptidos, los cuales ayudarán al microsporidio a obtener energía, completando así su ciclo de vida (Frixione, E., *et al.*, 1992; Ishihara, R., 1968; Rönnebäumer, K., *et al.*, 2008). En la Figura 2, se resume el proceso de germinación.

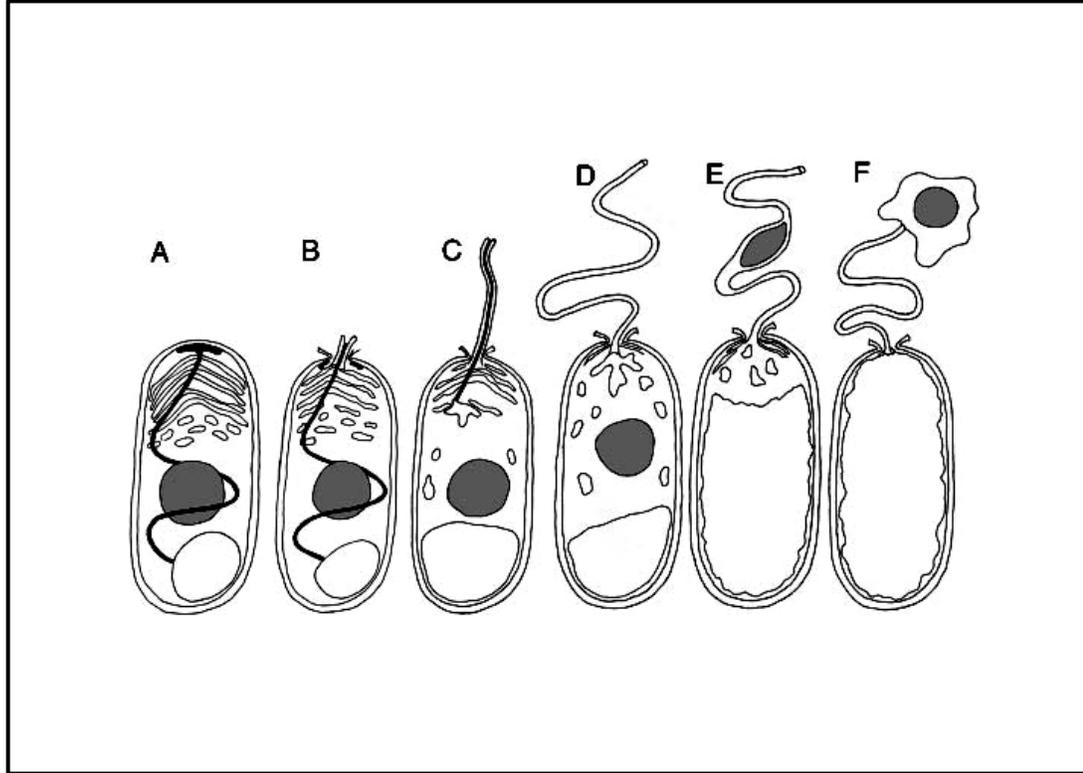


Figura 2. Germinación de una Espora. A) Espora en estado de reposo, exhibiendo el filamento polar (negro), el núcleo (gris), polaroplasto en porción apical y vacuola parasitófora en porción distal. B) Hinchazón del polaroplasto y vacuola posterior, ruptura del disco de anclaje y eversión del túbulo polar sobre sí mismo. C) El túbulo polar sigue evertiéndose. D y E) Una vez que el túbulo polar se encuentra completamente evertido, el esporoplasma es forzado a avanzar a través de este. F) El esporoplasma emerge desde el túbulo polar y ahora se encuentra delimitado por una nueva membrana. (Keeling & Fast, 2002).

2.3.3. Ciclo de Vida

En general, el ciclo de vida de *E. cuniculi* se ha dividido en tres fases: 1) Fase Ambiental o infecciosa, 2) Fase Proliferativa o merogónica y 3) Fase Esporogónica, de diferenciación o formadora de esporas (Cali, A & Takvorian, P.M., 2014). Figura 3.

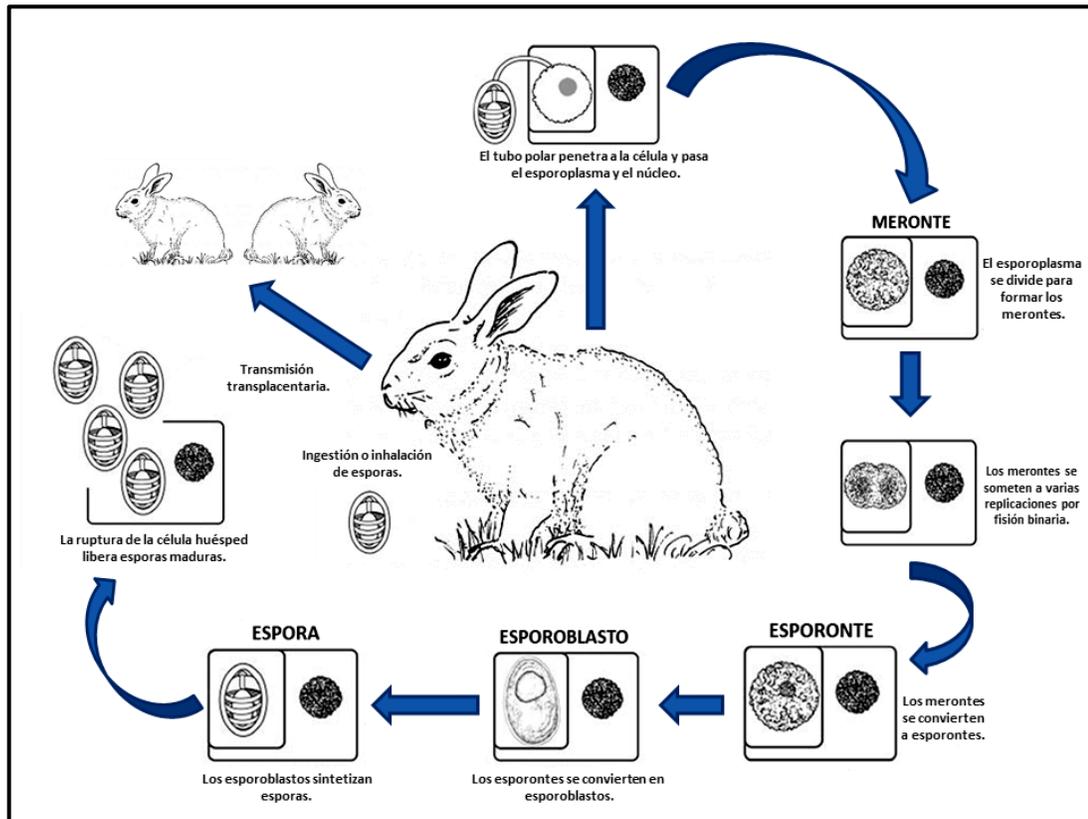


Figura 3. Ciclo de vida de *Encephalitozoon cuniculi*. La Fase I o infecciosa / ambiental, es la fase extracelular del ciclo, aquí las esporas maduras están en el ambiente. La Fase II también llamada proliferativa, es la primera fase del desarrollo intracelular. La fase III o esporogónica, representa la formación de esporas. (Modificado de Franzen, C. 2005; Cali & Takvorian, 2014).

2.3.3.1. Fase de Proliferación

El esporoplasma proveniente de la fase infecciosa ingresará a la fase proliferativa o merogónica, aquí, se formarán a través de fisiones binarias, unas estructuras llamadas merontes, las cuales se encontrarán muy adheridos a la membrana de la vacuola parasitófora (Desportes-Livage., 2000; Fasshauer, et al., 2005). Estas se caracterizan por tener una morfología circular, superficies membranosas irregulares, desarrollo pobre tanto del retículo endoplásmico liso

como del rugoso y la presencia de escasos ribosomas (Cali, A & Takvorian, P.M., 2014; Didier, E.S., *et al.*, 1998).

2.3.3.2. Fase de Diferenciación

Esta etapa también se conoce como fase esporogónica, ya que se distinguen tres estadios, a saber: a) fase de esporonte en donde las células están produciendo dos esporoblastos, b) fase de esporoblasto son las células que por el proceso de metamorfosis, produce una espora y c) fase de espora madura e infectiva, aquí los esporoblastos, resultan de la última división de los esporontes y es donde se terminan de desarrollar todas las estructuras que componen al aparato de extrusión (Cali, A & Takvorian, P.M., 2014), como son: 1) túbulo polar, 2) disco de anclaje, 3) polaroplasto y 4) vacuola posterior, además de que se producen una gran cantidad de ribosomas. Conforme el desarrollo continúa, estos esporoblastos se hacen más compactos y electrodensos, convirtiéndose más tarde en esporas infectivas y son liberadas al espacio extracelular, cuando la célula termine por ser lisada (Cali, A & Takvorian, P.M., 2014). Conforme va avanzando este proceso, estas esporas pueden infectar a otras células, otras serán fagocitadas por macrófagos locales o circulantes, así como también, evadirán su eliminación al replicarse dentro de éstos mismos y se diseminarán vía circulación sistémica, primero a ganglios linfáticos y posteriormente a sistema nervioso central, riñón e hígado (Meredith A.L & Richardson, J., 2015).

2.3.4. Variabilidad Genética

Actualmente se conocen 4 genotipos, basados en el número de repeticiones cortas de 59-GTTT-39 en la región espaciadora transcrita interna ribosomal (ETS) del gen del rDNA, así la cepa I (cepa de conejo) tiene tres repeticiones, la cepa II (cepa de ratón) presenta dos repeticiones, la cepa III (cepa de perro) muestra cuatro repeticiones (Didier, E.S., *et al.*, 1995 a,b), mientras que la cepa IV (cepa de humano) tiene cinco repeticiones (Talabani, H., *et al.*, 2010). Cabe mencionar que esta cepa también se ha diagnosticado en perros y gatos (Benz, P., *et al.*, 2011), así como también recientemente en una marmota de la isla de Vancouver (Milnes, E., *et al.*, 2018).

2.4. Encephalitozoonosis en Conejos

2.4.1. Características Generales de la Enfermedad

2.4.1.1. Epidemiología

En estudios previos, enfocados en pruebas serológicas se ha encontrado que conejos en criaderos y tiendas de mascotas están expuestos muy frecuentemente a *E. cuniculi*, por lo que existe una alta prevalencia de anticuerpos contra este patógeno en personas clínicamente sanos e inmunocompetentes.

2.4.1.2. Seroprevalencia de Anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* en Conejos

E. cuniculi, es un parásito que se encuentra frecuentemente distribuido entre los conejos domésticos, un ejemplo importante es la seroprevalencia

detectada en la población de conejos clínicamente sanos, que son utilizados como mascotas, donde se ha encontrado un 75% en Austria (Künzel, F., 2008), 52% en el Reino Unido (Keeble, E.J & Shaw, D.J., 2006), 49% en los Estados Unidos (Gannon, J., 1980), 81.7% en Brasil (Baldotto, S.B., *et al.*, 2015), 63.2% y 67.8% en Taiwán (Tee, *et al.*, 2011), 59.56% en Italia (Lavazza, A., *et al.*, 2016), 41.7% en el norte de Eslovaquia (Halánová, M., *et al.*, 2003), 22.6% en Korea (Shin, J.C., *et al.*, 2014), 18% en Alemania (Hein, J., *et al.*, 2014) y entre un 27.9% y 75.2% en Japón (Igarashi, M., *et al.*, 2008). O en granjas comerciales con un 31.6% en Italia (Santaniello, A., *et al.*, 2009), 16.5% en Nigeria (Okewole, E.A., 2008), 15% en Egipto (Ashmawy, *et al.*, 2011) y con 21.9% en China (Meng, Q.F., *et al.*, 2015).

2.4.1.3. Seroprevalencia de Anticuerpos contra *Encephalitozoon cuniculi* en Humanos

Estos datos son relevantes, porque indican que el mayor riesgo de contagio para el ser humano, es a través del contacto con los animales utilizados como mascotas, que con los animales de producción (Künzel, F & Joachim, A., 2010). Como lo indican algunos informes, en donde se ha documentado la presencia de anticuerpos contra estos agentes patógenos, en un 5.7% en el Este de Eslovaquia (Halánová, M., *et al.*, 2003), de 9.67% en China (Pan, Y., *et al.*, 2015) y 11.4% en Egipto (Abu-Akkada, S.S., *et al.*, 2015), de individuos inmunocompetentes, sin presentar signología clínica. Otros estudios, reportan una relación de aproximadamente 77.3% de seropositividad, en individuos inmunocomprometidos sin infección por el virus del VIH-SIDA y un 10.8% en

pacientes con otras infecciones virales, como aquellas que padecen del Virus del Papiloma Humano (VPH) (Abu-Akkada, S.S., *et al.*, 2015; Adam, J., *et al.*, 2014).

2.4.1.4. Modo de Transmisión

Se ha visto, que en experimentos realizados en conejos, a los cuales se les ha inoculado *E. cuniculi*, estos eliminan abundantes cantidades de esporas, a través de la orina, aproximadamente entre la quinta y sexta semana después de la exposición (Cox, J.C., *et al.*, 1979), sobreviviendo durante meses en ambientes húmedos y a una temperatura entre 10° y 30°C (Waller, T., 1979). Períodos largos de supervivencia, le confieren a este microorganismo la capacidad de transmitirse por vía horizontal, a través de la inhalación o ingesta de las esporas, que contaminan agua o alimentos (Didier, E.S., *et al.*, 2000). Y por vía vertical, por medio de una infección transplacentaria, la cual solo se ha descrito en conejos (Hunt, R.D., *et al.*, 1972; Meredith, A.L & Richardson, J., 2015). La presencia o ausencia de una vacuola parasitófora y el número de vueltas del tubo polar dentro de la espora, ayuda a diferenciar las especies del género *Encephalitozoon* (Böhne, W., *et al.*, 2011).

2.5. Distribución Geográfica

2.5.1. Potencial Zoonótico

Desde el primer reporte de una infección por *E. cuniculi* en humanos, registrado en un niño japonés de 9 años de edad, el cuál presentó fiebre de 39°C, cefalea, vómitos, pérdida de la conciencia y convulsiones (Matsubayashi, H., 1959), a la fecha solo se habían reportado algunos casos con escasa o nula

trascendencia. Sin embargo, fue en la década de los años 90's, cuando se empezaron a reportar casos bien documentados de pacientes inmunocomprometidos, que presentaron trastornos neurológicos, alteraciones nefrológicas y padecimientos oculares persistentes (Weber, R., *et al.*, 1994; Friedberg, D.N., *et al.*, 1990; Kodjikian, L., *et al.*, 2005).

Actualmente se sabe, que las rutas de transmisión de *E. cuniculi*, al igual que otras infecciones por microsporidios, incluyen la ruta oral-fecal de esporas de humanos y animales infectados a través de agua y alimentos contaminados, así como su detección en plantas de tratamiento de aguas para beber, plantas de tratamiento de aguas residuales y cuencas de ríos (Galván, A.L., *et al.*, 2013). Se ha documentado la presencia de esporas de *E. cuniculi*, en una cantidad de 1.2×10^2 en hojas de perejil en Polonia, debido al riego de este vegetal por aguas residuales (Jedrzejewski, S., *et al.*, 2007). Por otro lado, la adquisición de la infección por vía ocular con origen traumático, también se ha documentado en un jovencito Tamil de 11 años, el cual a los 5 años fue cornado por una cabra y posteriormente se sometió a un trasplante de córnea, en el estudio microscópico del estroma profundo de la córnea dañada, se observaron esporas de *E. cuniculi* (Ashton, N & Wirashina, P.A., 1973). Además, infecciones oculares sin trauma previo, también han sido documentadas, como el caso de una persona con infección por el virus del VIH-SIDA, que comenzó con una infección de los senos nasales y paranasales, con extensión al ojo (Rossi, P., *et al.*, 1999). Asimismo, la adquisición de la infección por vía aerógena, también ha sido documentada en una paciente que recibió un trasplante de médula, debido a una leucemia mielógena aguda seguida de un

linfoma Hodgkin y desarrolló una enfermedad respiratoria, identificándose a la cepa III de origen canino, como la responsable del deceso de la paciente (Orenstein, J.M., *et al.*, 2005).

2.6. Respuesta Inmunológica

Por lo general, el sistema linfático está compuesto por un grupo de células, tejidos y órganos, que vigilan las superficies corporales, así como, los compartimentos internos con fluidos, y reaccionan a la presencia de sustancias potencialmente nocivas. Los linfocitos y una gran variedad de células de sostén, constituyen las células del sistema inmunitario. Actualmente, hay tres tipos de linfocitos, que son: linfocitos B, linfocitos T y linfocitos NK. Mientras que las células de sostén, son aquellas que interactúan con los linfocitos, cumpliendo funciones importantes en la presentación de antígenos y la regulación de las respuestas inmunitarias, como son: monocitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células reticulares, células dendríticas, células dendríticas foliculares, células de Langerhans y células epitelio reticulares (Pawlina, W., 2015).

Las diferentes células del tejido linfático y del tejido hematopoyético, poseen moléculas de superficie celular exclusivas, principalmente en el ser humano y el ratón, llamadas moléculas homólogas. Estos marcadores específicos, también llamados, moléculas de cúmulo de diferenciación (CD) están designados con números de acuerdo a un sistema internacional, relacionándolos con antígenos expresados en diferentes etapas de su diferenciación. Estas moléculas CD se visualizan mediante pruebas inmunohistoquímicas, utilizando anticuerpos

monoclonales y son útiles para la identificación de subtipos específicos de células linfáticas o hematopoyéticas. Algunos marcadores CD son expresados por células durante toda su vida, otros se expresan sólo durante una fase de la diferenciación o durante la activación celular (Tizard, I.R., 2013; Pawlina, W., 2015).

2.6.1. Respuesta Inmune Celular

Los linfocitos T, son células que se diferencian en el timo, los cuales al abandonarlo, se acumulan en la paracorteza de los nódulos linfáticos, las vainas linfoides periarteriolas del bazo y las áreas interfoliculares de las placas de Peyer, tienen una vida útil larga y participan en la inmunidad mediada por células, su proporción es del 60% al 80% de los linfocitos circulantes en sangre y expresan los marcadores CD2, CD3, CD5 y CD7, además de los receptores de antígeno de linfocitos T (TCR). Es importante señalar que el marcador CD3 es el nombre con el que se conoce, a un conjunto de proteínas del TCR implicadas en la transmisión de la señal de activación desde el receptor hasta el interior de la célula, tras la unión del antígeno al receptor del linfocito T. Por otro lado, también se subclasifican de acuerdo con la presencia o ausencia de otros marcadores de superficie, que son: CD4 y CD8. La proporción entre las células CD4⁺ y CD8⁺ en sangre se utiliza, para estimar la función de los linfocitos y el estado del sistema inmunitario, así por ejemplo: si hay un elevado recuento de linfocitos CD4, este se asocia con un incremento de la reactividad linfocítica, debido al aumento de los linfocitos colaboradores, por

otro lado, si hay un recuento elevado de los linfocitos CD8, este se asocia a una disminución de la reactividad linfocítica (Tizard, I.R., 2013; Pawlina, W., 2015).

Los linfocitos T CD4⁺ cooperadores, son linfocitos que también expresan marcadores CD4, que sirven como un receptor para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de las células presentadoras de antígenos. Estos linfocitos se subdividen, según su capacidad de secretar citocinas, siendo las interleucinas, las citocinas específicas secretadas por estos linfocitos T CD4⁺. Estas citocinas estimulan a otros linfocitos T, B y NK, para que lleven a cabo su diferenciación y proliferación. Los linfocitos T cooperadores que sintetizan interleucina 2 (IL-2), interferón γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α), se denominan células TH1. Estas interactúan con los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL), los linfocitos NK y los macrófagos, en las respuestas inmunitarias mediadas por células, además de ser esenciales para el control de patógenos intracelulares, como los virus y ciertos microorganismos. Los otros linfocitos T cooperadores que sintetizan IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, se denominan células TH2 y su función principal es interactuar con los linfocitos B, paso esencial en el inicio de las respuestas inmunitarias mediadas por anticuerpos, que controlan los agentes patógenos extracelulares.

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos también llamados (CTL), son células que también expresan marcadores CD8. Este marcador es un receptor para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I). Estas células destruyen células infectadas por virus, células neoplásicas, células infectadas con microorganismos intracelulares, parásitos y células transplantadas (Tizard, I.R., 2013; Pawlina, W., 2015).

Otros tipos de linfocitos T, son los reguladores también llamados (supresores), los cuales constituyen una población diversa en cuanto a fenotipo y pueden suprimir funcionalmente una respuesta inmunitaria a los antígenos extraños y propios, mediante su influencia sobre la actividad de otras células del sistema inmunitario.

Por otro lado, los linfocitos T gama/delta (γ/δ) forman parte de una pequeña población de linfocitos T que tienen en su superficie un TCR distinto, compuesto por una cadena γ y una cadena δ . Estas células se desarrollan en el timo y migran a varios epitelios, como son: la piel, mucosa oral, intestinal y vaginal. Una vez en estos sitios, no recirculan entre la sangre y los órganos linfáticos. Estas células toman una posición estratégica en las interfases de los medios interno y externo, funcionando como primer línea de defensa contra los organismos invasores, encontrándose incluso con el antígeno en la superficie de las células epiteliales, antes de que ingresen en el organismo (Pawlina, 2015). En el intestino, se pueden detectar linfocitos T tanto α/β como γ/δ , pero colonizan distintas localizaciones: los linfocitos T α/β se encuentran en la lámina propia, mientras que los γ/δ están debajo y entre los enterocitos, por lo que se les llaman (linfocitos intraepiteliales). El 50% de los linfocitos intraepiteliales en los ratones, tienen un receptor de linfocitos T (TCR) compuesto por γ/δ . Una elevada proporción de linfocitos T intestinales son $CD8^+$, los cuales poseen moléculas con homodímeros α/α a diferencia de los heterodímeros α/β de los linfocitos convencionales. Esto es importante, porque en lugar de ligar a moléculas del complejo mayor de compatibilidad clase II, estos linfocitos T $CD8$ ligan una molécula de clase Ib del CMH, llamada antígeno TL, la cual se

expresa solamente en los enterocitos. La finalidad es suprimir su función e impedir la destrucción de los enterocitos por parte de los linfocitos T (Tizard, I.R., 2013).

2.6.2. Respuesta Inmune Humoral

Los linfocitos B fueron identificados por vez primera, como una población separada en la bolsa de Fabricio de las aves. En los mamíferos, estas células se originan en la médula ósea, pero maduran en las placas de Peyer o en la misma médula ósea, antes de migrar a los órganos linfoides secundarios. Los linfocitos B predominan en la corteza de los nódulos linfáticos, en los folículos de las placas de Peyer y el bazo, así como en la zona marginal de la pulpa blanca esplénica. Estas células participan en la producción y secreción de los diferentes anticuerpos circulantes o inmunoglobulinas, las cuales están asociadas con la inmunidad humoral y constituyen entre el 10% y el 40% de los linfocitos circulantes. Por otro lado, también expresan formas de inmunoglobulina limitadas por membrana, llamadas receptores de antígeno de linfocitos B (BCR), que sirven como sitio de fijación para antígenos específicos. Existen subpoblaciones de linfocitos B, que utilizan cinco cadenas peptídicas diferentes ($\gamma, \mu, \alpha, \epsilon$ y δ) en sus BCR. Estos BCR se liberan de la célula en grandes cantidades, pasando a los fluidos tisulares y a la sangre, recibiendo el nombre de anticuerpos, siendo estos últimos las formas solubles de los BCR. En su proceso de diferenciación, por ejemplo: el isotipo del BCR cambia de IgM en los linfocitos B inmaduros, a IgD en las células maduras. Estos linfocitos B, también expresan las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II

(MHCII) en su superficie celular y sus marcadores CD son CD9, CD19 y CD20 (Tizard, I.R., 2013; Pawlina, W., 2015).

2.7. Patogénesis y Enfermedad Clínica

Normalmente, las infecciones producidas por *E. cuniculi* para muchas especies incluyendo al ser humano, se limita a numerosos factores, como son: las barreras no inmunológicas, entre las que se encuentran: la temperatura corporal, genética, exposición a reservorios, receptores de células hospedadoras, además de elementos físicos y ambientales. Sin embargo, también es importante resaltar algunas características que las células hospedadoras tienen para poder ser consideradas aptas en el proceso de infección por parte de este microorganismo, como por ejemplo: la presencia de los receptores y los ligandos que estas células poseen, para facilitar la adherencia e infectividad del huésped y del tejido. Tal es el caso de una proteína de la pared de *Encephalitozoon*, la EnP1 la cual permite la adherencia de este microorganismo a los glucosaminoglicanos de la célula huésped o la alta concentración de los O-manosilglicanos en el casquete polar de las esporas, las cuales también podrían servir como ligandos para la adherencia y la infección (Southern, *et al.*, 2007; Taupin, *et al.*, 2007). En un estudio realizado en macrófagos, el proceso de captación de esporas y su entrada a las células, está mediada por una fagocitosis dirigida dependiente de actina, en el cual se les transfiere a un compartimiento lisosómico. Este internamiento de las esporas en los compartimientos lisosómicos, hace madurar a los lisosomas y pasado un tiempo ya no hay esporas intracelulares. A pesar de ello, algunos

esporoplasmas pueden escapar de los lisosomas, madurando e infectando el citoplasma mediante la descarga del tubo polar. El esporoplasma de estas esporas y de aquellas que inyectan el tubo polar desde fuera de las células, son al parecer la única manera de establecer un nuevo ciclo de vida en el interior de las células (Franzen, C., *et al.*, 2005).

2.7.1. Enfermedad Neurológica

Los primeros reportes de una infección neurológica por microorganismos del género *Encephalitozoon*, se presentaron a partir de los años veinte en el siglo pasado, en donde se reportaron algunos casos de meningitis, encefalitis y cuadros convulsivos, en individuos jóvenes y aparentemente sanos (Coulon, G., 1929; Wolf, A & Cowen, D., 1937; Matsubayashi, H., *et al.*, 1959). Sin embargo, fue a partir de los primeros casos de pacientes con infección con el virus de VIH-SIDA, que se empezó a describir con mejor detalle los tipos de lesiones que este microorganismo producía, en el sistema nervioso central. Las primeras lesiones tisulares se presentan, en el riñón, el hígado y el pulmón, sin embargo, a los tres meses las lesiones estarán presentes principalmente, en los riñones y el cerebro, el corazón también puede verse afectado, aunque en menor grado, al disminuir las lesiones en estos órganos y observar ausencia de parásitos (Cox, J.C., *et al.*, 1979). En el conejo, el área del sistema nervioso central que más se afecta, son las porciones de corteza y médula del cerebro, sin embargo, también hay lesiones en el tronco del encéfalo y la médula espinal, así como en menor escala, en el cerebelo. Asimismo, las leptomeninges también se ven afectadas y existe un reporte, en el que se informó de la presencia de una

radiculitis espinal focal, como causante de síntomas neurológicos atípicos (Nast, R., *et al.*, 1996). Por otro lado, en un estudio realizado por Csokai, J., *et al.*, 2009a, se encontró la afectación de los núcleos vestibulares en 37.5% de 71 conejos infectados naturalmente. Microscópicamente, las alteraciones en cerebro, muestran infiltración perivascular, así como meningoencefalitis no supurativa o granulomatosa, con patrón de distribución focal o multifocal (Cox, J.C & Gallichio, H.A., 1978; Wicher, V., *et al.*, 1991; Eröksüz, Y., *et al.*, 1999; Csokai, J., *et al.*, 2009a). Por otro lado, los granulomas contenían linfocitos, células plasmáticas, células de la glía y un centro necrótico (Eröksüz, Y., *et al.*, 1999; Harcourt-Brown, F.M., 2004).

2.7.2. Enfermedad Renal

A nivel renal, las lesiones macroscópicas que se producen frecuentemente, son amplias áreas con depresiones irregulares, de color blanco a gris, que a veces se unen, así como diferentes grados de nefritis intersticial crónica con tejido cicatrizal, debido a la fibrosis (Rodríguez-Tovar, L.E., *et al.*, 2017). Por otro lado, además de formarse granulomas multifocales, la multiplicación de las esporas se realiza en el epitelio tubular y desde allí, se excretan en la orina. Conforme avanza la infección, la detección de las esporas en los tejidos es menos frecuente (Flatt, R.E & Jackson, S.J., 1970; Cox, J.C & Gallichio, H.A., 1978; Eröksüz, Y., *et al.*, 1999; Csokai, J., *et al.*, 2009a). Microscópicamente, se aprecia una nefritis intersticial grave y granulomatosa severa local, rodeada de numerosas células inflamatorias del tipo mononuclear como macrófagos, un infiltrado linfocitario, además de fibrosis marcada (Flatt, R.E & Jackson, S.J.,

1970; Csokai, J., et al., 2009a; Rodríguez-Tovar, L.E., et al., 2017). Los quistes con esporas de *E. cuniculi*, se encuentran con más frecuencia en la médula renal, aunque a veces también en la corteza, segmento donde además se observa, un proceso degenerativo epitelial de los túbulos renales, así como extensas hemorragias y necrosis del parénquima renal (Rodríguez-Tovar, L.E., et al., 2017).

2.7.3. Enfermedad Ocular

Las infecciones oculares que *E. cuniculi* produce en algunas especies, son variadas, como por ejemplo: en conejos produce cataratas, ruptura de la cápsula de la lente y una uveítis facoclástica (Ashton, N., et al., 1976; Giordano, et al., 2005), en cachorros de zorro azul, se han presentado cataratas con lesiones vasculares inflamatorias en las arterias ciliares posteriores y áreas de necrosis retiniana, así como cataratas en minks (Bjerkås, I., 1990; Arnesen, K & Nordstoga, K., 1977). Por otro lado, un reporte de queratitis, así como de uveítis con cataratas en gatos, también han sido reportados (Buyukmihci, N., et al., 1977; Csokai, J., et al., 2010). En el caso del ser humano, también se han documentado algunos trastornos oculares, asociados a esta infección y que han consistido en cuadros de queratoconjuntivitis y endoftalmitis, alteraciones que han sido encontrados en pacientes inmunocomprometidos (Friedberg, D.N., et al., 1990 Kodjikian, L., et al., 2005).

La uveítis, la ruptura de los lentes, así como la formación de cataratas en conejos jóvenes, al parecer se asocia a la infección por *E. cuniculi*. Esto se debe, a una posible transmisión vertical, en donde estos microorganismos

invaden el desarrollo de los lentes de los conejos, cuando éstos se encuentran en el útero, ya que la cápsula en esta etapa se encuentra muy delgada o está ausente, además de estar ricamente vascularizada por la túnica vasculosa lentis. Una vez que nace el individuo, el parásito induce el rompimiento de la lente en su punto más delgado en la superficie anterior, liberando el material dentro de la cámara anterior del ojo, causando con esto la uveítis facoclástica, lesión ocular que consiste en la presencia de una masa esponjosa de color blanco, en la cámara anterior del ojo (Wolfer, J., *et al.*, 1993; Ashton, N., *et al.*, 1976; Rafferty, N.S & Scholz, D.L., 1991). Esta condición, es consecuencia de una infección intrauterina por *E. cuniculi* en conejos y se debe a la infiltración por numerosas células inflamatorias como granulocitos, macrófagos y células gigantes, las cuales conducen a una ruptura de la cápsula y los parásitos solo se encuentran en esta estructura (Giordano, *et al.*, 2005). Por otro lado, el iris y el cuerpo ciliar, se observan infiltrados por células plasmáticas y linfocitos.

Estudios biomicroscópicos, han demostrado que la masa originada en la cápsula de la lente y la inflamación, origina la ruptura de esta estructura, liberándose la proteína en la cámara anterior, resultando en una uveítis granulomatosa, sin embargo, el segmento posterior que involucra al humor vítreo, la retina y coroides, no se ven afectados.

2.7.4. Enfermedad Intestinal

Con respecto a la afectación que este microorganismo produce a nivel intestinal, se ha encontrado que la transmisión se realiza, a través de la orina infectada con las esporas de este agente patógeno, una vez que llegan a la

mucosa del intestino, empieza el proceso de germinación de las mismas, en respuesta a los estímulos encontrados en el sitio de la germinación (Undeen, A.H., 1990). Este proceso incluye un período de tiempo, que puede durar entre 1 a 20 minutos, antes de que empiece a emerger el filamento polar y se forme el tubo polar, penetrando la pared intestinal y expulsar rápidamente el esporoplasma, el cual está formado por uno o dos núcleos y algo de citoplasma, el cual fluye a través de este último hacia los tejidos del hospedador, empezando a multiplicarse e invadir el sistema retículo-endotelial, para distribuirse posteriormente por todo el cuerpo (Weidner, E., 1972). Algunas veces, este microorganismo se localiza en el cerebro, riñón y ocasionalmente, también en el miocardio. En el riñón, las esporas de *E. cuniculi* se encuentran en las células epiteliales de los túbulos renales y son expulsadas por la orina, siendo un mecanismo de transmisión, para que exista una infección cruzada entre conejos y otros roedores, principalmente en bioterios donde se crían ambas especies (Harcourt-Brown, F.M., 2002). Se han identificado dos microsporidios, que tienen el potencial de causar trastornos digestivos muy severos, como diarreas crónicas y desgaste marcado, sobre todo en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, que son *Enterocytozoon bienewisi* y *Septata intestinalis* (Desportes, et al., 1985; Cali, A., et al., 1991, 1993). Este último microsporidio, reclasificado como *E. intestinalis*, basado en características fenotípicas y genotípicas (Hartskeerl, R.A., et al., 1995). El cual tiene una afinidad muy particular por los glucosaminoglucanos, en la superficie de las células huésped, principalmente de los enterocitos (Hayman, J.R., et al., 2005), así como su adhesión a las integrinas $\alpha 3 \beta 1$ y $\alpha 5$

$\beta 1$, las cuales se encuentran ampliamente expresados en el epitelio intestinal del ser humano, siendo el sitio inicial de la infección por este microsporidio (Leonard, C.A., *et al.*, 2017). Así, bajo este orden de ideas, mientras que *E. intestinalis* es especialista en invadir la mucosa intestinal, *E. cuniculi* desarrolla más, la capacidad de diseminarse a través de la corriente sanguínea hacia todos los órganos, con lo que la infección se expande más rápido, dañando los órganos internos, lo que conduce a la aparición de los signos clínicos y la muerte del individuo (Sak, B & Ditrich, O., 2005). A la fecha, se sospecha que *E. cuniculi* puede estar involucrado como un posible agente etiológico, en la enfermedad de Crohn (Andreu-Ballester, J.C., *et al.*, 2013).

2.8. Métodos de Diagnóstico

2.8.1. Técnica de Tinción

Al observar al microscopio un corte histológico sin teñir, es difícil apreciar la estructura del tejido, a no ser que dicho tejido posea algún tipo de molécula o pigmento natural propio que le confiera coloración. Así, las estructuras tisulares no teñidas no pueden detectarse con el microscopio óptico convencional, ya que el índice de refracción de todas ellas es similar, por tanto, al iluminar una preparación sin teñir no se producen cambios apreciables en la longitud de onda de la luz que la atraviesa y que permitan distinguir los distintos componentes del tejido. Por lo que, para poner de manifiesto las diferentes estructuras que integran una sección histológica, es necesario crear artificialmente un contraste diferencial entre los diversos elementos del tejido.

Una tinción es un procedimiento para visualizar un tejido que puede implicar el uso de uno o varios colorantes de modo simultáneo o sucesivo.

Por lo tanto, los colorantes son los reactivos utilizados en este proceso, siendo así que un compuesto químico es coloreado, porque sus moléculas absorben cuantos de radiación electromagnética, en la parte visible del espectro. Existen tres principios importantes que deben guardar los protocolos de tinción, como son: a) Debe ser compatible con el fijador y el tipo de inclusión, b) los protocolos deben estar estandarizados y c) el uso de controles para evaluar si la tinción es adecuada.

2.8.2. Histoquímicas

Para la mayoría de los investigadores, el determinar la presencia de esporas en muestras observadas al microscopio, depende en gran medida de poderlas observar bien teñidas, con buen contraste y suficiente definición, incluso para poderles tomar medidas y compararlas con otros tipos de microsporidios. Por lo que, se tienen que realizar una serie de tinciones especiales, para ponerlas de manifiesto y llevar a cabo un buen diagnóstico. Actualmente, se han desarrollado una serie de histoquímicas, tendientes a demostrar la presencia o ausencia de dichas estructuras, en especímenes clínicos *post-mortem*, de individuos que han cursado con algún proceso infeccioso, debido a la presencia de estos agentes patógenos.

Dentro de este grupo, las más frecuentes son:

2.8.2.1. Tinción de Hematoxilina y Eosina

Es considerada una tinción general, debido a que tiñe todas las estructuras tisulares. Consta de dos colorantes, uno para las estructuras ácidas como el DNA y RNA (hematoxilina-alumbre de hemateína) y otro colorante ácido para el citoplasma y estructuras extracelulares de carácter básico (eosina). Esta tinción, es la más utilizada en la descripción básica de la morfología de un tejido y para el diagnóstico anatomopatológico (Montuenga, B.L., 2014). Las esporas de *E. cuniculi* con esta tinción, se aprecian ligeramente basófilas, transparentes y poco definidas (Rodríguez-Tovar, L.E., *et al.*, 2017).

Otras tinciones utilizadas, se basan en la capacidad de las esporas para retener la tinción, después del proceso de decoloración. En este grupo, encontramos a:

2.8.2.2. Cromotrópo-tinción. Tinción de Tricromo Modificado

Es una tinción, que permite la observación de las esporas como estructuras rojas, con una conformación de ovoides a redondas. Así como, ciertas estructuras como son: el polaroplasto, la vacuola posterior y el tubo polar, este último, reconocido por una franja parecida a un cinturón en el plano ecuatorial, así como la membrana celular de la célula huésped infectada, la cual era perfectamente perceptible (Weber, R., *et al.*, 1992; Rodríguez-Tovar, L.E., *et al.*, 2017).

2.8.2.3. Tinción de Gram

En esta tinción, se reporta la presencia de las esporas como estructuras con patrón ovoide y de color azul oscuro. Sin embargo, no se aprecian estructuras internas, asimismo, muestra un fondo de color amarillo ámbar (Weber, R., *et al.*, 1994; Rodríguez-Tovar, L.E., *et al.*, 2017).

2.8.2.4. Agentes quimiofluorescentes. Calcoflúor-white

Las esporas de las microsporidias tienen quitina a nivel de la endospora. Su detección por parte de los abrillantadores, ofrece una técnica de diagnóstico útil. Los abrillantadores ópticos, son compuestos orgánicos con anillos aromáticos como parte de su estructura, los cuales emiten luz en el espectro visible, una vez que hay excitación con luz de onda corta o luz ultravioleta. Hay dos compuestos que reúnen estas características y son: el Calcoflúor-White y el Uvitex 2B (Weiss, L.M & Becnel, J.J., 2014).

2.9. Serología

Muchas de las infecciones ocasionadas por microsporidios, conducen a la activación de anticuerpos en el huésped y su persistencia es indicativa de una enfermedad latente. Así, los anticuerpos específicos contra los antígenos de estos microorganismos, desempeñan un papel importante en la resistencia a las infecciones, pero si actúan solos, no producen una barrera inmunitaria eficaz contra la enfermedad. Se ha visto que estos anticuerpos, cumplen una función de opsonización, facilitando así la fagocitosis mediada por macrófagos. En animales inmunocompetentes, la formación de anticuerpos IgG se desarrolla en

las primeras dos semanas posteriores a la infección, alcanzando su máximo a las 5-6 semanas y generalmente persisten durante toda la vida del huésped (Valencakova, A & Halanova, M., 2012).

Esto es importante, ya que la detección de altos niveles de anticuerpos específicos a largo plazo, son de utilidad en el diagnóstico intra-vital de animales infectados, permitiendo con esto aislar animales seropositivos de otros animales en un grupo (Cox, J.C., *et al.*, 1977; Shaddock, J.A & Greeley, E., 1989). La producción de anticuerpos contra *E. cuniculi*, se ha detectado en personas inmunocompetentes, sin embargo al no observarse microsporidios directamente, es imposible determinar si la presencia de estos anticuerpos, se correlaciona con una infección activa (Bergquist, N.R., *et al.*, 1984; Hollister, W.S., *et al.*, 1991).

2.10. Tracto Digestivo del Ratón

2.10.1. Estómago

El estómago murino, se divide en una porción glandular y una no glandular o escamosa. Esta última es la más grande y tiene un color cremoso, mientras que la glandular presenta un color rosado, ambas partes están divididas por la cresta limitante. La porción escamosa abarca, desde la entrada del esófago hasta la cresta limitante y está recubierta por un epitelio plano estratificado queratinizado, muy engrosado cuando el animal no ha comido. Por otro lado, la porción glandular se divide en tres regiones, según el tipo de células distribuidas en el epitelio, así podemos mencionar la porción cardial, la fúndica (que es la más grande) y la pilórica. El epitelio glandular, está constituido por

una sola capa de células cúbicas a cilíndricas, recubriendo las fosas gástricas simples y ramificadas, las cuales en esta especie, aparecen rectas. En todas las regiones, las porciones superficiales de las fosas, están recubiertas por células epiteliales superficiales cilíndricas, con núcleos basales y citoplasma denso. Las células que secretan moco, son las más abundantes y están debajo de las células superficiales de la región cardial y fúndica, pero son más prominentes en la región pilórica. Son de un epitelio columnar bajo, con núcleos basales y tiene moco en gránulos, a nivel del citoplasma apical.

Las células parietales, caracterizadas por secretar ácido, son las más abundantes en la región fúndica, son células cúbicas grandes, con citoplasma eosinofílico pálido y núcleos redondos centrales, dispersos entre las células a lo largo de las fosas gástricas, principalmente en el fondo. Las células principales, también llamadas zimogénicas, están en la base de los pozos gástricos de la región fúndica, son células cilíndricas bajas, eosinofílicas granulares oscuras en su citoplasma y con núcleos basales. El epitelio gástrico se encuentra sobre una lámina propia de tejido conectivo y una delgada muscular de la mucosa, rodeada de una submucosa de tejido conjuntivo y tres capas musculares, la oblicua más interna, la media circular, que es la más prominente en esta especie y la longitudinal (Scudamore, C.L., 2014).

2.10.2. Intestino Delgado y Grueso

Ambos intestinos, el delgado y el grueso presentan una capa serosa más externa, que rodea las capas de músculo liso circular interno y longitudinal externo, submucosa y la mucosa. El plexo nervioso, está entre las dos capas

musculares y la lámina propia, contiene poblaciones variables de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. La mucosa del intestino delgado, está constituida por vellosidades que se proyectan en forma de dedos separados por criptas alineadas por una sola capa de células epiteliales cilíndricas, que corresponden a enterocitos con poblaciones variables de células mucosas, de Paneth y neuroendócrinas en toda su longitud. El intestino delgado, está constituido de tres regiones principales, que son: el duodeno, el yeyuno y el íleon.

2.10.2.1. Duodeno

La presencia de las glándulas de Brunner a nivel de la submucosa, son de ayuda para asegurar que se está en una sección de duodeno, aquí las vellosidades son altas y en forma de hoja en un corte longitudinal. Las vellosidades del yeyuno e íleon, son cilíndricas y cuentan con lados rectos en cada sección.

2.10.2.2. Yeyuno

Las vellosidades de esta sección, son más largas y tienen un mayor número de células de Paneth a nivel de la mucosa, a diferencia del íleon. Los gránulos de secreción que poseen éstas células, contienen lisozima (enzima que digiere paredes celulares de cierto grupo de bacterias), α -defensinas (homólogas de péptidos involucrados en el funcionamiento de mediadores en los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos), glucoproteínas, una proteína alta en arginina y zinc, compuestos involucrados en acciones antibacterianas y con capacidad de

fagocitar ciertas bacterias y protozoarios, indicando que éstas células desempeñan un papel en la regulación de la flora bacteriana normal del intestino delgado (Pawlina, W., 2015). Por otro lado, los enterocitos que forman parte del revestimiento epitelial de todo el intestino delgado, son células cilíndricas altas, con borde de cepillo y núcleos basales. Las células de Paneth, se encuentran en la base de las criptas y contienen numerosos gránulos eosinofílicos grandes y prominentes, además, son las más numerosas en el yeyuno.

2.10.2.3. Íleon

Asimismo, las células caliciformes tienden a ser más numerosas en el íleon, tienen núcleos basales, así como vacuolas de mucina basófilas pálidas, grandes, en posición apical y en algunas ocasiones son granuladas. Las células enteroendócrinas, que producen hormonas involucradas en la motilidad, la secreción intestinal y en el control del metabolismo, conforman el 1% de las células de revestimiento epitelial. Hay muchos subtipos dependiendo de sus productos neuroendócrinos y su distribución regional, como son: las hormonas incretinas péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y el polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP), que estimulan a las células β del páncreas y juntas contabilizan más del 50% de la respuesta secretora de insulina normal a la glucosa oral (Habib, A.M., *et al.*, 2012).

El intestino grueso, está compuesto de tres porciones, que son: el colon, el ciego y el recto.

2.10.2.4. Colon

La mucosa del colon tiene prominentes pliegues transversales proximales, una sección media plana, así como pliegues longitudinales distales hacia el recto.

2.10.2.5. Ciego

El ciego es un saco grande, ciego y con un prominente plegamiento de la mucosa transversal. La mucosa del ciego y del colon, tienen criptas profundas, pero no vellosidades, está revestida por un epitelio constituido por enterocitos, células mucosas y células enteroendócrinas, sin embargo, aquí no hay células de Paneth. Las células mucosas, son más abundantes en el intestino grueso que en el intestino delgado y dentro del primero son más numerosas en el colon proximal y el ciego, que en el colon distal.

2.10.2.6. Recto

El recto es muy corto y parecido al colon distal, asimismo, hay una transición abrupta hacia el epitelio escamoso queratinizado del ano (Scudamore, C.L., 2014).

2.10.3. Tejido Linfoide en Tracto Digestivo del Ratón

El tejido linfoide asociado al intestino es muy abundante en los ratones y normalmente se ubica en la submucosa anti-mesentérica. Amplias áreas organizadas de linfocitos conocidas como placas de Peyer, las cuales son más prominentes en animales jóvenes, se encuentran en yeyuno, íleon y el ciego y

son visibles desde la superficie serosa. Adicionalmente, los linfocitos intraepiteliales son muy comunes y están en mayor cantidad en la mucosa del intestino delgado, principalmente en el duodeno y el yeyuno, en una cantidad de 16 linfocitos intraepiteliales por cada 100 enterocitos, lo que los hace ser una población notablemente numerosa, considerando el tamaño del órgano. A diferencia de los linfocitos de la lámina propia, que son más abundantes en el íleon. Además, pequeños agregados de células linfoides llamadas criptoplasmas o folículos linfoides aislados, se pueden encontrar en toda la longitud del intestino (Tamura, A., *et al.*, 2003; Pabst, O., *et al.*, 2005).

2.10.3.1. Respuesta Inmune en el Tracto Digestivo del Ratón

El intestino es una de las estructuras del aparato digestivo, que se encuentra permanentemente vigilado por el sistema inmunológico, tratando de evitar posibles invasiones por microorganismos patógenos. Este sistema de protección, necesita tener acceso directo a numerosos epítomos de patógenos potenciales, para generar una respuesta inmunológica específica (Gebert, *et al.*, 1996). En los ratones, las placas de Peyer están localizadas en intervalos aleatorios en el yeyuno e íleon y parecen depender enteramente del estímulo de la microflora intestinal normal, éstas se desarrollan entre las 2 a 4 semanas después del nacimiento y persisten hasta la vejez (Tizard, I.R., 2013).

Aproximadamente el 50% de los linfocitos intraepiteliales expresan la forma $\gamma\delta$ del receptor de linfocitos T, mientras que el 50 al 70% de los linfocitos son de estirpe B y del 10% al 30% de los linfocitos son de estirpe T (Abbas, A.K., *et al.*, 2012). Algunas de las células epiteliales que revisten a las placas de Peyer, son

las células M (membranosas) altamente especializadas, las cuales se encuentran monitoreando constantemente a los antígenos de potenciales microorganismos patógenos. Estas células en ambas porciones, tanto del intestino delgado como del grueso, están presentes en las áreas del domo que están asociadas con los folículos linfoides de la submucosa de las placas de Peyer, así como el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Gebert, *et al.*, 1996).

En el ratón, las células M tienen microvellosidades muy cortas, poseen un delgado glucocálix comparado con los enterocitos, así como un sistema de transporte vesicular intracelular, son pinocíticas de forma activa y transportan macromoléculas o antígenos a través del epitelio, desde la luz del intestino hacia los tejidos linfoides subepiteliales, interactuando con las células del sistema inmune e iniciando una respuesta inmunológica y tolerancia, la proporción de estas células en el epitelio asociado al folículo, es de aproximadamente un 10% (Rowiński, J., *et al.*, 1984; Gebert, *et al.*, 1996; Tizard, I.R., 2013).

Se piensa que éstas células, desempeñan una función importante en el transporte de los antígenos a las placas de Peyer y expresan altos niveles del marcador $\alpha(1,2)$ fucosa en el glucocálix de su membrana apical y en su citoplasma, la cual ha sido detectada por la aglutinina-1 de *Ulex europeus*, que es una lectina vegetal. Otras lectinas vegetales que detectan a este marcador, son: la aglutinina de *Lotus tetragonolobus*, lectina de *Aleuria aurantia* y aglutinina específica de *Psophocarpus tetragonolobus*, mientras que una de origen animal es: la aglutinina de *Anguilla anguilla*, la cual también se une

selectivamente a las células M, de las Placas de Peyer murinas (Clark, M.A., *et al.*, 1993).

Además de los dominios de unión a lectinas, la presencia de filamentos celulares específicos, han sido investigados en las células epiteliales que recubren a las placas de Peyer del ratón. Citoqueratinas y vilinas se expresan tanto en enterocitos absorbentes y en las células M, mientras que la vimentina no se expresa en el epitelio asociado al folículo del ratón. Como resultado, ningún filamento celular específico de células M en el ratón, ha sido identificado hasta el momento. Por el contrario, la integrina $\beta 1$ está expresada en las membranas apicales de las células M y no en los enterocitos de las placas de Peyer del ratón. Adicionalmente, las células M de las placas de Peyer murinos, expresan la anexina V.

Además, una expresión relativamente alta de clusterina, anexina A5, CD44, matriz de metaloproteínasa 14 (MPP14) y β -tubulina, están presentes en el epitelio que recubre a las placas de Peyer en el ratón. Las células M de las placas de Peyer pueden también distinguirse de los enterocitos, por su expresión de β -catenina, α -actenina y actina polimerizada. Finalmente, se ha demostrado más recientemente que la glucoproteína 2, está específicamente expresada por las células M de las Placas de Peyer murinas, actuando como un receptor transcitótico, para antígenos de la mucosa. En un estudio previo, se determinó la velocidad del tránsito intestinal en este modelo animal, esto es importante si se quiere utilizar la ruta digestiva como sitio para la presentación de antígenos (Tamez-Treviño, E., *et al.*, 1996).

A la fecha no se conoce con exactitud la interacción que tienen las diferentes células captadoras de antígenos en la superficie intestinal del ratón y su procesamiento en las placas de Peyer, así como el mecanismo que utilizan las esporas de *E. cuniculi* para ser captadas por dichas células y llevarlas al torrente sanguíneo, para su posterior diseminación a otros órganos, en ratones infectados por vía oral, por lo que este estudio nos permitirá entender y establecer mecanismos de bloqueo en la captación de antígenos, así como inhibición de fagocitosis, para implementar en un futuro, mecanismos de control y prevención de esta zoonosis.

2.11. Características Hematológicas del Ratón

El estudio de las características celulares que componen la sangre de los ratones, es esencial en virtud de caracterizar la forma normal de dichas células en los animales sanos, así como, detectar alguna alteración que pudiesen mostrar algunas de ellas, una vez que estos animales son sometidos a algún tratamiento o son expuestos a algún patógeno o sustancia tóxica. Así, tenemos que por ejemplo; los eritrocitos de los ratones son más pequeños que el de otras especies, el número de reticulocitos es mayor, los porcentajes de linfocitos en sangre periférica y médula ósea son altos, la morfología de los leucocitos es variable, son bajos los conteos de neutrófilos en sangre periférica, además, de presentar hematopoyesis esplénica con almacenamiento de hierro, así como, que los eritrocitos y las plaquetas son de vida corta (O'Connell, K.E., *et al.*, 2015). A pesar de la información disponible, en relación a los valores de referencia de esta especie, se tienen que tomar en cuenta una serie de factores

que pueden variar los valores de una cepa a otra, aún en animales sanos. Por lo que, se sugiere que los valores de referencia se generen internamente en cualquier población experimental específica. Esto es importante, tanto para cepas mutantes como para cepas endogámicas, al momento de diseñar un experimento y utilizarlas como modelo en estudios biológicos específicos o la reproducción de enfermedades humanas (Kile, B.T., *et al.*, 2003; Nagarajan, P., *et al.*, 2012).

Los elementos sanguíneos presentes en la sangre, normalmente se dividen en: a) glóbulos rojos o eritrocitos, b) glóbulos blancos o leucocitos y c) las plaquetas. Los glóbulos rojos del ratón, normalmente miden entre 4 a 7 μm de diámetro, son esféricos y tienen una forma de disco bicóncavo, carecen de núcleo y tienen una palidez central. Su recuento total se estima entre 7,800 a 10,600 eritrocitos por microlitro (Provencher Bollinger, A., *et al.*, 2010). Los leucocitos por su parte, se dividen en células polimorfonucleares y células mononucleares. Dentro de las células polimorfonucleares, tenemos principalmente a los neutrófilos que son fagocitos circulantes y parte de sus funciones es la de modular la respuesta inmune, representan el 20 a 30% del total del conteo de células de la línea blanca. Miden entre 10 a 25 μm de diámetro y tienen en su citoplasma gránulos rosa pálidos, sus núcleos son segmentados y los hilos conectan los segmentos nucleares (Provencher Bollinger, A., *et al.*, 2010; Hedrich, H.J & Bullock, G., 2004). Los eosinófilos por su parte, representan del 0% al 7% del conteo total de células blancas, presentan un núcleo en forma de banda y a veces en forma de anillo, asimismo, presentan gránulos citoplasmáticos grandes, redondos y uniformes. Por otro

lado, los basófilos son raros de observar en sangre periférica, carecen de gránulos terciarios, sin embargo, tienen gránulos maduros, más grandes y menos numerosos, son de color púrpura y en ocasiones oscurecen al núcleo lobulado (Provencher Bollinger, A., et al., 2010). Con respecto a las células mononucleares, los monocitos representan del 0 al 2% del total del recuento de las células de la línea blanca, su citoplasma se tiñe de un color azul grisáceo, a menudo contiene vacuolas y en ocasiones exhibe gránulos acidófilos, sus núcleos son redondos, indentados o lobulares. En cuanto a los linfocitos, estas células representan del 70 al 80% del conteo total de los leucocitos. En animales jóvenes representan más del 80% del recuento total de leucocitos, sin embargo, conforme envejecen los animales estas células van disminuyendo y los neutrófilos van aumentando. Los ratones tienen linfocitos pequeños y grandes, los linfocitos pequeños muestran escaso citoplasma y núcleos excéntricos con cromatina borrosa, a diferencia de los linfocitos grandes, que tienen su citoplasma más extenso y su cromatina está punteada. En ocasiones, pueden observarse gránulos de color rosa brillante a magenta en el citoplasma de estos linfocitos (Provencher Bollinger, A., et al., 2010). Por otro lado, las plaquetas de los ratones tienen un diámetro de 1 a 4 μm y una vida útil de 4 a 5 días. Son redondas, ovales y a veces alargadas, su citoplasma se tiñe de gránulos angulares de color rosa a gris y azul muy intenso, cerca del centro de la célula. El recuento de plaquetas en el ratón es alto en comparación a otras especies domésticas, van de 900 a $1600 \times 10^3/\mu\text{L}$ (Provencher Bollinger, A., et al., 2010; Everds, N.E., 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales para Experimentación

Los ratones se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, de la línea genética Balb/c, con 6 semanas de edad, ambos sexos y un peso promedio de 22 gramos. Los ratones fueron alojados en un área aislada de la FMVZ de la UANL, en cajas de vinil y cubierta de rejilla de acero inoxidable con sus adaptadores para el agua y alimento, así como una cama de viruta de madera estéril. Todos los animales estuvieron libres de convivencia con otras especies y se les administró agua potable y alimento seco *ad libitum* Rodent Laboratory Chow 5001 (Nutrimix, Ciudad de México, México), cubriendo sus necesidades nutricionales diarias. Además se les proporcionó, un período de luz/oscuridad de 12 horas. Las condiciones antes descritas, estuvieron sustentadas en la Norma Oficial Mexicana, Especificaciones de la Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. (NOM-062-ZOO-1999) y la Aprobación del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, con Número de Registro 021-2019.

3.2. Modelo Experimental

Se manejó un período de 5 días para aclimatación de los ratones antes de la fase experimental. Se utilizaron en total 30 ratones, los cuales fueron distribuidos en 4 grupos (n=5), 3 de los grupos con diferentes tratamientos considerando la diferencia en los tiempos de tránsito intestinal siendo de 45, 60 y 120 minutos y su posterior sacrificio (Tamez-Treviño, E., *et al.*, 1996). Las

esporas que se utilizaron para su inoculación por vía oral, se obtuvieron por cultivo de células, el procedimiento será explicado más adelante. El último grupo de ratones, fue el control negativo, a los cuales se les realizó el mismo procedimiento de la inoculación por vía oral, en donde se le administró agua destilada, a diferentes tiempos de 45, 60 y 120 minutos y su posterior sacrificio. La tabla 1 muestra la distribución de los grupos para el diseño experimental.

GRUPOS	TIEMPOS	NUMERO DE ANIMALES	INÓCULO
1	45 minutos	5	$1 \times 10^6 / 500 \mu\text{l}$
2	60 minutos	5	$1 \times 10^6 / 500 \mu\text{l}$
3	120 minutos	5	$1 \times 10^6 / 500 \mu\text{l}$
Control	45 minutos 60 minutos 120 minutos	15	Agua destilada /500 μl

Tabla 1. Diseño experimental. Distribución de los grupos por tiempo y la cantidad de esporas administradas.

3.3. Preparación de las Esporas

La cepa de *E. cuniculi* utilizada en este estudio fue la (ATCC®50789MR) obtenida del American Type Cell Collection (ATCC, por sus siglas en inglés). Para su propagación, se utilizaron las células Vero E6 (ATCC®, CCL-81), debido a su eficiencia en la replicación de dichos microorganismos (Joseph, J &

Sharma, S., 2009). Las células se sembraron en cajas de cultivo celular ventiladas de 25 cm² (Corning, Nueva York, EUA), en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con suero fetal bovino al 5% inactivado (Corning, Inc), y la aplicación de soluciones antibióticas y antimicóticas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e incubadas a una temperatura de 37°C, con un 5% de CO₂ en una incubadora Forma Series II Water Jacket (Thermo Fisher, Ohio, EUA). (González-Machorro, J.R, *et al.*, 2019; Del Aguila, C., *et al.*, 1998).

3.3.1. Inoculación de las Esporas

El procedimiento para la propagación de las esporas, fue hecha en cajas de cultivo celular con un 50 al 60% de confluencia en la monocapa de células Vero E6 libre de contaminación, añadiendo 250 µl a una concentración de 6.0×10^7 esporas, sobre la monocapa celular para su internalización y desarrollo intracelular. Los cultivos se mantuvieron en DMEM suplementado con 4% de SFB (Sigma-Aldrich, EUA), en una atmósfera con 5% CO₂ a 37°C y cambiando de medio 2-3 veces por semana. El sobrenadante recuperado de cada cultivo infectado, se almacenó a 4°C hasta su uso. Se hicieron subcultivos infectados a partir del cultivo originalmente inoculado, una vez que éste alcanzara el 90% de confluencia, por medio de tripsina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) al 0.25%, de acuerdo con las instrucciones de la ATCC®. Los microorganismos se replicaron a la segunda semana post-infección, formándose vacuolas parasitóforas dentro del citoplasma de las células y que fueron observadas, a través de un

microscopio invertido Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). (González-Machorro, J.R, *et al.*, 2019).

3.3.2. Cosecha de las Esporas

Se llevó a cabo a partir de la tercer semana post-inoculación, o al revisar que los cultivos alcanzaran un índice de infección del 90-100%. Los cultivos infectados, fueron raspados con un scrapper celular (Corning, Nueva York, EUA), la suspensión celular se colectó y se homogeneizó en el medio de cultivo, luego se transfirió a un tubo Falcon® de 50 ml (Axygen Scientific, Nueva York, EUA) y se centrifugó a 1,500 x g por 10 minutos a 4°C en una centrífuga (Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Alemania). Se decantó el sobrenadante y se obtuvo un pellet que se resuspendió en 5 ml de cRPMI y se disgregó con una aguja de calibre 27 mm (Nanchang, Jiangxi, China) hacia un tubo de microcentrífuga (Eppendorf, Nueva York, EUA), tres veces se repitió el procedimiento para romper las membranas celulares, liberar las esporas y eliminar los restos celulares, al final el sedimento celular compuesto por esporas fue resuspendido en 1 ml de medio de cultivo cRPMI. (González-Machorro, J.R, *et al.*, 2019).

3.3.3. Conteo de las Esporas

Para llevar a cabo este proceso, se tomaron 10 µl del homogeneizado de las esporas colectadas en 1 ml de RPMI y se mezclaron con 190 µl de cRPMI, obteniéndose un factor de dilución de 1:20 a partir del concentrado obtenido y un volumen final de 200 µl. Posteriormente, con una micropipeta se

depositaron 10 μ l de la dilución en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Pensilvania, EUA), donde se colocó un cubreobjetos y por capilaridad se llenaron las cámaras. Luego, se observaron los cinco cuadros de la cuadrícula central bajo el objetivo de 100X de un microscopio de luz (Primo Star, Carl Zeiss, Göttingen, Alemania). El número de esporas se determinó mediante la siguiente fórmula: Número de esporas = $(\bar{X}) \times (0.25) \times (20) \times (1,000,000)$. Donde \bar{X} es el valor del promedio de los cinco cuadros contabilizados, el factor de dilución fue 20, valor obtenido de dividir el volumen final de la muestra entre el volumen inicial de la misma. La suspensión de esporas, se diluyó a una concentración de 1×10^6 esporas por 0.5 ml en PBS. Se prepararon alícuotas de 0.5 ml, identificadas con cepa, concentración y fecha de preparación y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

3.4. Animales con Administración de Esporas de *Encephalitozoon cuniculi*

Una vez que las esporas quedaron preparadas en las jeringas de 3 ml y a una temperatura de 37°C, se procedió a las inoculaciones en cada grupo experimental, administrando la cantidad de 500 μ l por animal, a través de la introducción de una sonda orogástrica hecha con un catéter de linfangiografía (Introcan® Certo, B. Braun, Germany). Después se dejaron descansar nuevamente en sus cajas de vinil, considerando el tiempo para cada grupo experimental, antes de su sacrificio y la posterior toma de muestras para realizar los frotis sanguíneos, los estudios de histopatología y de histoquímica (Figura 4).

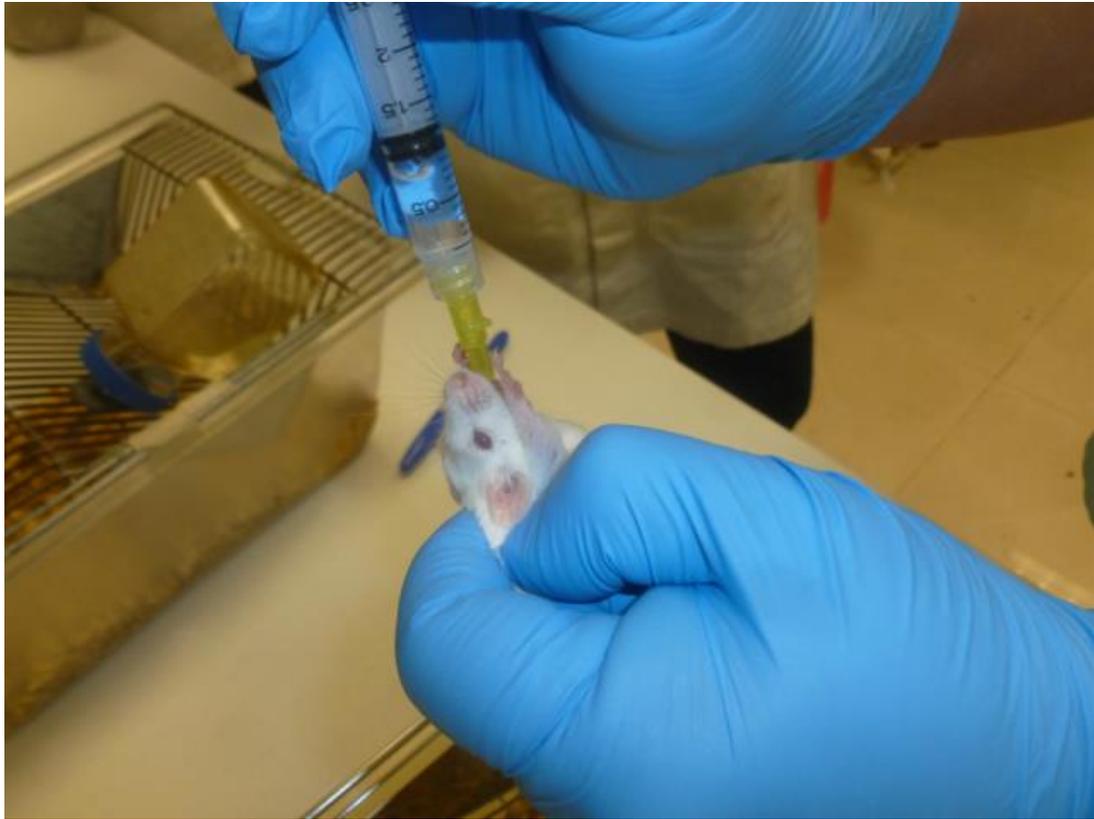


Figura 4. Inoculación de esporas de *Encephalitozoon cuniculi* por vía orogástrica en ratón Balb/c.

3.5. Animales Control

Se les administró bajo el mismo procedimiento de los animales tratados agua destilada, en una cantidad de 500 μ l por animal.

3.6. Sedación y Eutanasia

Se procedió al sacrificio de los animales por desnucamiento previa sedación, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana, Especificaciones de la Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. (NOM-062-ZOO-1999). El procedimiento de sedación y eutanasia fue con una

combinación de Tiletamina+Zolazepam (Zoletil[®]100, Virbac, Francia) a una dosis de 50-80 mg/Kg/IP (West, G., *et al.*, 2007).

3.7. Extracción de Sangre

Se extrajeron muestras de sangre a través de una punción hecha en el ventrículo derecho del corazón, utilizando una aguja de venoclisis del número 22 con su manguera (Introcan[®] Certo, B. Braun, Germany), previa lubricación con EDTA, después se procedió a depositar la sangre en tubos BD Microtainer[®] con anticoagulante EDTA, para realizar los frotis sanguíneos, realizándolos por quintuplicado y dejándolos secar al aire, para después fijarlos en metanol absoluto (CTR Scientific, México), por 10 minutos y teñirlos con la tinción de Gram, Azul de Tricromo, Romanowsky y Calcoflúor-White (Figuras. 5a y b).

3.8. Análisis Estadístico

Para el estudio comparativo, de las diferentes tinciones utilizadas en la detección de esporas, así como, de las diferentes células involucradas en la captura y procesamiento de estos microorganismos, se utilizará la prueba estadística de ANOVA con $P < 0.05$ de confianza, mediante el uso del Software Statistical Package for the Social Sciences (IBM[®] SPSS[®] Statistics 21, EUA) para análisis estadísticos. El conteo de cada laminilla fué de 25 campos, con el ocular de 100X (Carl Zeiss, Germany).

3.9. Estudio Piloto

Previamente se realizó un estudio piloto, en el cual se estandarizaron las técnicas utilizadas en este proyecto, así como, reforzar los puntos críticos que el estudio requería, para disminuir al máximo el grado de error que se pudiese presentar al momento de ejecutar este experimento.

En base a las recomendaciones atendidas en cada fase del estudio, se lograron obtener los resultados esperados, como fueron: 1) Describir los cambios observados en las diferentes porciones del tracto digestivo, coleccionar y conservar las muestras obtenidas en formol al 10% bufferado, para su posterior procesamiento histopatológico. 2) Realizar las diferentes histoquímicas que nos permitieran evidenciar la presencia de las esporas en las diferentes porciones del tracto digestivo de los ratones inoculados *per-os*, así como, la actividad de las células involucradas en el proceso de captación y procesamiento de las mismas, los cambios dinámicos que este microorganismo implementa con la finalidad de instalarse en las células huésped del aparato digestivo, además, de describir la versatilidad que este patógeno tiene para poderse diseminar, a través, de las diferentes capas que componen al epitelio del tracto digestivo, hasta encontrarse en la periferia y dentro de los vasos sanguíneos, diseminándose por el torrente sanguíneo al resto de los órganos, todo esto a través, de la descripción histopatológica. 3) Recolectar sangre en cantidad suficiente para realizar los frotis sanguíneos, en busca de esporas, así como, describir la morfología de las células sanguíneas.

4. RESULTADOS

4.1. Estudio Anatomopatológico

El grupo de animales con 45 minutos, presentó distensión del duodeno y yeyuno, en íleon, ciego y recto, no se observaron cambios significativos. Los animales del grupo de 60 minutos; mostraron ligera distensión intestinal, así como ligera esplenomegalia. Mientras que los animales del grupo de 120 minutos, fueron observados con una distensión intestinal discreta difusa. Los animales controles, a los que solo se les administró agua destilada, no presentaron cambios patológicos aparentes.

4.2. Toma y Envío de Muestras

Se llevó a cabo la toma de muestras, colocando los diferentes tejidos en un recipiente con 100 ml de PBS, esto con la finalidad de evitar su deshidratación y conservar el pH neutro de las mismas. Se tomaron diferentes porciones de estómago (regiones cardial, fúndica y pilórica), así como los diferentes segmentos intestinales, duodeno, yeyuno e íleon (Tizard, I.R., 2013; Lefrançois, L & Lycke, N., 2001; Sheridan, B.S & Lefrançois, L., 2012), además del colon, ciego y el recto (Figura. 5c). Asimismo, se tomaron muestras del hígado, cerebro y riñones. Todas las muestras se colocaron en formol al 10% bufferado en PBS para el estudio histopatológico. Una vez fijadas las muestras, se procesaron para la técnica de embebido en parafina, realizando cortes a 4 micras para llevar a cabo la tinción de rutina de hematoxilina y eosina, Gram, Azul de Tricromo y la de Calcoflúor-White (Figura. 5d). Cabe mencionar que las laminillas utilizadas en estas tinciones, fueron previamente tratadas con Poli L-

lisina (Sigma, USA), debido a los tiempos de incubación en que los tejidos iban a estar, así como a los compuestos corrosivos a los que iban a estar expuestos, como es el caso del hidróxido de potasio al 10%, utilizado en la técnica de Calcoflúor-white.

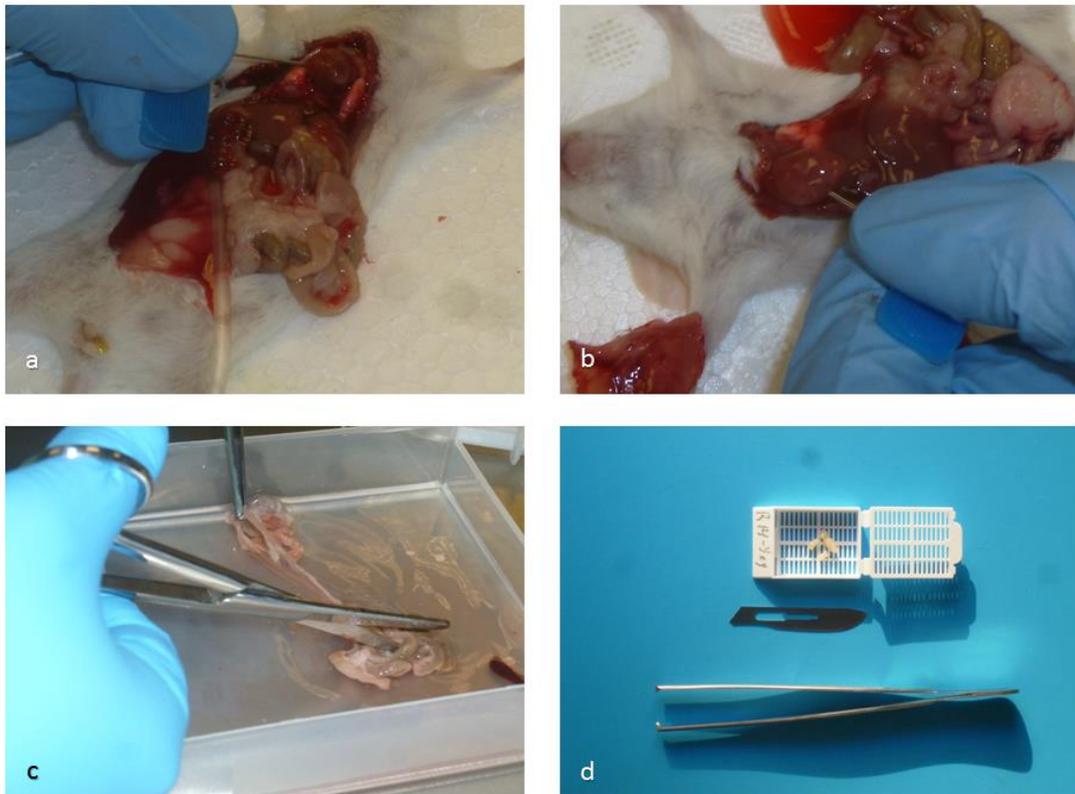


Figura 5. Toma y Procesamiento de Muestras. a y b) Extracción de sangre por punción intracardiaca, c) Obtención de muestras del tracto gastrointestinal y d) Colección de muestras para estudio anatomopatológico del ratón.

4.3. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (45 minutos).

4.3.1. Estómago (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se observaron a nivel de la mucosa gástrica numerosas esporas de *E. cuniculi*, algunas mostrando la vacuola posterior y otras exhibiendo el tubo polar (Figura 6a). La mayoría de las esporas se encontraron en el borde apical del epitelio gástrico, algunas más, en las dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos (Figura 6b). Cabe mencionar, que se apreció un infiltrado inflamatorio de tipo linfoplasmocitario, así como la presencia de numerosos macrófagos intraepiteliales con esporas en su interior (Figura 6c). Por otro lado, se observó la formación de incipientes vacuolas parasitóforas, que estaban en el citoplasma de las células epiteliales glandulares (Figura 6d). Asimismo, se apreciaron esporas de *E. cuniculi* en células dendríticas e infiltrado linfoplasmocitario en lámina propia y también dentro de vasos sanguíneos. (Figuras 6e y f).

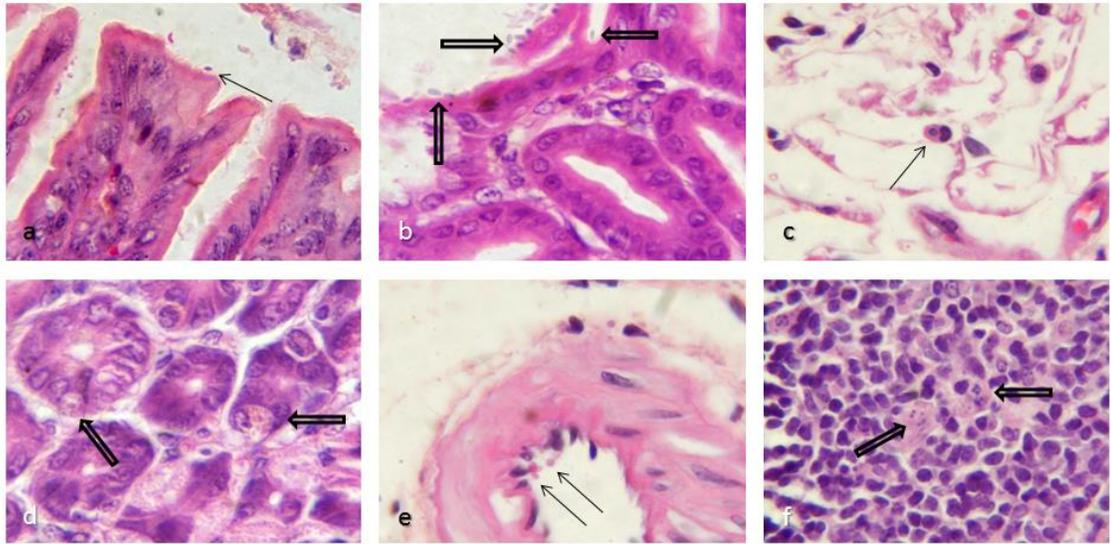


Figura 6. Estómago. (a) Presencia de una espora de *E. cuniculi* en borde epitelial y liberando el tubo polar (Ver flecha). b). Esporas de *E. cuniculi* en el interior de los pliegues gástricos (Ver flechas huecas). c) Macrófago subepitelial con espora fagocitada. (Ver flecha). d) Presencia de incipientes vacuolas parasitóforas en células glandulares. (Ver flechas huecas). e) Esporas de *E. cuniculi* dentro de vasos sanguíneos. (Ver flechas). f) Esporas de *E. cuniculi* en células dendríticas e infiltrado linfoplasmocitario en lámina propia. (Ver flechas huecas). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.3.2. Estómago (Tinción de Azul de Tricromo):

Se apreciaron esporas de *E. cuniculi* de diferentes tamaños y color rojo magenta en la superficie de la mucosa gástrica, algunas exhibieron su vacuola posterior y otras presentaron poca afinidad tintorial. La mayoría se encontró en el borde del epitelio gástrico y algunas dentro de las dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos (Figura 7a). Otras más, vía endocitosis se internaron a los pliegues gástricos y por fagocitosis por parte de algunos macrófagos intraepiteliales (Figuras 7b y c). Por otro lado, se apreció la formación de incipientes vacuolas parasitóforas, dentro del citoplasma de las células epiteliales glandulares (Figura 7d).

Además, se observaron algunas esporas dentro de vasos sanguíneos y rodeados de eritrocitos (Figuras 7e y f).

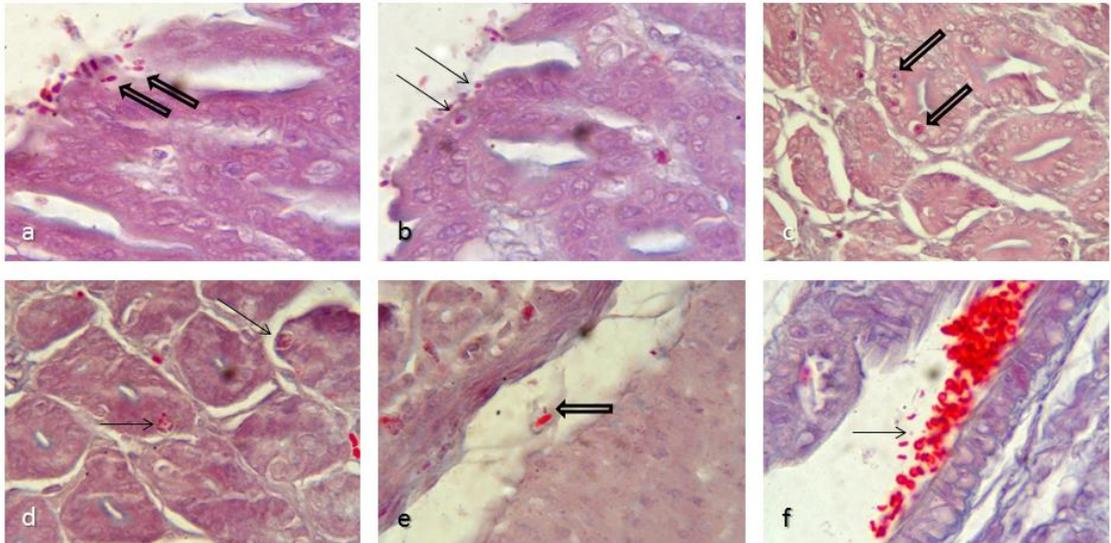


Figura 7. Estómago. a) Esporas de *E. cuniculi* iniciando ingreso hacia el interior del epitelio gástrico (Ver flechas huecas). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando internación epitelial al parecer por endocitosis. (Ver flechas). c) Macrófago subepitelial con espora fagocitada y espora en epitelio glandular. (Ver flechas huecas). d) Presencia de incipientes vacuolas parasitóforas en células glandulares. (Ver flechas). e) Esporas de *E. cuniculi* dentro de vasos sanguíneos. (Ver flecha hueca). f) Espora de *E. cuniculi* dentro de vaso sanguíneo rodeado de numerosos eritrocitos. (Ver flecha). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.3.3. Estómago (Tinción de Gram):

En la superficie de la mucosa gástrica, se observaron numerosas esporas de *E. cuniculi* con diferentes tamaños, unas con coloración negra y otras de color amarillo tenue, además, otras mostraron sus vacuolas posteriores (Figura 8a). Algunas de ellas, se apreciaron al interior de los pliegues gástricos, a través de endocitosis y por fagocitosis, por parte de numerosos macrófagos intraepiteliales (Figuras 8b y c). Por otro lado, se apreció reactividad de linfocitos intraepiteliales, además, de la formación de incipientes vacuolas

parasitóforas, las cuales se encontraron en el citoplasma de las células epiteliales glandulares (Figura 8d). Asimismo, se apreciaron esporas dentro de vasos sanguíneos, rodeados de numerosos eritrocitos y otras, en uniones interepiteliales (Figuras 8e y f).

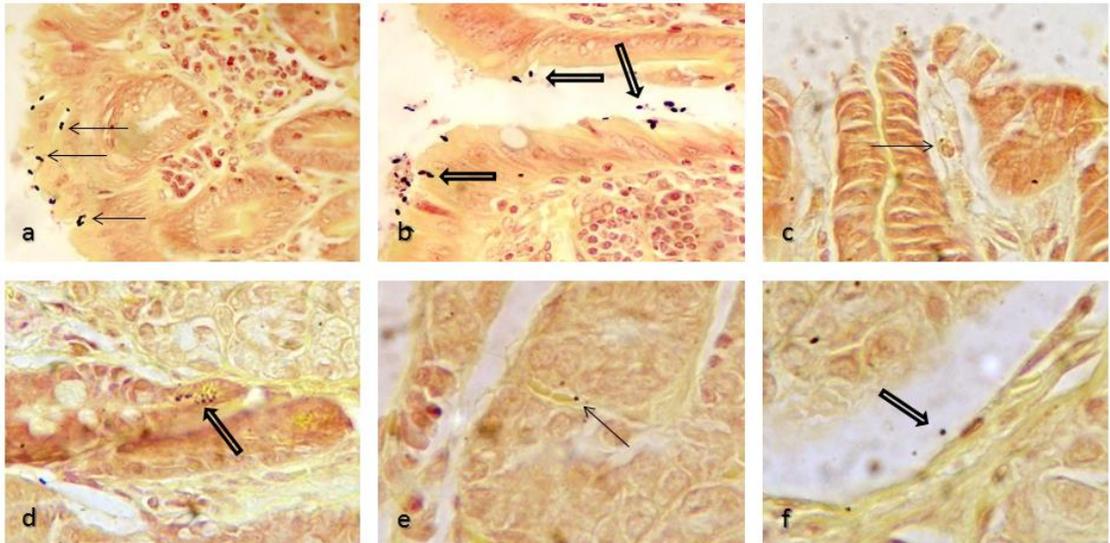


Figura 8. Estómago. a) Esporas de *E. cuniculi* dispuestas en el borde epitelial del estómago (Ver flechas). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando internación a epitelio gástrico por endocitosis. (Ver flechas huecas). c) Macrófago subepitelial con espora fagocitada e iniciando ingreso a través de vaso quilífero. (Ver flecha). d) Presencia de incipientes vacuolas parasitóforas en células glandulares. (Ver flecha hueca). e) Espora de *E. cuniculi* dentro de vaso sanguíneo. (Ver flecha). f) Espora de *E. cuniculi* libre con presencia interepitelial. (Ver flecha hueca). Tinción de Gram. 100X.

4.4. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (60 minutos).

4.4.1. Estómago (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se apreció a nivel de la mucosa gástrica, a esporas de *E. cuniculi* con diferentes tamaños y posiciones (Figuras 9a y b), algunas expusieron su vacuola posterior y otras exhibieron su tubo polar, el cual lo dirigieron hacia el interior del citoplasma de las células epiteliales (Figura 9c). Por otro lado, algunas esporas se encontraron sobre el borde apical del epitelio gástrico y otras, vía endocitosis, empezaron a internarse. Además, también se apreciaron en dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos. (Figura 9d). Cabe mencionar, que se apreciaron algunos macrófagos intraepiteliales muy cerca de dichas esporas (Figura 9e). También, se observaron incipientes vacuolas parasitóforas en epitelio glandular, así como, esporas libres dentro de los conductos de las mismas células glandulares. Por otro lado, se encontraron numerosos eosinófilos, algunos al parecer fagocitando esporas. (Figura 9f).

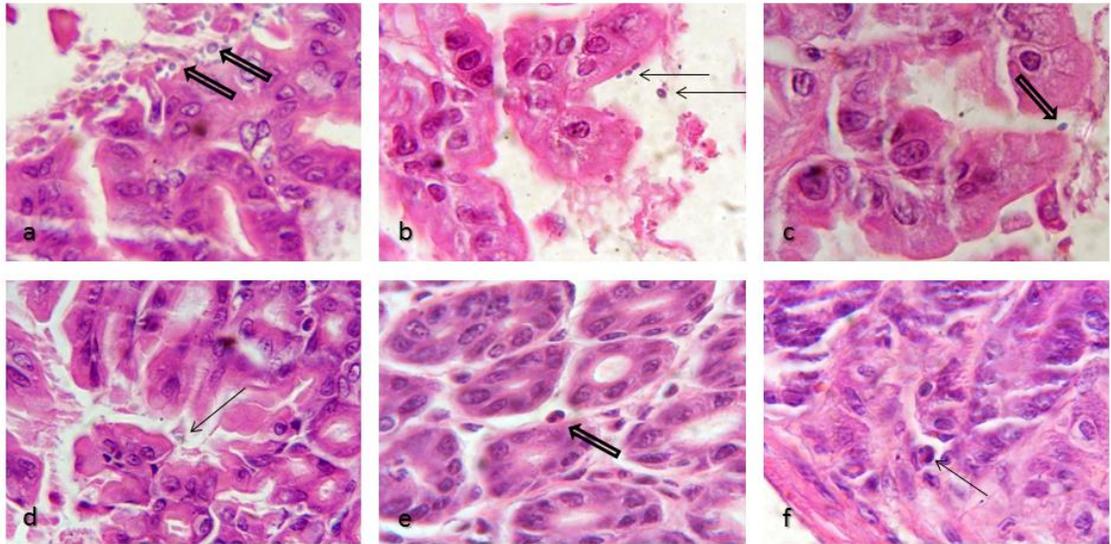


Figura 9. Estómago. a y b) Esporas de *E. cuniculi* en el borde del epitelio gástrico (Ver flechas huecas y flechas, respectivamente). c) Espora de *E. cuniculi* exhibiendo lo que parece ser su tubo polar. (Ver flecha hueca). d) Espora internándose hacia la parte inferior a través de dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos. (Ver flecha). e) Espora de *E. cuniculi* siendo fagocitada por un macrófago inter-epitelial. (Ver flecha hueca). f) Espora de *E. cuniculi* fagocitada por un eosinófilo. (Ver flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.4.2. Estómago (Tinción de Azul de Tricromo):

En la mucosa gástrica, se observaron esporas de *E. cuniculi* exponiendo sus vacuolas posteriores y presentando, diferentes tamaños y posiciones. Numerosas esporas se encontraron en el borde apical del epitelio gástrico, otras empezaron a internarse, a través de las dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos, vía endocitosis y se dirigieron hacia los vasos quilíferos (Figuras 10a y b). Otras se internaron, a través, de la fagocitosis por macrófagos subepiteliales (Figura 10c). Algunas exhibieron su tubo polar, el cual lo dirigieron hacia el interior del citoplasma de las células epiteliales. Asimismo, se apreciaron incipientes vacuolas parasitóforas en epitelio glandular y otras dentro de sus conductos (Figuras 10d y e), además, se

observaron a numerosos macrófagos intraepiteliales con esporas en su interior (Figura 10f).

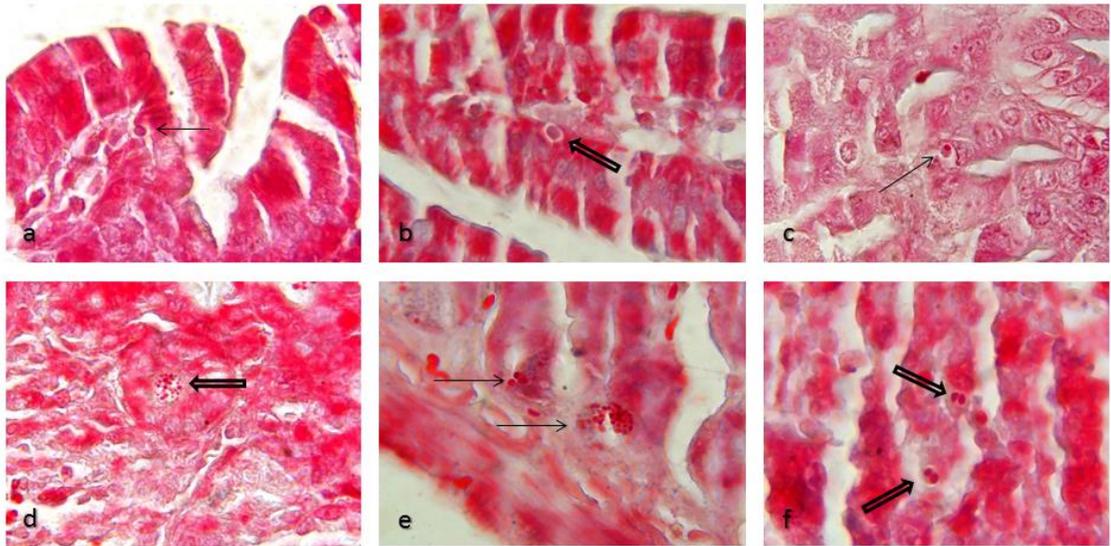


Figura 10. Estómago. a) Espora de *E. cuniculi* alrededor de un vaso quilífero. (Ver flechas). b) Espora de *E. cuniculi* iniciando internación a epitelio gástrico por endocitosis. (Ver flechas huecas). c) Macrófago subepitelial con espora fagocitada. (Ver flecha). d y e) Presencia de incipientes vacuolas parasitóforas en células glandulares. (Ver flecha hueca y flechas, respectivamente). f) Esporas de *E. cuniculi* dentro de macrófagos intraepiteliales. (Ver flechas huecas). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.4.3. Estómago (Tinción de Gram):

Se observó en mucosa gástrica, a numerosas esporas de *E. cuniculi* con diferentes tamaños y grados de maduración (Figura 11a). La mayoría se encontró, sobre el borde apical del epitelio gástrico, algunas más, se empezaron a internar, vía endocitosis (Figura 11b), mientras que otras, lo hicieron, a través, de las dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos. Por otro lado, se apreciaron a algunos macrófagos intraepiteliales alrededor de dichas esporas (Figura 11c). A nivel del citoplasma

de las glándulas mucosas, se observaron numerosas vacuolas parasitóforas incipientes, así como, esporas dentro de los conductos de dichas glándulas (Figuras 11d, e y f). Por otra parte, numerosas esporas en diferentes fases de replicación, fueron observadas en los vasos quilíferos y en los espacios intersticiales hasta la base del epitelio.

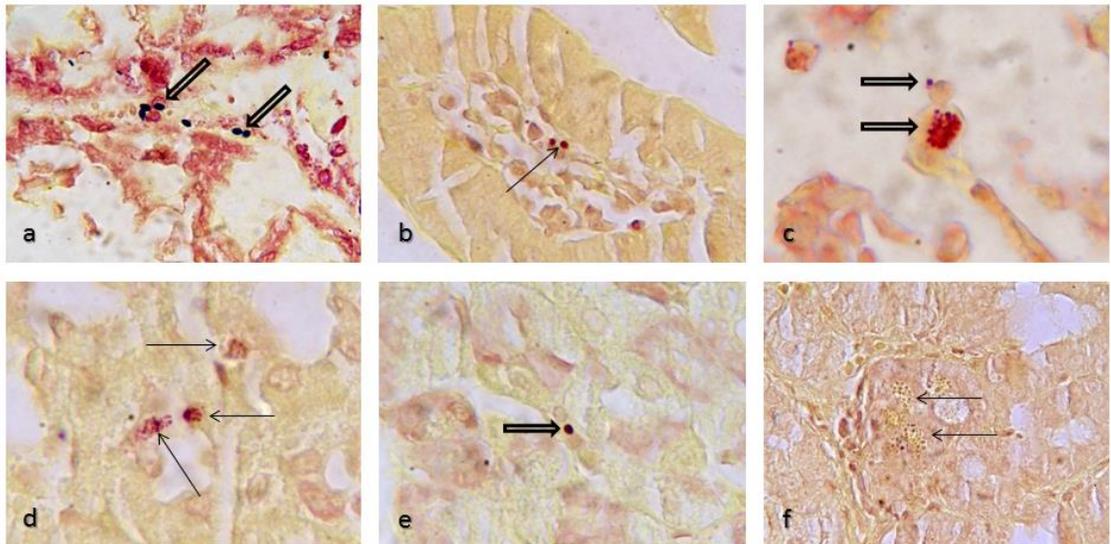


Figura 11. Estómago. a) Esporas maduras (negro) e inmaduras (amarillo) de *E. cuniculi* presentes en el borde epitelial del estómago (Ver flechas huecas). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través de vasos quilíferos. (Ver flecha). c) Macrófago intraepitelial captando a espora y formación de incipiente vacuola parasitófora. (Ver flechas huecas). d) Presencia de incipientes vacuolas parasitóforas en células glandulares. (Ver flecha hueca). e) Espora de *E. cuniculi* libre ingresando al interior del epitelio. (Ver flecha). f) Presencia de incipientes vacuolas parasitóforas en epitelio glandular. (Ver flechas). Tinción de Gram. 100X.

4.5. Alteraciones Celulares Observadas en Estómago de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (120 minutos).

4.5.1. Estómago (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se apreciaron a nivel de la mucosa gástrica a esporas de *E. cuniculi* de diferentes tamaños y posiciones. La mayoría de las esporas, se encontraba sobre el borde apical del epitelio gástrico, otras empezaron a internarse, a través de dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos (Figuras 12a y b). Algunas de ellas, estaban dentro de vacuolas parasitóforas en el interior del citoplasma de las células epiteliales (Figuras 12c y d). Y otras se encontraron en el interior de los conductos de numerosas glándulas (Figura 12e). Cabe mencionar, que se observaron algunos macrófagos intraepiteliales alrededor de dichas esporas. Por otro lado, también se encontraron a numerosas esporas libres en región interepitelial, así como la presencia de numerosos eosinófilos (Figura 12f).

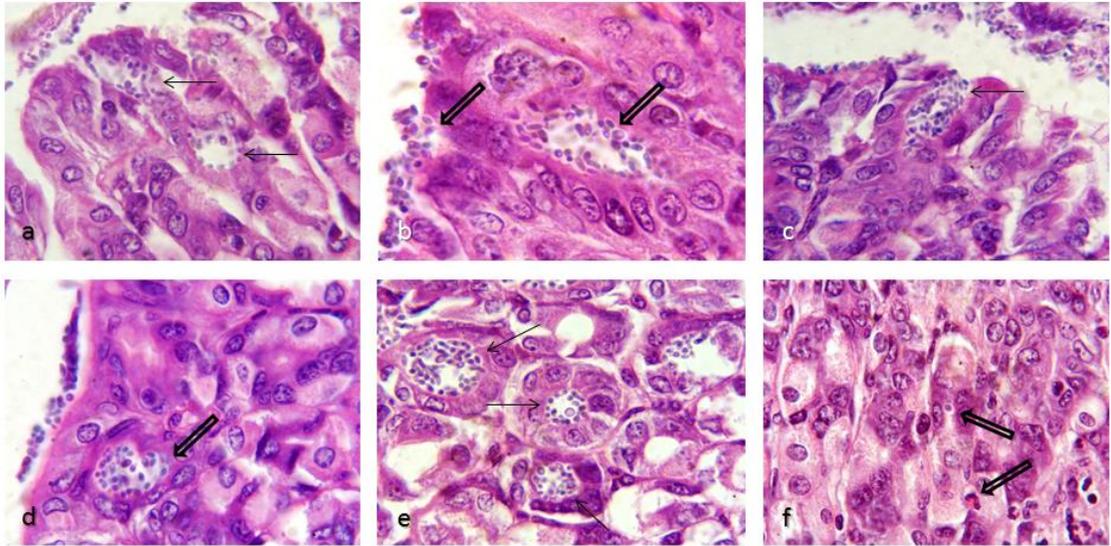


Figura 12. Estómago. a) Esporas maduras e inmaduras de *E. cuniculi* presentes en el borde epitelial del estómago e ingreso a su interior (Ver flechas). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando internamiento y formación de vacuolas parasitóforas. (Ver flechas huecas). c) Formación de vacuola parasitófora. (Ver flecha). d) Presencia de vacuola parasitófora y macrófago interepitelial. (Ver flecha hueca). e) Esporas de *E. cuniculi* en interior de conductos glandulares. (Ver flechas). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* libre y dentro de un eosinófilo. (Ver flechas huecas). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.5.2. Estómago (Tinción de Azul de Tricromo):

Se apreciaron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, con diferentes tamaños y grado de madurez a nivel de la mucosa gástrica. La mayoría se encontró sobre el borde apical del epitelio gástrico, algunas más se empezaron a internar, a través, de dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos (Figura 13a). Otras esporas, se encontraron dentro de vacuolas parasitóforas, en el interior del citoplasma de las células epiteliales (Figuras 13b y c). Cabe mencionar, que se observaron a numerosos macrófagos intraepiteliales alrededor de dichas esporas, otros macrófagos se apreciaron en los vasos quilíferos, conteniendo esporas en su interior. Por otro lado, hubo numerosas esporas en espacios intersticiales, otras más, se

observaron en la base del epitelio gástrico y las que se encontraron en el interior de las células glandulares (Figuras 13d, e y f).

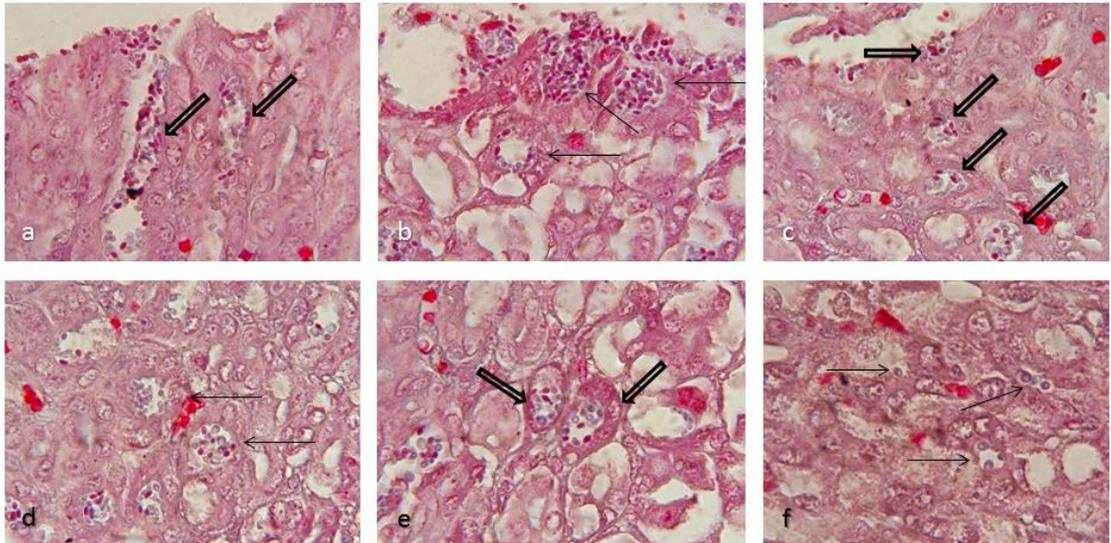


Figura 13. Estómago. a) Presencia de esporas maduras e inmaduras de *E. cuniculi*, en el borde epitelial del estómago (Ver flechas huecas). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando formación de vacuolas parasitóforas. (Ver flechas). c) Formación de vacuolas parasitóforas. (Ver flechas huecas). d) Esporas de *E. cuniculi* en interior de conductos glandulares. (Ver flechas). e) Esporas maduras e inmaduras de *E. cuniculi* en el interior de conductos glandulares. (Ver flechas huecas). f) Presencia de esporas libres de *E. cuniculi* internándose en espacios intersticiales. (Ver flechas). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.5.3. Estómago (Tinción de Gram):

En mucosa gástrica, se apreciaron numerosas esporas de *E. cuniculi* que presentaron diferentes tamaños y posiciones, la mayoría se encontraron en el borde apical del epitelio gástrico, algunas empezaron a internarse, a través de dilataciones citoplasmáticas o surcos inter-epiteliales de los pliegues gástricos (Figura 14a). Otras, se encontraron formando vacuolas parasitóforas en el citoplasma de las células epiteliales (Figuras 14b y c), otras más, se observaron

en los vasos quilíferos y en espacios intersticiales y conductos glandulares (Figuras 14d y e), asimismo, se observó a una gran cantidad de macrófagos intraepiteliales, rodeando a dichas esporas. Por otro lado, con esta tinción fue más evidente la presencia de las esporas alrededor de algunos capilares, en la base del epitelio gástrico (Figura 14f).

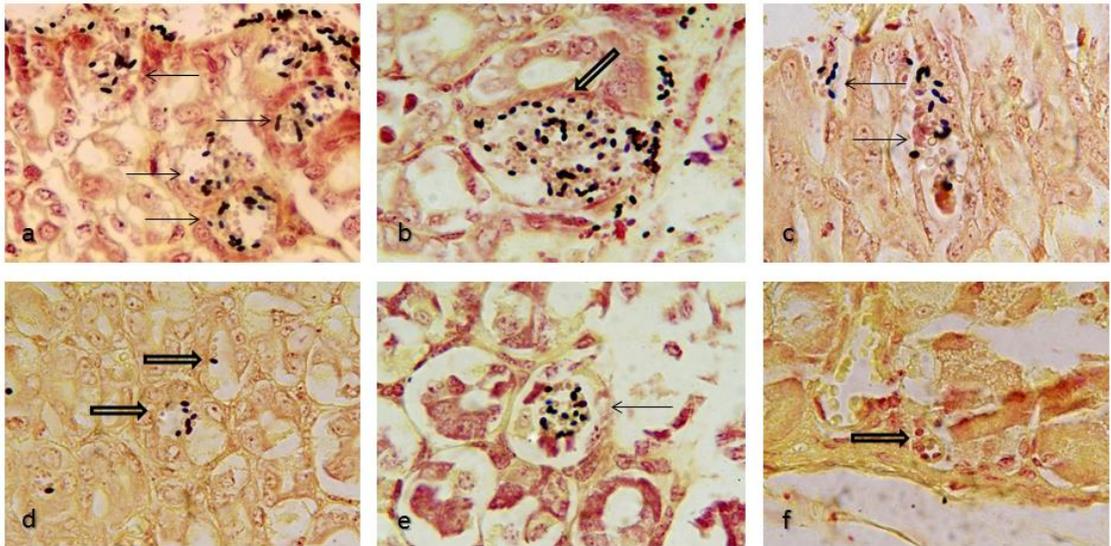


Figura 14. Estómago. a) Presencia de esporas maduras e inmaduras de *E. cuniculi* en borde epitelial e internamiento a través de los surcos inter-epiteliales (Ver flechas). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando formación de vacuolas parasitóforas. (Ver flecha hueca). c) Formación de vacuolas parasitóforas. (Ver flechas). d) Presencia de esporas a través de conductos glandulares. (Ver flechas huecas). e) Esporas maduras e inmaduras de *E. cuniculi* en interior de conductos glandulares. (Ver flecha). f) Presencia de esporas libres de *E. cuniculi* alrededor de un capilar sanguíneo. (Ver flecha hueca). Tinción de Gram. 100X.

4.5.4. Estómago (Calcoflúor-white):

En mucosa gástrica, se apreciaron esporas en el interior de los conductos glandulares (Figura 15a).

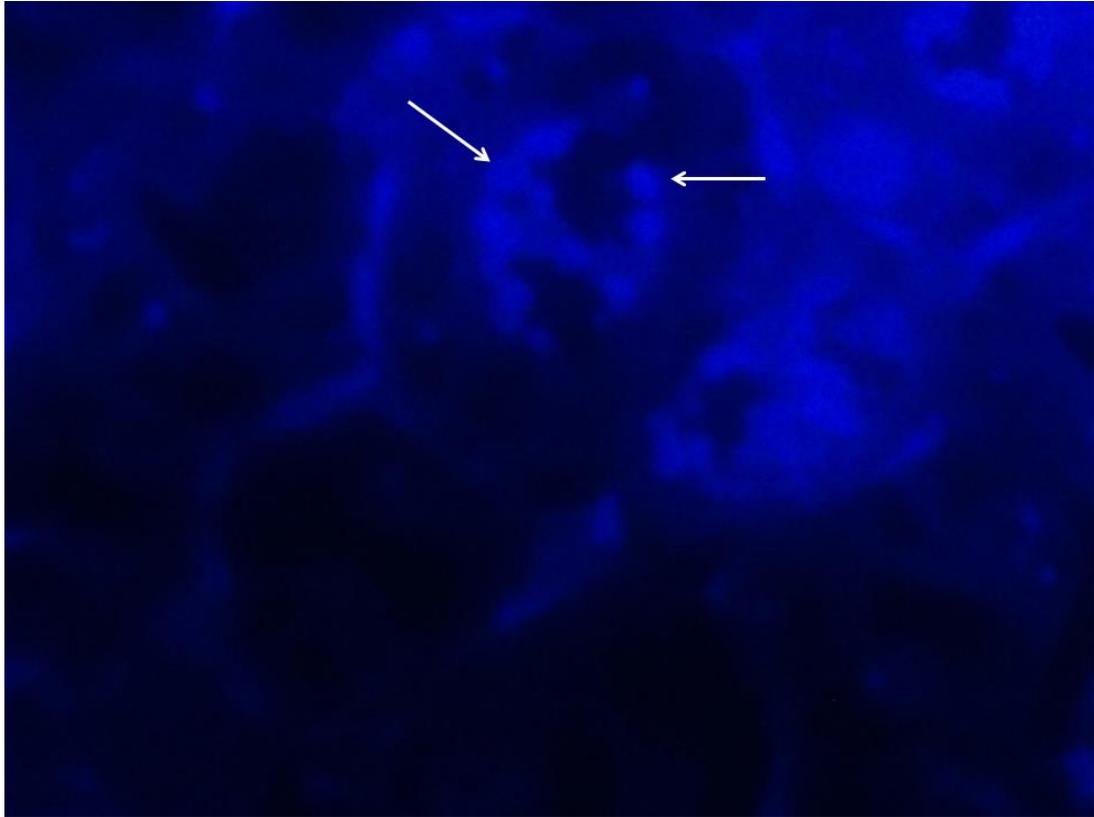


Figura 15. Estómago. a) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* en el interior de conductos glandulares. (Ver flechas). Calcoflúor-white. 100X.

Esquema de Distribución de Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* y Hallazgos Celulares en Epitelio Gástrico de Ratones Balb/c

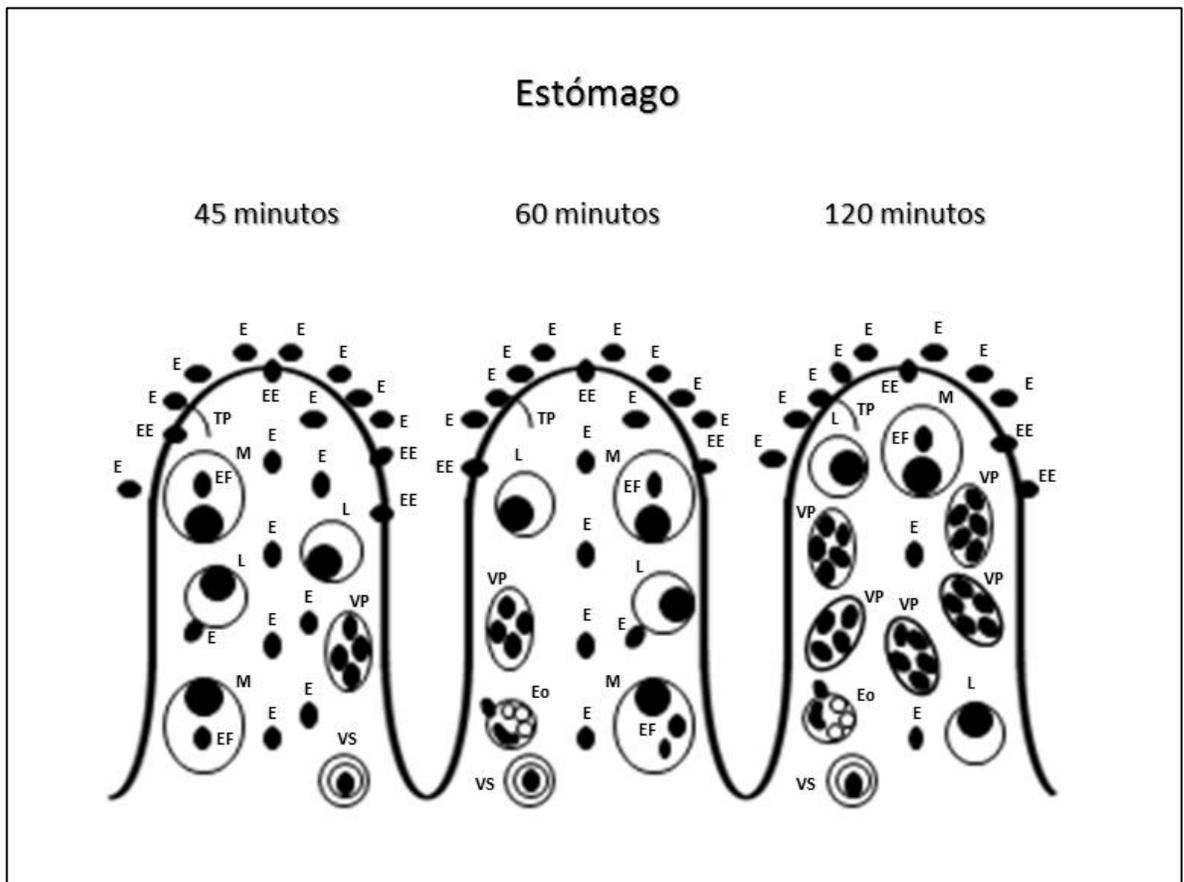


Figura 16. E) Esporas maduras alrededor del epitelio gástrico, libres en región de los vasos quilíferos, así como espacios intersticiales, EE) Espora ingresando por endocitosis, al interior del epitelio gástrico, M) Macrófago con esporas en su interior, EF) Esporas fagocitadas, L) Linfocitos intraepiteliales, VP) Vacuolas parasitóforas, TP) Tubo polar, VS) Vasos sanguíneos con esporas en su interior.

4.6. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (45 minutos).

4.6.1. Duodeno (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se observaron escasas esporas de *E. cuniculi* sobre el borde epitelial de la mucosa duodenal y exhibieron diferentes tamaños y morfología (Figura 17a). Algunas se internaron hacia las porciones basales del epitelio cilíndrico simple, vía endocitosis y otras se apreciaron en los vasos quilíferos (Figura 17b). Otro mecanismo observado fué la fagocitosis, por medio de macrófagos intraepiteliales, además de la formación de vacuolas parasitóforas incipientes. Otras exhibieron la liberación de su tubo polar (Figura 17c). Asimismo, se apreciaron esporas alrededor de algunos vasos sanguíneos y rodeadas de numerosos eosinófilos, algunas de ellas se encontraron en su citoplasma y otras, siendo transportadas hasta la porción de la lámina propia del epitelio (Figuras 17d, e y f).

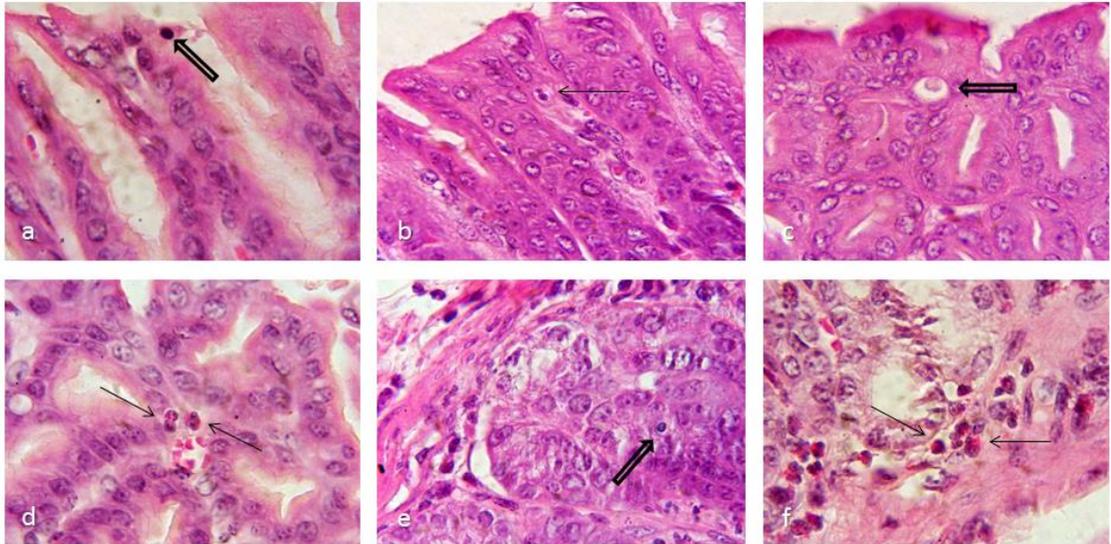


Figura 17. Duodeno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en borde epitelial del duodeno (Ver flecha hueca). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando internamiento al parecer por endocitosis y dirigiéndose a vaso quilífero. (Ver flecha). c) Espora de *E. cuniculi* dentro de epitelio duodenal y al parecer liberando su tubo polar. (Ver flecha hueca). d) Esporas de *E. cuniculi* alrededor de vaso sanguíneo y rodeadas de eosinófilos. (Ver flechas). e) Espora madura libre dirigiéndose a la lámina propia. (Ver flecha hueca). f) Presencia de esporas libres de *E. cuniculi* en lámina propia y rodeadas de numerosos eosinófilos, algunas esporas se apreciaron en el citoplasma de algunos eosinófilos. (Ver flechas). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.6.2. Duodeno (Tinción de Azul de Tricromo):

Sobre la mucosa duodenal, se apreciaron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, que exhibían diferentes grados de maduración, tamaño y morfología (Figura 18a). Algunas de ellas, empezaron a internarse hacia las porciones basales del epitelio cilíndrico simple, vía endocitosis, otras por fagocitosis a través de macrófagos intraepiteliales, así como la formación de vacuolas parasitóforas incipientes (Figuras 18b, c y d). También, se apreciaron a numerosas esporas dentro de vasos sanguíneos rodeados de eritrocitos (Figuras 18e y f).

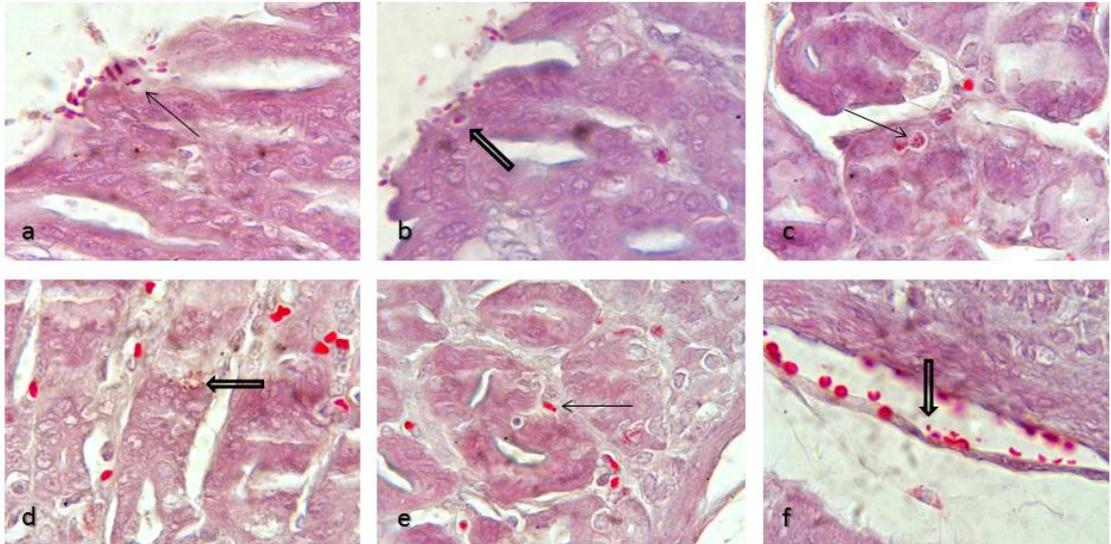


Figura 18. Duodeno. a) Presencia de varias esporas maduras de *E. cuniculi* en borde epitelial del duodeno (Ver flecha). b) Esporas de *E. cuniculi* iniciando ingreso al parecer por el proceso de endocitosis. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* dentro de epitelio duodenal. (Ver flecha). d) Vacuola parasitófora incipiente en epitelio duodenal. (Ver flecha hueca). e) Espora madura libre dentro de un vaso sanguíneo junto a eritrocitos. (Ver flecha). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* dentro de vaso sanguíneo rodeado de eritrocitos. (Ver flecha hueca). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.6.3. Duodeno (Tinción de Gram):

Se observaron a nivel de la mucosa duodenal, numerosos macrófagos intraepiteliales tratando de fagocitar esporas de *E. cuniculi*, algunas de ellas se encontraron en los vasos quilíferos (Figura 19a) y otras formando numerosas vacuolas parasitóforas (Figura 19b). Muchas de ellas, empezaron a internarse hacia las porciones basales del epitelio duodenal, a través de fagocitosis o migrando por las uniones interepiteliales e interglandulares (Figuras 19c, d y e). Otras, se apreciaron a través de los vasos quilíferos, así como dentro de algunos vasos sanguíneos acompañados de numerosos eritrocitos (Figura 19f).

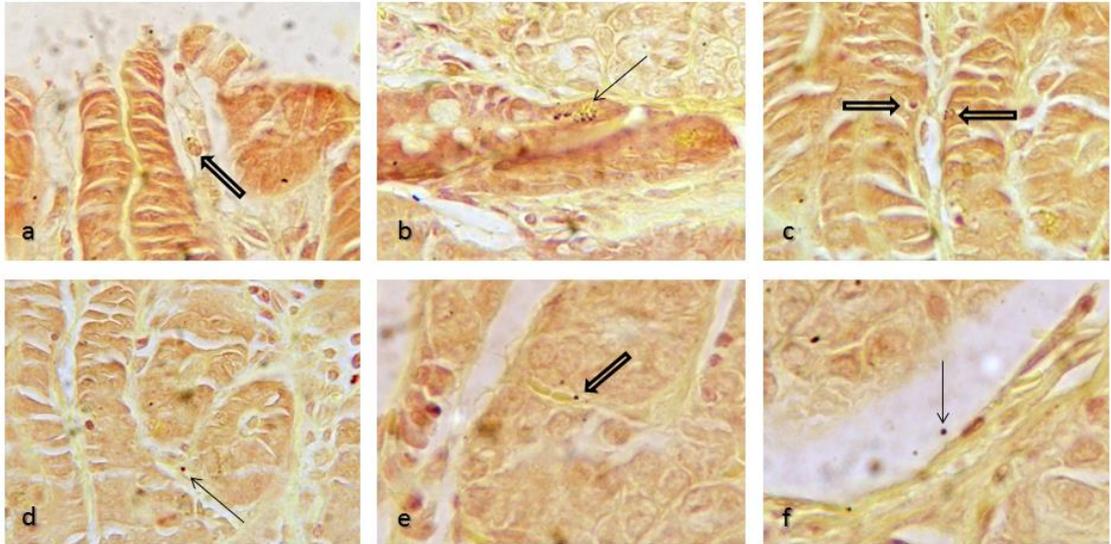


Figura 19. Duodeno. a) Presencia de varias esporas maduras de *E. cuniculi* en el interior del vaso quilífero del epitelio duodenal y marcada actividad de macrófagos intraepiteliales (Ver flecha hueca). b) Formación de incipientes vacuolas parasitóforas en epitelio del duodeno. (Ver flecha). c) Esporas de *E. cuniculi* en el interior del epitelio duodenal. (Ver flechas huecas). d y e) Presencia de esporas en unión interglandular y dentro de vaso sanguíneo rodeado de eritrocitos. (Ver flecha y flecha hueca, respectivamente). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* dentro de vaso sanguíneo. (Ver flecha). Tinción de Gram. 100X.

4.7. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (60 minutos).

4.7.1. Duodeno (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Sobre la mucosa del duodeno, se observaron a esporas de *E. cuniculi* exhibiendo diferentes grados de maduración, tamaño y morfología (Figura 20a). Algunas de ellas, empezaron a internarse hacia las porciones basales del epitelio cilíndrico simple, a través de su tubo polar. Otras, por fagocitosis por medio de macrófagos intraepiteliales, además, de endocitosis y presencia en los vasos quilíferos (Figura 20b). Por otro lado, se apreciaron escasas vacuolas parasitóforas en el epitelio de las células glandulares, así como la presencia de esporas, localizadas en los espacios intercelulares hasta la lámina propia (Figuras 20c, d y e). También, se encontraron una gran cantidad de eosinófilos, algunos se apreciaron alrededor de esporas en los vasos quilíferos y otros en la lámina propia del epitelio duodenal (Figuras 20f).

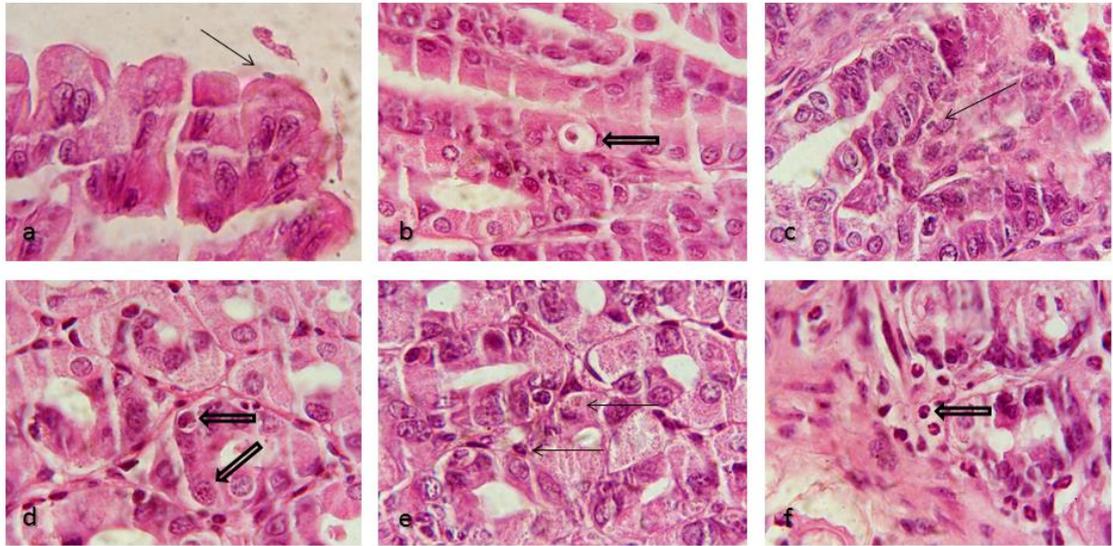


Figura 20. Duodeno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en borde del epitelio duodenal (Ver flecha). b) Espora de *E. cuniculi* fagocitada por un macrófago. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* madura libre en lámina propia del epitelio duodenal. (Ver flecha). d) Espora de *E. cuniculi* iniciando replicación en epitelio glandular y formación de una vacuola parasitófora incipiente. (Ver flechas huecas). e) Espora madura libre migrando a través de espacio interglandular y formación de incipiente vacuola parasitófora. (Ver flechas). f) Presencia de numerosos eosinófilos con espora capturada por uno de ellos en lámina propia del epitelio. (Ver flecha hueca). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.7.2. Duodeno (Tinción de Azul de Tricromo):

A nivel de la mucosa, numerosas esporas de *E. cuniculi* exhibieron diferente morfología y tamaño. Muchas de ellas, comenzaron a internarse por endocitosis y fagocitosis, por parte de macrófagos intraepiteliales y fueron observadas en los vasos quilíferos (Figuras 21a, b y c). Se apreció, la formación de vacuolas parasitóforas en el epitelio glandular de dicha porción intestinal, además de una intensa actividad fagocitaria por parte de los macrófagos intraepiteliales (Figuras 21d y e). Otras esporas se apreciaron en espacios intraepiteliales, vasos sanguíneos y en lámina propia del epitelio (Figura 21f).

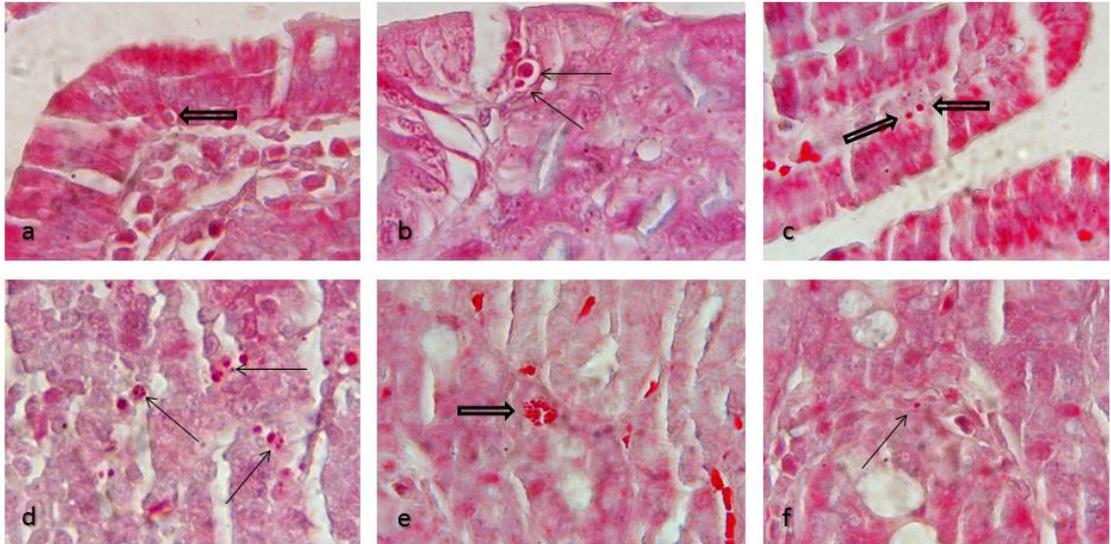


Figura 21. Duodeno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* iniciando penetración en el epitelio duodenal a través del fenómeno de endocitosis (Ver flecha hueca). b) Espora libre de *E. cuniculi* y macrófago intraepitelial fagocitando una espora. (Ver flechas). c) Esporas de *E. cuniculi* dentro de vaso quilífero en epitelio duodenal. (Ver flechas huecas). d) Presencia de numerosos macrófagos intraepiteliales e interglandulares fagocitando una gran cantidad de esporas de *E. cuniculi*. (Ver flechas). e) Presencia de una vacuola parasitófora en epitelio glandular. (Ver flecha hueca). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* dentro de vaso sanguíneo. (Ver flecha). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.7.3. Duodeno (Tinción de Gram):

Se observaron en los vasos quilíferos de la mucosa duodenal, a numerosos macrófagos intraepiteliales rodeando a esporas de *E. cuniculi* (Figuras 22a b y c). Algunas esporas, se observaron en las porciones basales del epitelio cilíndrico simple, otras se apreciaron siendo fagocitadas por parte de macrófagos intraepiteliales e interglandulares y algunas más se observaron en las uniones interepiteliales e interglandulares, además de los vasos quilíferos (Figuras 22d y e). Por otro lado, también se encontraron esporas de *E. cuniculi* en epitelio glandular (Figura 22f).

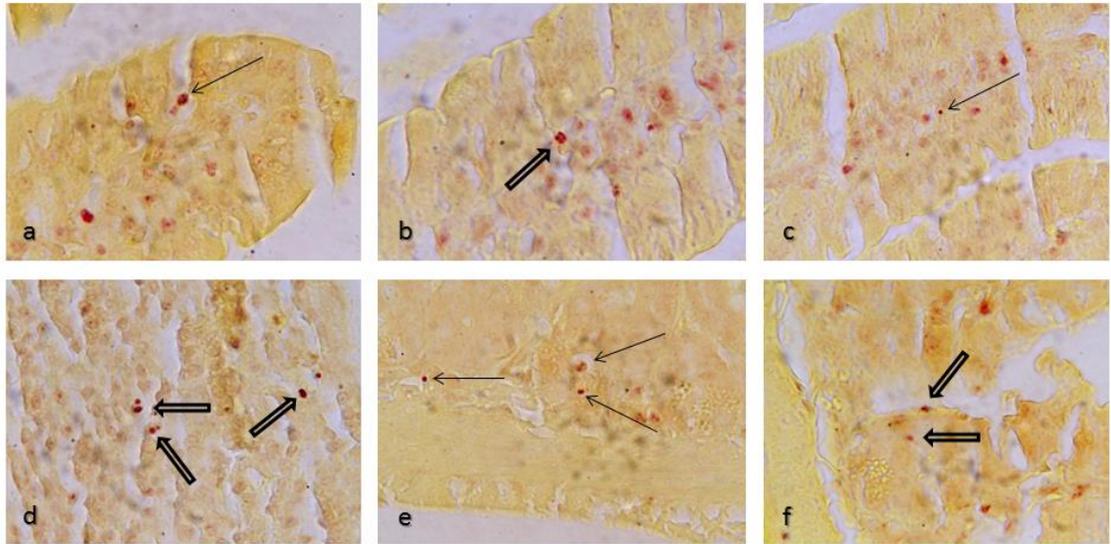


Figura 22. Duodeno. a) Presencia de un macrófago intraepitelial con espora de *E. cuniculi* en su interior en vaso quilífero del epitelio duodenal (Ver flecha). b y c) Esporas de *E. cuniculi* en el interior de vasos quilíferos de vellosidades duodenales (Ver flecha hueca y flecha respectivamente). d) Presencia de algunos macrófagos intraepiteliales e intraglandulares fagocitando a numerosas esporas de *E. cuniculi* y esporas libres. (Ver flechas huecas). e) Presencia de esporas en uniones interglandulares y dentro de macrófagos. (Ver flechas). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* en epitelio glandular. (Ver flechas huecas). Tinción de Gram. 100X.

4.7.4. Duodeno (Calcoflúor-white):

En mucosa gástrica, se apreciaron esporas maduras de *E. cuniculi*, en el borde de la vellosidad intestinal y el interior de los vasos quilíferos. (Figura 23a).

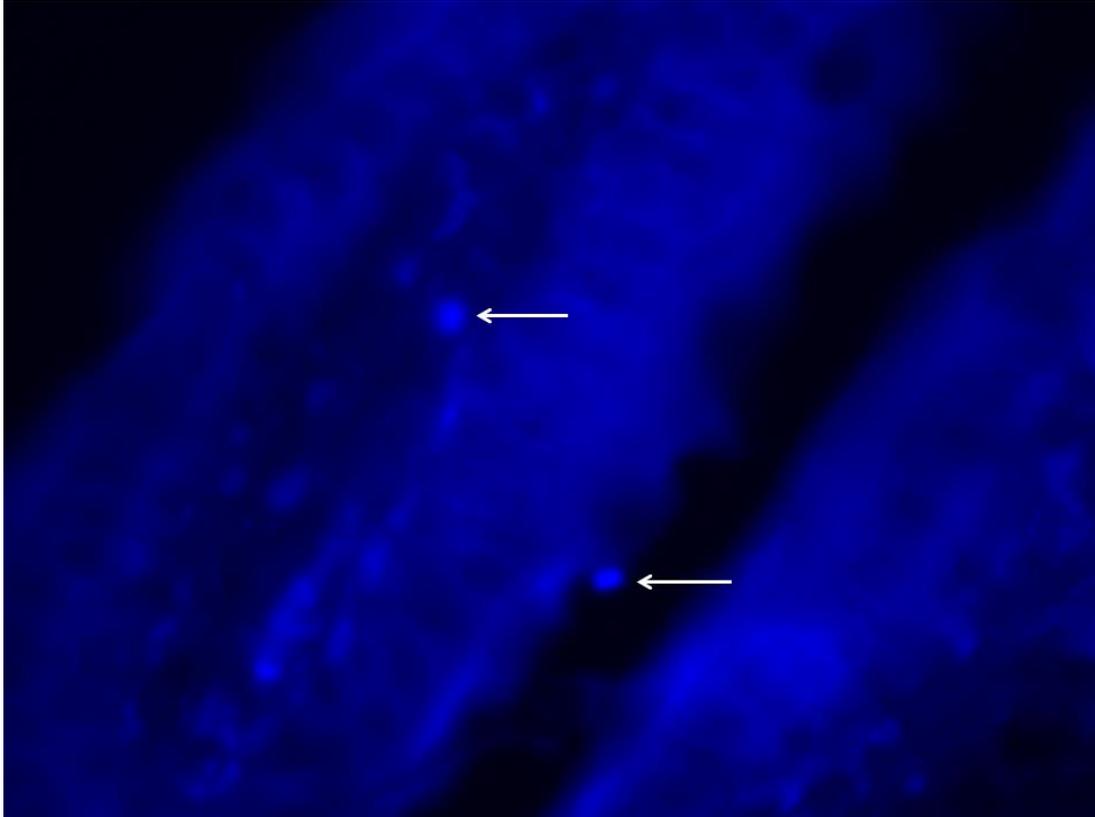


Figura 23. Duodeno. a) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* en el borde de la vellosidad intestinal e interior de los vasos quilíferos. (Ver flechas). Calcoflúor-white. 100X.

4.8. Alteraciones Celulares Observadas en Duodeno de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (120 minutos).

4.8.1. Duodeno (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Sobre la mucosa del duodeno se apreciaron escasas esporas de *E. cuniculi*, las cuales presentaron diferentes tamaños y morfología, algunas están alargadas, y otras ovaladas. Muchas de ellas, empezaron a internarse a través de endocitosis y otras se apreciaron siendo capturadas por numerosos macrófagos intraepiteliales, los cuales se observaron con marcada actividad fagocitaria y transportándolas hacia los vasos quilíferos (Figuras 24a y b). A nivel de las uniones interepiteliales e interglandulares, se encontraron a otras esporas maduras siguiendo la ruta hacia las porciones basales del epitelio cilíndrico simple (Figuras 24c y d). Por otro lado, también se observó la formación de incipientes vacuolas parasitóforas en el interior del epitelio glandular del duodeno y algunas esporas libres (Figuras 24e y f). Cabe mencionar, que la presencia de eosinófilos en esta porción intestinal, es nula.

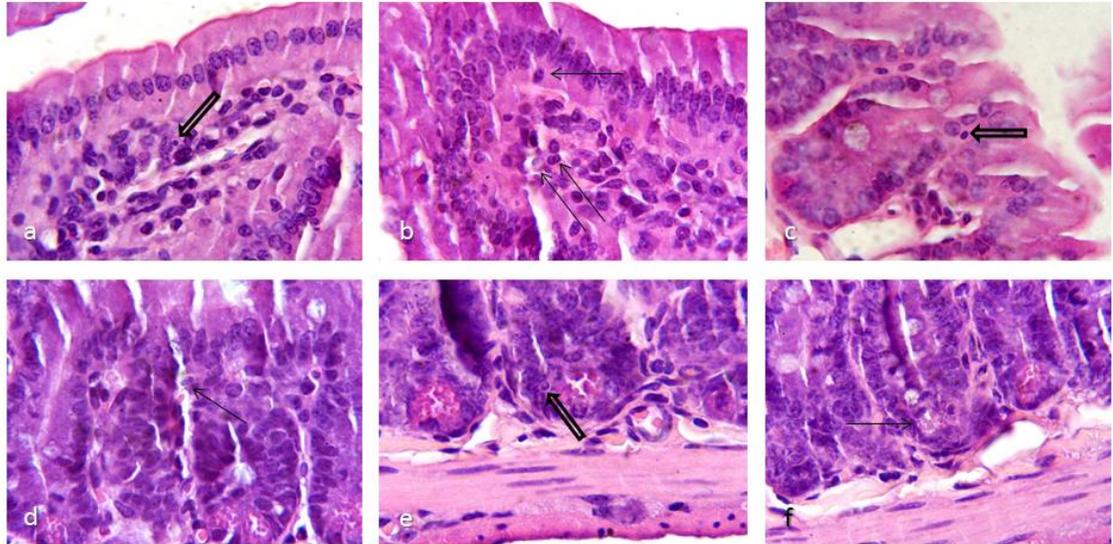


Figura 24. Duodeno. a) Presencia de espora madura de *E. cuniculi* atravesando el epitelio del duodeno al parecer por endocitosis (Ver flecha hueca). b) Espora de *E. cuniculi* atrapada por macrófago intraepitelial y esporas libres en vaso quilífero del epitelio duodenal. (Ver flechas). c y d) Esporas maduras de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través de uniones intraepiteliales. (Ver flecha hueca y flecha, respectivamente). e) Espora madura de *E. cuniculi* dentro del epitelio glandular. (Ver flecha hueca). f) Formación de vacuola parasitófora en epitelio glandular. (Ver flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.8.2. Duodeno (Tinción de Azul de Tricromo):

En el borde de la mucosa duodenal, se observaron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, exhibiendo diferentes tamaños, grados de maduración y morfología, muchas de ellas, se encontraron en pequeños grupos tratando de iniciar su proceso de internamiento a través de la endocitosis (Figuras 25a y b). La gran mayoría, se empezó a desplazar hacia los vasos quilíferos, otras más, se encontraron en uniones interepiteliales e interglandulares, migrando hacia las porciones basales del epitelio duodenal (Figuras 25c y d). Por otro lado, también se apreció la formación de numerosas vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares, así como, la presencia de numerosas esporas en porción basal del epitelio (Figuras 25e y f).

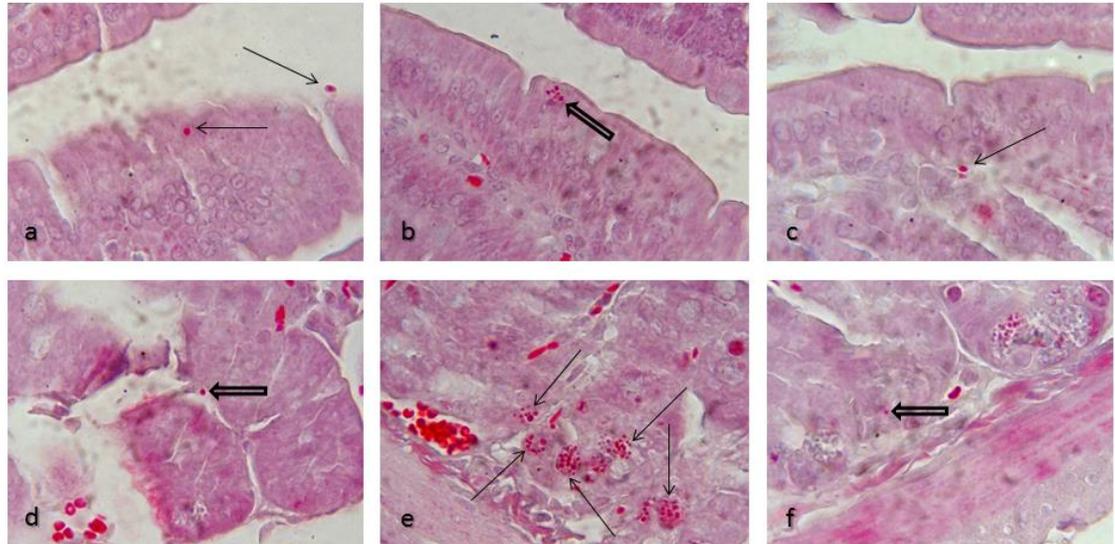


Figura 25. Duodeno. a) Presencia de varias esporas maduras de *E. cuniculi* en borde epitelial de la mucosa duodenal (Ver flechas). b) Esporas maduras de *E. cuniculi* internándose al parecer por el proceso de endocitosis. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* iniciando internación a través de vaso quilífero en epitelio duodenal. (Ver flecha). d) Espora madura de *E. cuniculi* internándose a través de unión interglandular. (Ver flecha hueca). e) Formación de numerosas vacuolas parasitóforas en epitelio glandular. (Ver flechas). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* migrando hacia la porción basal del epitelio duodenal. (Ver flecha hueca). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.8.3. Duodeno (Tinción de Gram):

Numerosos macrófagos intraepiteliales estuvieron presentes a nivel de la mucosa de esta porción intestinal, se les observó con una marcada actividad fagocítica de esporas de *E. cuniculi*, gran parte de estos macrófagos intraepiteliales ingresaron junto con las esporas fagocitadas hacia el interior de los vasos quilíferos (Figuras 26a, b y c). Otras esporas fueron migrando solas, a través de los espacios interepiteliales e interglandulares hacia la lámina propia y base del epitelio de las vellosidades duodenales (Figura 26d). Asimismo, se apreciaron a otros macrófagos con estas esporas, a través de las mismas rutas antes mencionadas. Algunas esporas también se observaron en la capa muscular de la mucosa (Figuras 26e y f).

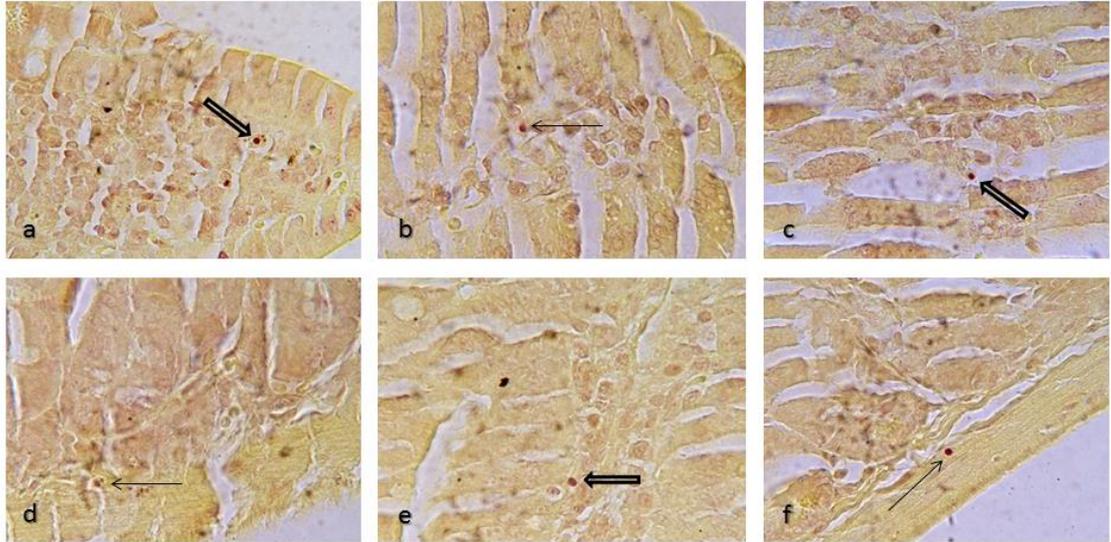


Figura 26. Duodeno. a) Presencia de una espora de *E. cuniculi* en el interior de un macrófago intraepitelial. (Ver flecha hueca). b y c) Esporas maduras de *E. cuniculi* ingresando al interior de un vaso quilífero. (Ver flecha y flecha hueca, respectivamente). d) Macrófago intraepitelial con una espora de *E. cuniculi* en la membrana basal del epitelio duodenal. (Ver flecha). e) Presencia de espora de *E. cuniculi*, en espacio interglandular y dentro de un vaso sanguíneo. (Ver flecha hueca). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* en capa muscular de la mucosa. (Ver flecha). Tinción de Gram. 100X.

Esquema de Distribución de Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* y Hallazgos Celulares en Epitelio Duodenal de Ratones Balb/c

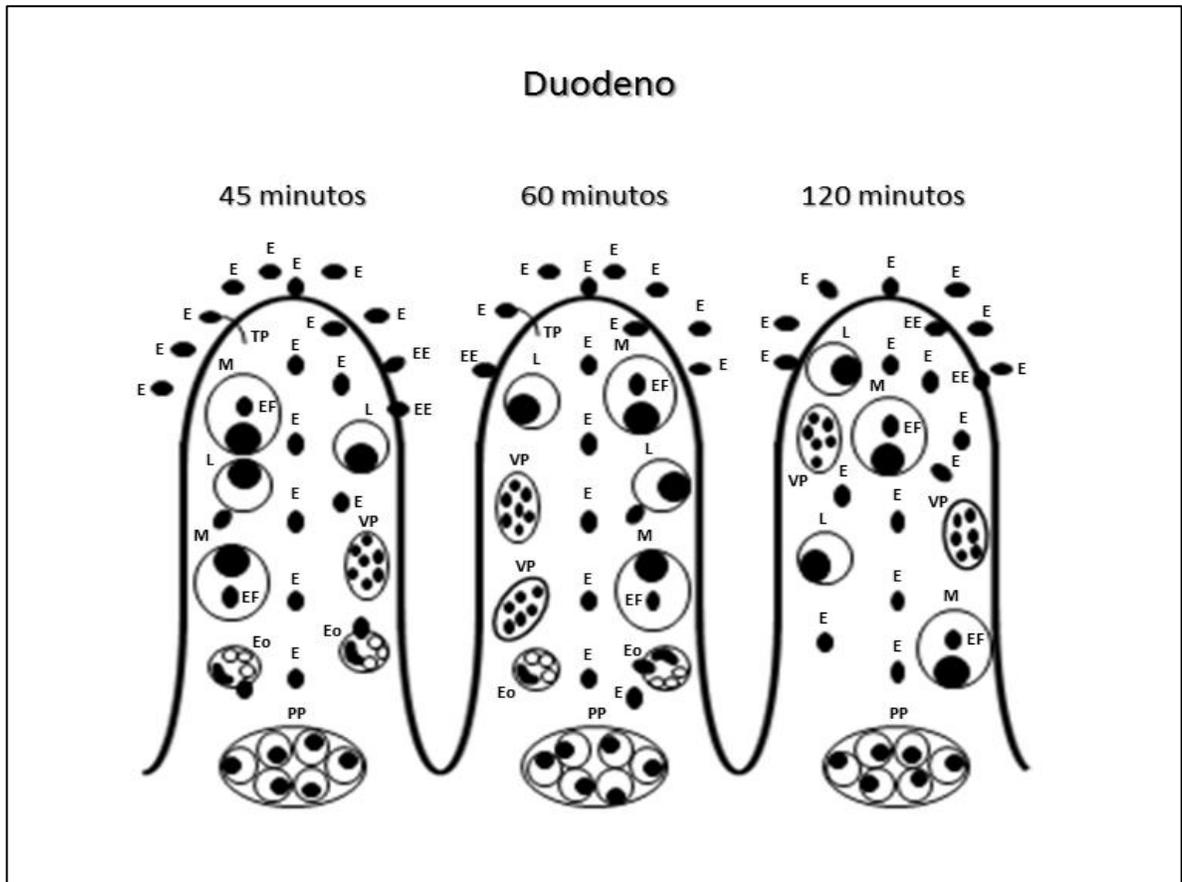


Figura 27. E) Esporas maduras alrededor del epitelio duodenal, libres en región de los vasos quilíferos, así como espacios intersticiales. EE) Espora ingresando al interior de la vellosidad duodenal por endocitosis. M) Macrófago con esporas en su interior. EF) Esporas fagocitadas. L) Linfocitos intraepiteliales. VP) Vacuolas parasitóforas. TP) Tubo polar. Eo) Eosinófilos con algunas esporas en su interior. PP) Placas de Peyser.

4.9. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (45 minutos).

4.9.1. Yeyuno (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se observaron escasas esporas de *E. cuniculi* en el interior de las vellosidades yeyunales, algunas de ellas se apreciaron dentro de algunas células polimorfonucleares principalmente eosinófilos, otras más se encontraron dentro de vasos quilíferos en la mucosa yeyunal (Figuras 28a y b). Por otro lado, se apreciaron a otras esporas más, dentro del citoplasma de las células glandulares, así como en las uniones intercelulares, siguiendo la ruta hacia la porción de la lámina propia del epitelio yeyunal (Figuras 28c y d). Nuevamente, se observaron a numerosos eosinófilos rodeando a esporas cerca de numerosos vasos sanguíneos, en la base del epitelio (Figura 28e). Asimismo, se encontraron algunas esporas dentro de agregados linfoides en algunas placas de Peyser (Figura 28f).

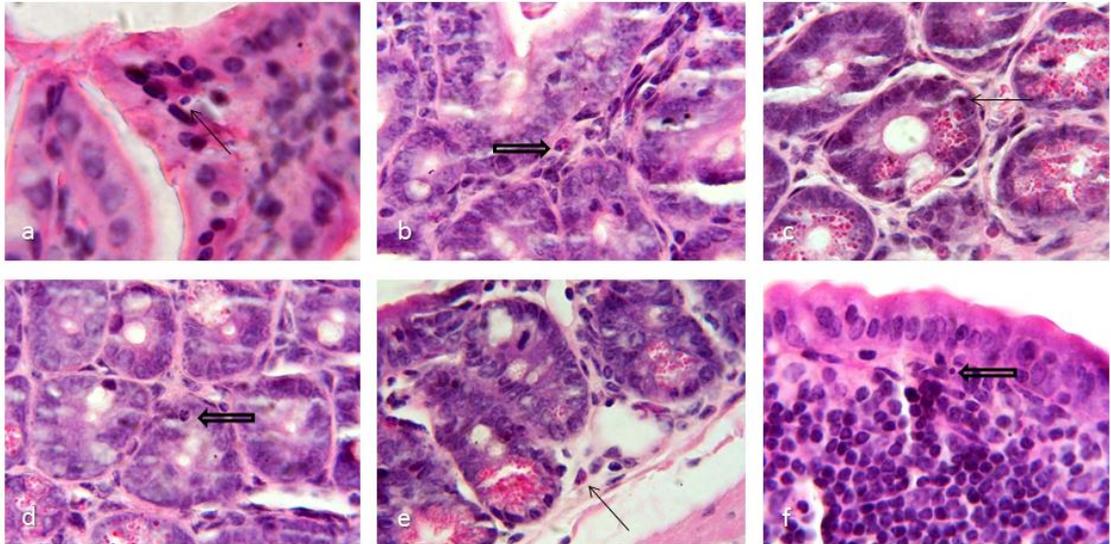


Figura 28. Yeyuno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en el interior del borde epitelial del yeyuno. (Ver flecha). b) Espora de *E. cuniculi* dentro de vaso quilífero al parecer en el interior de un eosinófilo. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* dentro del epitelio glandular yeyunal con vacuolas parasitóforas a su alrededor. (Ver flecha). d) Espora de *E. cuniculi* en citoplasma de célula glandular y en la base del epitelio. (Ver flecha hueca). e) Espora madura cerca de un eosinófilo en la base epitelial. (Ver flecha). f) Presencia de espora libre en placa de Peyer. (Ver flecha hueca). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.9.2. Yeyuno (Tinción de Azul de Tricromo):

Bordeando la mucosa yeyunal, se apreció a una espora ovalada y madura de *E. cuniculi*, en el interior de la vellosidad intestinal, otras más, se observaron tratando de iniciar su proceso de internamiento por endocitosis y algunas se encontraron dentro de numerosos macrófagos intraepiteliales y en vasos quilíferos (Figuras 29a, b y c). Otras esporas, se apreciaron en uniones interepiteliales e interglandulares, migrando hacia las porciones basales del epitelio yeyunal. Por otro lado, también se observó la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares y cerca de las células de Paneth, las cuales se apreciaron con sus

gránulos muy reactivos (Figuras 29d y e). Así como, la presencia de otras esporas de *E. cuniculi*, siendo rodeadas de numerosos linfocitos en algunas placas de Peyer (Figura 29f).

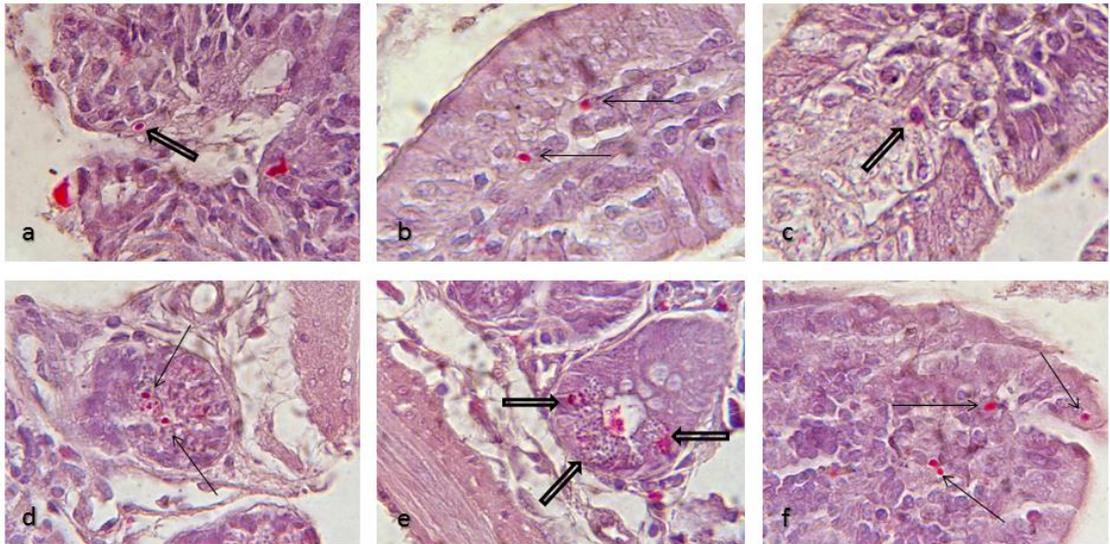


Figura 29. Yeyuno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en borde epitelial de la vellosidad yeyunal. (Ver flecha hueca). b) Esporas maduras de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través de vaso quilífero. (Ver flechas). c) Espora de *E. cuniculi* atrapada por un macrófago intraepitelial. (Ver flecha hueca). d y e) Formación de numerosas vacuolas parasitóforas incipientes en epitelio glandular y cerca de las células de Paneth. (Ver flechas y flechas huecas, respectivamente). f) Presencia de numerosas esporas de *E.cuniculi* siendo rodeadas de numerosos linfocitos en placa de Peyer. (Ver flechas). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.9.3. Yeyuno (Tinción de Gram):

Bordeando la mucosa yeyunal, se observaron a varias esporas ovaladas, otras redondas y maduras de *E. cuniculi*, las cuales iniciaron su internamiento a las vellosidades intestinales, otras se apreciaron dentro de las vellosidades a través de endocitosis y algunas se observaron dentro de macrófagos intraepiteliales y vasos quilíferos (Figuras 30a, b y c). Otras esporas, se

encontraron en uniones interepiteliales e interglandulares, y en las porciones basales del epitelio yeyunal. También, se apreció la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas que se empezaron a formar en el citoplasma de numerosas células glandulares y cerca de las células de Paneth, las cuales se apreciaron con sus gránulos muy reactivos (Figuras 30d y e). Por otro lado, otras esporas estuvieron rodeadas de numerosos linfocitos en algunas placas de Peyer (Figura 30f).

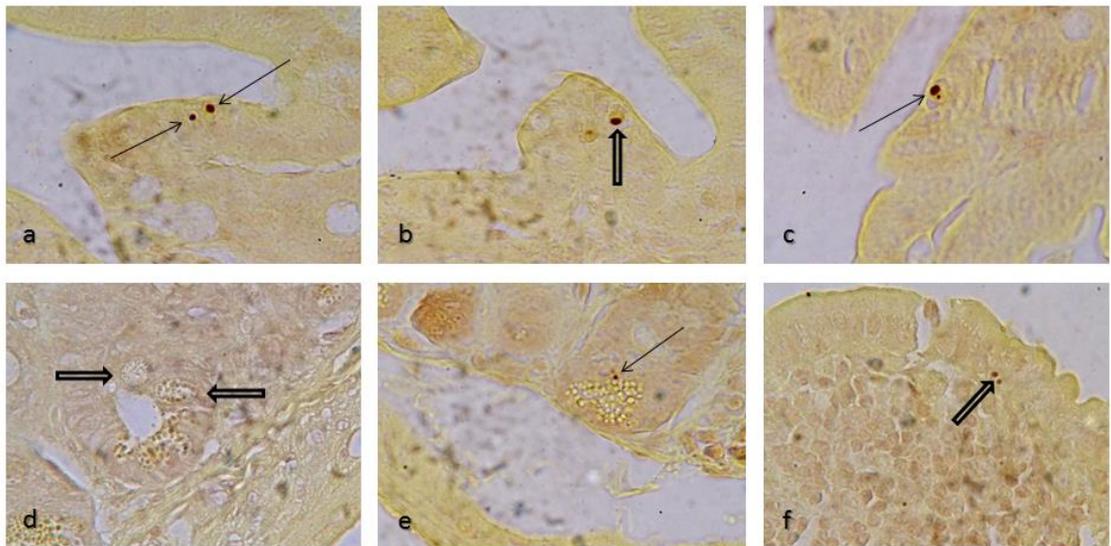


Figura 30. Yeyuno. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* en borde epitelial de la vellosidad yeyunal. (Ver flechas). b) Espora madura de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través del fenómeno de endocitosis en epitelio del yeyuno. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* atrapada por un macrófago intraepitelial. (Ver flecha). d) Formación de incipientes vacuolas parasitóforas en el citoplasma de numerosas células glandulares. (Ver flechas huecas). e) Presencia de espora madura de *E. cuniculi* en célula de Paneth, la cual presenta sus gránulos muy reactivos. (Ver flecha). f) Presencia de numerosas esporas de *E. cuniculi* las cuales se encuentran rodeadas de numerosos linfocitos en placa de Peyer. (Ver flecha hueca). Tinción de Gram. 100X.

4.10. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (60 minutos).

4.10.1. Yeyuno (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

A nivel de la mucosa, se observaron escasas esporas de *E. cuniculi*, algunas se encontraron en el interior del borde epitelial y otras en los vasos quilíferos (Figuras 31a y b). Mientras que algunas se apreciaron en el interior de macrófagos intraepiteliales, los cuales también se encontraron en las células de Paneth y la parte basal del epitelio. Cabe mencionar que en el citoplasma de algunos macrófagos, estas esporas al parecer fueron experimentando también diversas fases de replicación diporoblástica (Figura 31c). Otras esporas, se observaron libres y unas más se encontraron en el citoplasma de las células de Paneth. Algunas más, formando incipientes vacuolas parasitóforas las cuales también, se observaron rodeadas de una gran cantidad de gránulos (Figura 31d). Por otro lado, también se apreciaron a estas esporas en epitelio glandular y dentro de vasos sanguíneos e invadiendo el endotelio vascular (Figuras 31e y f).

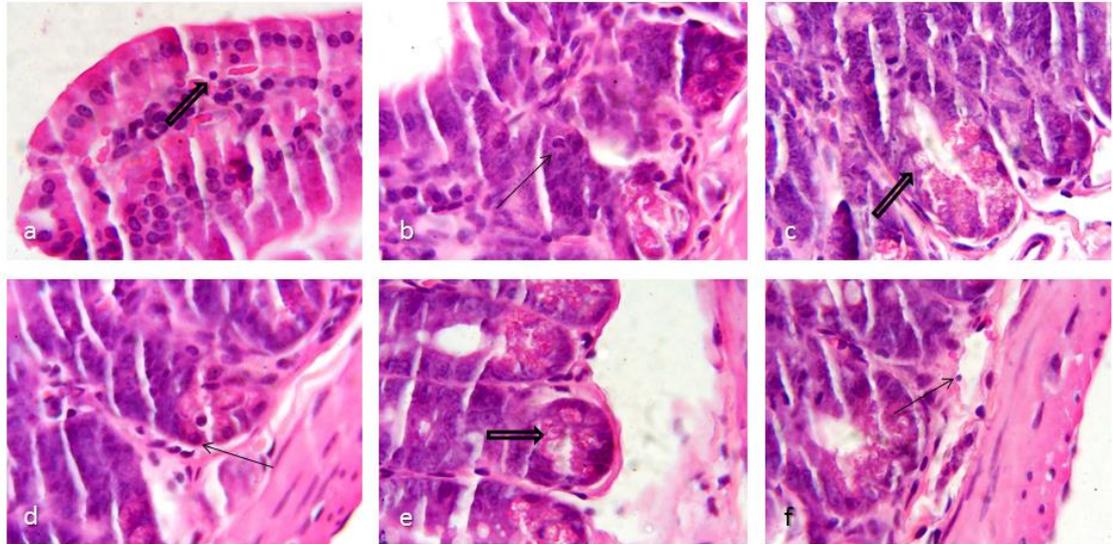


Figura 31. Yeyuno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en el interior del borde epitelial del yeyuno. (Ver flecha hueca). b) Espora de *E. cuniculi* en fase diporoblástica y presencia dentro de un vaso quilífero. (Ver flecha). c) Formación de vacuola parasitófora incipiente en epitelio glandular. (Ver flecha hueca). d) Espora de *E. cuniculi* en citoplasma de célula glandular y su presencia en la base del epitelio. (Ver flecha). e) Espora madura de *E. cuniculi* en epitelio glandular. (Ver flecha hueca). f) Presencia de espora libre en la luz de un vaso sanguíneo. (Ver flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.10.2. Yeyuno (Tinción de Azul de Tricromo):

En el interior de la mucosa yeyunal, se observaron a numerosas esporas ovaladas y maduras de *E. cuniculi*, las cuales iniciaron su internamiento a través de los vasos quilíferos (Figura 32a). Otras más, se apreciaron internándose por endocitosis, así como, por fagocitosis a través de numerosos macrófagos intraepiteliales (Figura 32b). Algunas más, se hallaron en uniones interepiteliales e interglandulares, migrando hacia las porciones basales del epitelio yeyunal. Por otro lado, también se apreció la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares y cerca de las células de Paneth, las cuales se observaron con sus

gránulos muy reactivos. Asimismo, algunas esporas de *E. cuniculi*, estuvieron rodeadas de numerosos linfocitos en algunas placas de Peyer y otras se observaron, cerca de los vasos sanguíneos en la base del epitelio yeyunal (Figuras 32c, d, e y f).

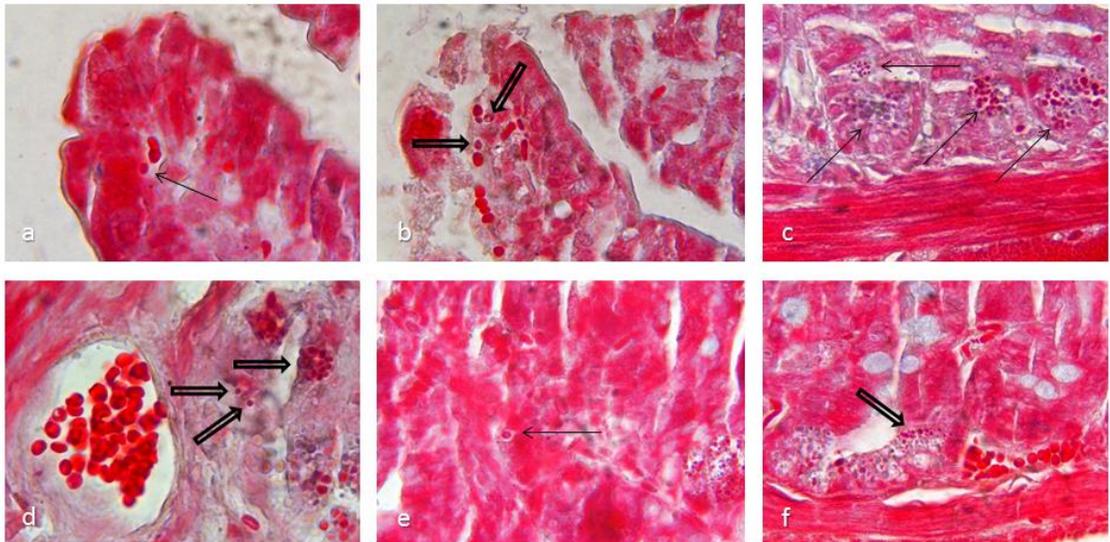


Figura 32. Yeyuno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* alrededor de un vaso quilífero. (Ver flecha). b) Esporas maduras de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través de vaso sanguíneo, acompañados de eritrocitos. (Ver flechas huecas). c) Formación de vacuolas parasitóforas en epitelio glandular (Ver flechas). d) Esporas de *E. cuniculi* alrededor de un vaso sanguíneo, además de formarse una vacuola parasitófora madura. (Ver flechas huecas). e) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en citoplasma glandular. (Ver flecha). f) Formación de numerosas vacuolas parasitóforas incipientes en epitelio glandular y cerca de células de Paneth. (Ver flecha hueca). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.10.3. Yeyuno (Tinción de Gram):

Bordeando la mucosa yeyunal, se observó a una espora ovalada y madura de *E. cuniculi*, otra en el interior de la vellosidad intestinal, algunas más, se apreciaron tratando de iniciar su proceso de internamiento, a través de endocitosis, mientras que otras, se encontraron siendo fagocitadas por

numerosos macrófagos intraepiteliales, los cuales las transportaban hacia los vasos quilíferos (Figuras 33a y b). Por otro lado, también se observó la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares y cerca de las células de Paneth, las cuales se apreciaron con sus gránulos muy reactivos, otras esporas, se encontraron en uniones interepiteliales e interglandulares, migrando hacia las porciones basales del epitelio yeyunal (Figuras 33c,d,e, y f).

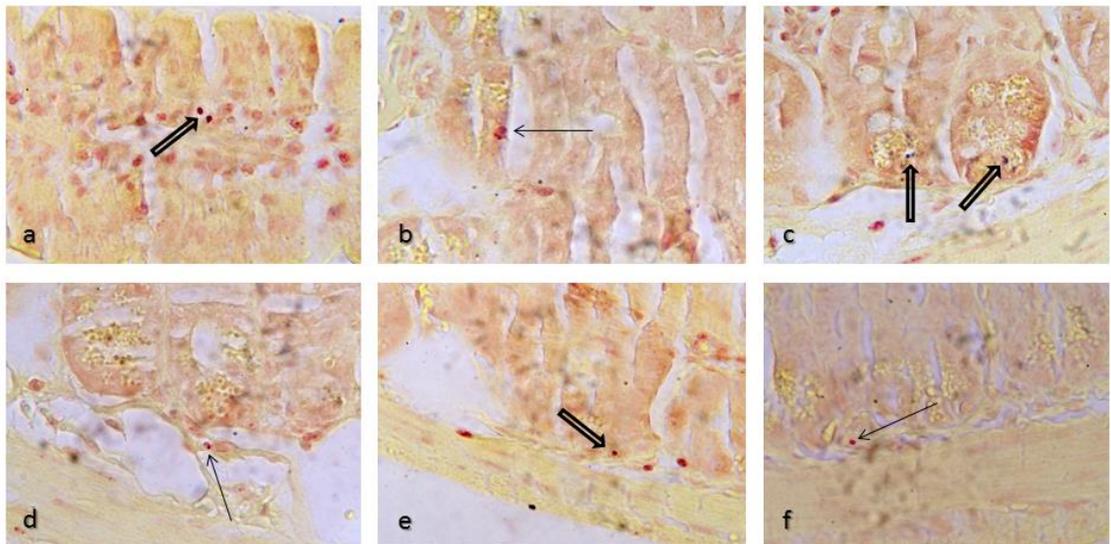


Figura 33. Yeyuno. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* ingresando al interior de una vellosidad yeyunal. (Ver flecha hueca). b) Macrófago con esporas en su interior transportándolas hacia la base del epitelio. (Ver flecha). c) Esporas maduras de *E. cuniculi* dentro del epitelio glandular, rodeados de numerosas células de Paneth. (Ver flechas huecas). d) Espora de *E. cuniculi* dirigiéndose hacia la base del epitelio yeyunal. (Ver flecha hueca). e y f) Presencia de esporas de *E. cuniculi* transportándose hacia la base epitelial. (Ver flecha). Tinción de Gram. 100X.

4.10.4. Yeyuno (Calcoflúor-white):

Se apreciaron esporas maduras de *E. cuniculi*, en el interior de los vasos quilíferos y agrupándose en la base del epitelio. (Figura 34a).

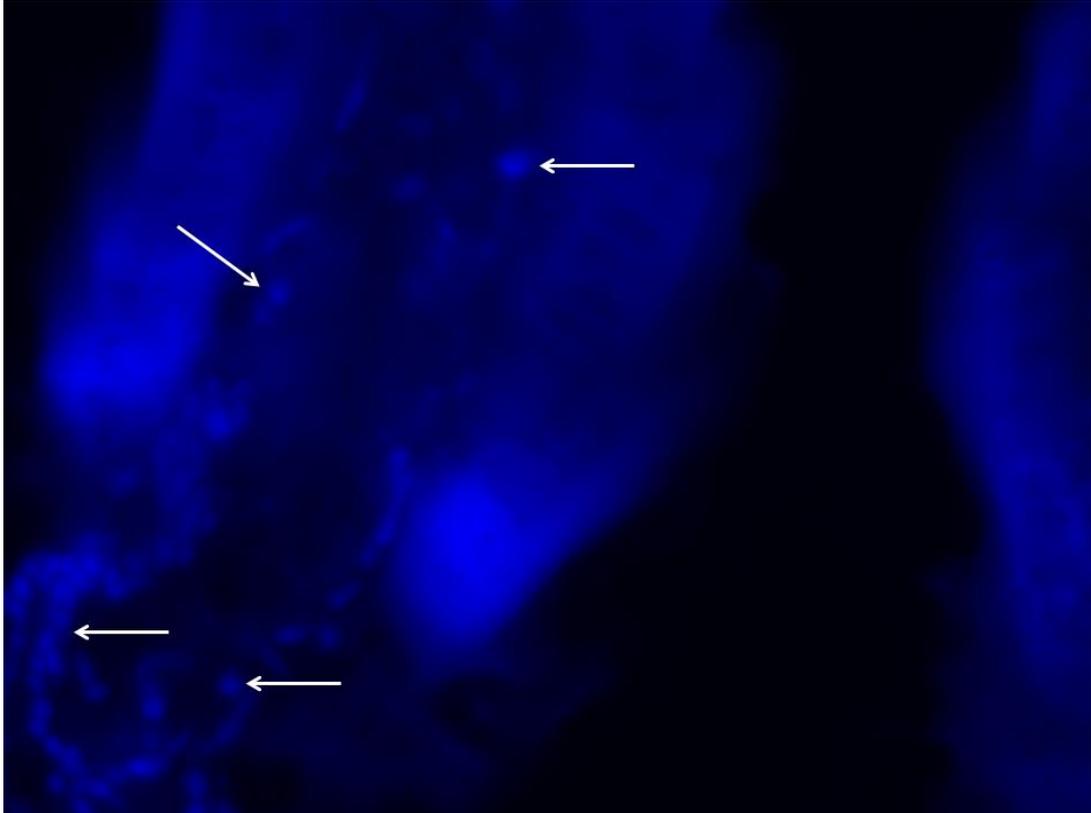


Figura 34. Yeyuno. a) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* en el interior de los vasos quilíferos y agrupándose en la base del epitelio. (Ver flechas). Calcoflúor-white. 100X.

4.11. Alteraciones Celulares Observadas en Yeyuno de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (120 minutos).

4.11.1. Yeyuno (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se observaron escasas esporas de *E. cuniculi* iniciando su migración hacia el interior de las vellosidades yeyunales, otras más se encontraron dentro de los vasos quilíferos en la mucosa yeyunal (Figuras 35a y b). Algunas de ellas se apreciaron cerca de algunos macrófagos intracelulares y en los vasos quilíferos (Figura 35c). Por otro lado, se encontraron a otras esporas más, dentro del citoplasma de las células glandulares, algunas en las uniones intercelulares y otras, en la porción de la lámina propia del epitelio del yeyuno (Figuras 35d y e). Asimismo, se apreciaron a numerosas esporas de *E. cuniculi* rodeadas de células de Paneth en el citoplasma de algunas células glandulares (Figura 35f).

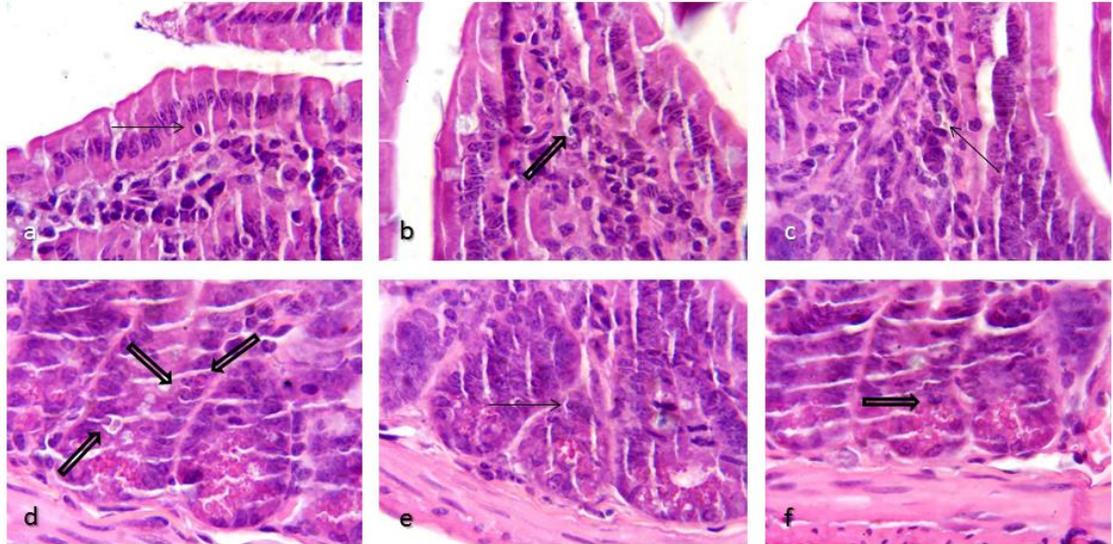


Figura 35. Yeyuno. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en el interior de la vellosidad yeyunal. (Ver flecha). b) Espora de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través de un vaso quilífero. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* dentro del citoplasma de un macrófago, en un vaso quilífero. (Ver flecha). d) Esporas de *E. cuniculi* en citoplasma de célula glandular y con presencia en la base del epitelio. (Ver flechas huecas). e) Espora madura de *E. cuniculi* en la base del epitelio. (Ver flecha). f) Presencia de espora libre rodeada de células de Paneth en el citoplasma de una célula glandular. (Ver flecha hueca). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.11.2. Yeyuno (Tinción de Azul de Tricromo):

En el borde de la mucosa yeyunal, se apreciaron algunas esporas ovaladas y maduras de *E. cuniculi* y otras van iniciando su ingreso hacia el interior de la vellosidad intestinal (Figura 36a). Otras esporas, se apreciaron en uniones interepiteliales e interglandulares y algunas se internaron hacia las porciones basales del epitelio yeyunal. También se observó, la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares (Figuras 36b, c y d). Es importante mencionar, que gran parte de las vacuolas parasitóforas, se empezaron a formar cerca de las células de

Paneth, las cuales se apreciaron con sus gránulos muy reactivos y en algunos casos con pérdida (depleción) de algunos de ellos (Figuras 36e y f).

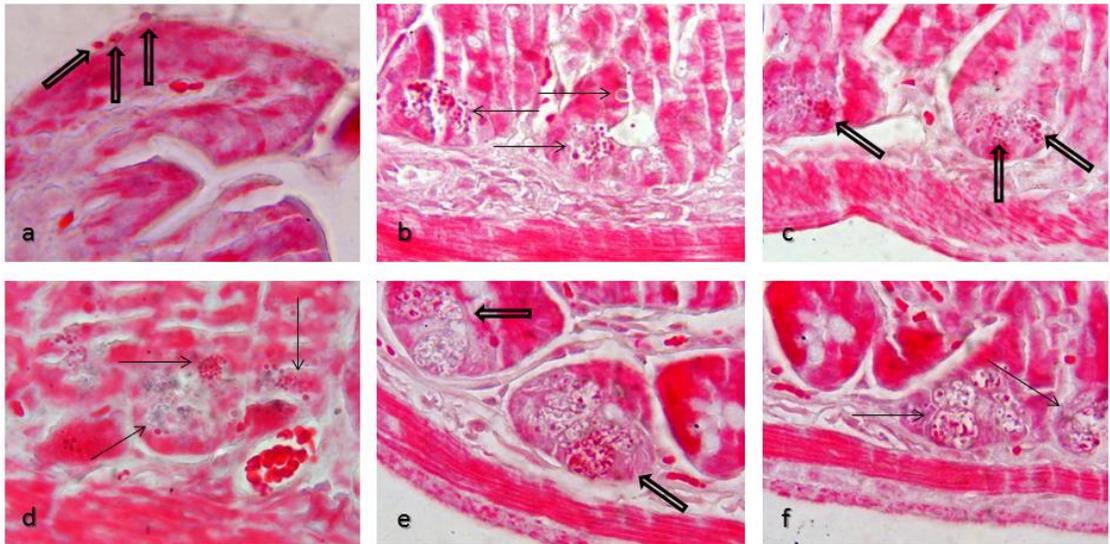


Figura 36. Yeyuno. a) Presencia de tres esporas maduras de *E. cuniculi* en borde epitelial de la vellosidad yeyunal. (Ver flechas huecas). b y c) Formación de numerosas vacuolas parasitóforas en el citoplasma de numerosas células glandulares. (Ver flechas y flechas huecas, respectivamente). d) Vacuolas parasitóforas compartiendo espacio con numerosas células de Paneth, en epitelio de células glandulares. (Ver flechas). e y f) Formación de numerosas vacuolas parasitóforas incipientes en epitelio glandular y pérdida (depleción) de gránulos en el citoplasma de algunas células de Paneth (nótese los espacios vacíos). (Ver flechas huecas y flechas, respectivamente). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.11.3. Yeyuno (Tinción de Gram):

Bordeando la mucosa yeyunal, se observó a una espora de *E. cuniculi*, la cual va iniciando su ingreso hacia el interior de la vellosidad intestinal, otras más, se apreciaron tratando de iniciar su proceso de internamiento hacia los vasos quilíferos. Otras esporas, se encontraron en uniones interepiteliales e interglandulares, dirigiéndose hacia las porciones basales del epitelio yeyunal (Figuras 37a, b y c). Asimismo, se apreciaron a otras esporas en el citoplasma

de numerosas células glandulares y cerca de las células de Paneth, las cuales se observaron con sus gránulos muy reactivos (Figura 37d). Por otro lado, algunas esporas de *E. cuniculi*, se encontraron cerca de numerosos vasos sanguíneos en la base del epitelio (Figuras 37e y f).

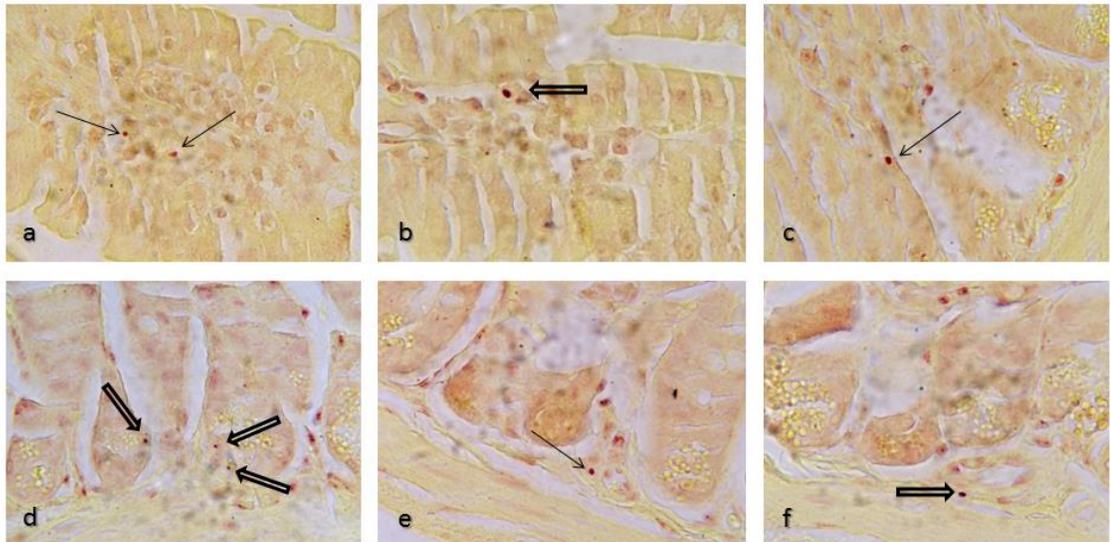


Figura 37. Yeyuno. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* en el interior de una vellosidad yeyunal (Ver flechas). b) Espora madura de *E. cuniculi* internándose a través de un vaso quilífero. (Ver flecha hueca). c) Espora de *E. cuniculi* ingresando al interior de la vellosidad del yeyuno. (Ver flecha). d) Presencia de esporas en epitelio glandular rodeado de numerosas células de Paneth reactivas. (Ver flechas huecas). e y f) Presencia de esporas de *E. cuniculi* alrededor de vasos sanguíneos en la base del epitelio. (Ver flecha y flecha hueca, respectivamente). Tinción de Gram. 100X.

Esquema de Distribución de Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* y Hallazgos Celulares en Epitelio Yeyunal de Ratones Balb/c

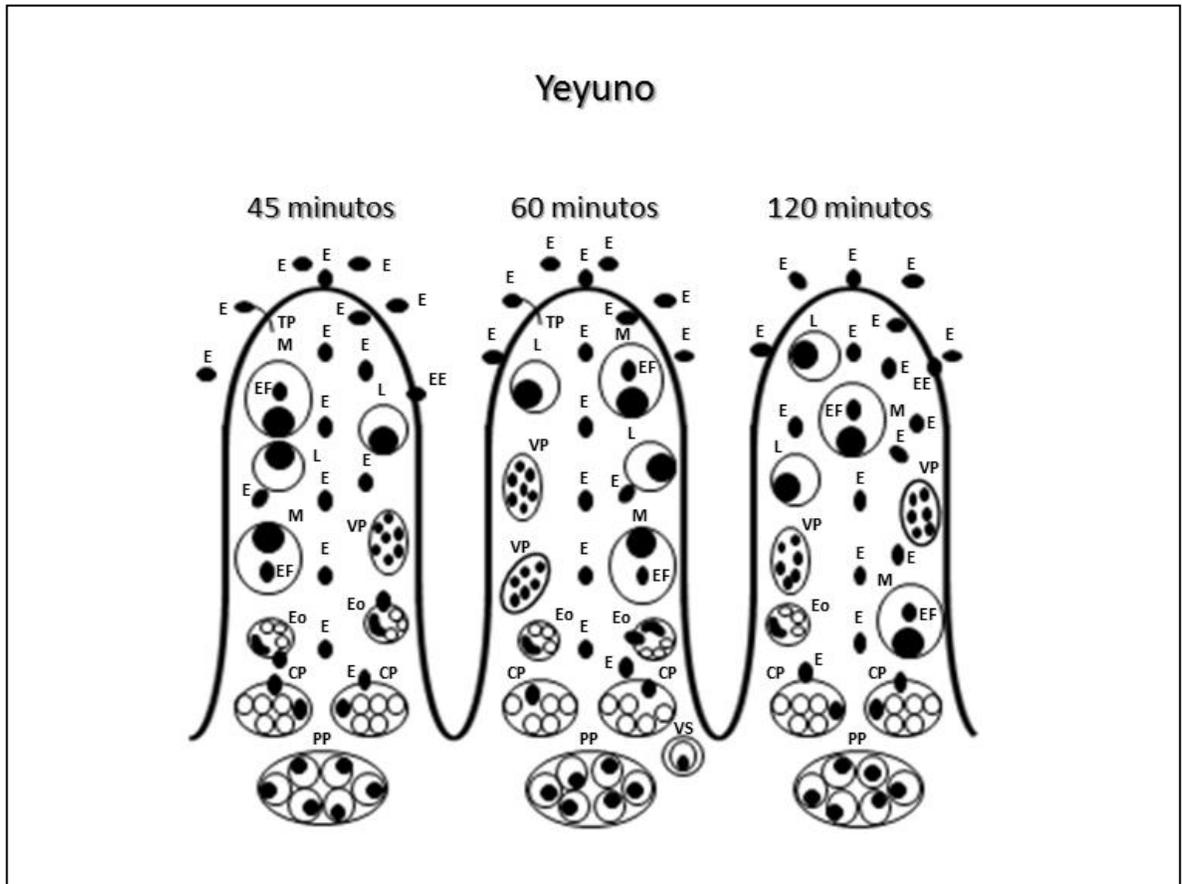


Figura 38. E) Esporas maduras alrededor del epitelio yeyunal, libres en región de los vasos quilíferos, así como espacios intersticiales. EE) Espora ingresando por endocitosis al interior de la vellosidad yeyunal. M) Macrófago con esporas en su interior. EF) Esporas fagocitadas. L) Linfocitos intraepiteliales activos. VP) Vacuolas parasitóforas incipientes. TP) Tubo polar extruido. Eo) Eosinófilos con esporas en su interior. PP) Placas de Peyer. VS) Vaso sanguíneo con espora en su interior.

4.12. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (45 minutos).

4.12.1. Íleon (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se encontraron algunas esporas de *E. cuniculi* iniciando su internamiento en las vellosidades ileales, algunas de ellas se apreciaron dentro del citoplasma de algunas células polimorfonucleares principalmente eosinófilos y otras más, se observaron en los vasos quilíferos de la mucosa ileal (Figuras 39a y b). Algunas, estaban en el citoplasma de las células glandulares, así como en las uniones intercelulares, siguiendo la ruta hacia la porción de la lámina propia del epitelio del íleon (Figura 39c). Asimismo, se apreciaron algunas esporas dentro de vasos sanguíneos (Figura 39d). Otras más, siendo capturadas por numerosos eosinófilos, los cuales las transportaron hacia la base del epitelio cerca de numerosos vasos sanguíneos, además, también se observaron algunas esporas dentro de agregados linfoides en algunas placas de Peyer (Figuras 39e y f).

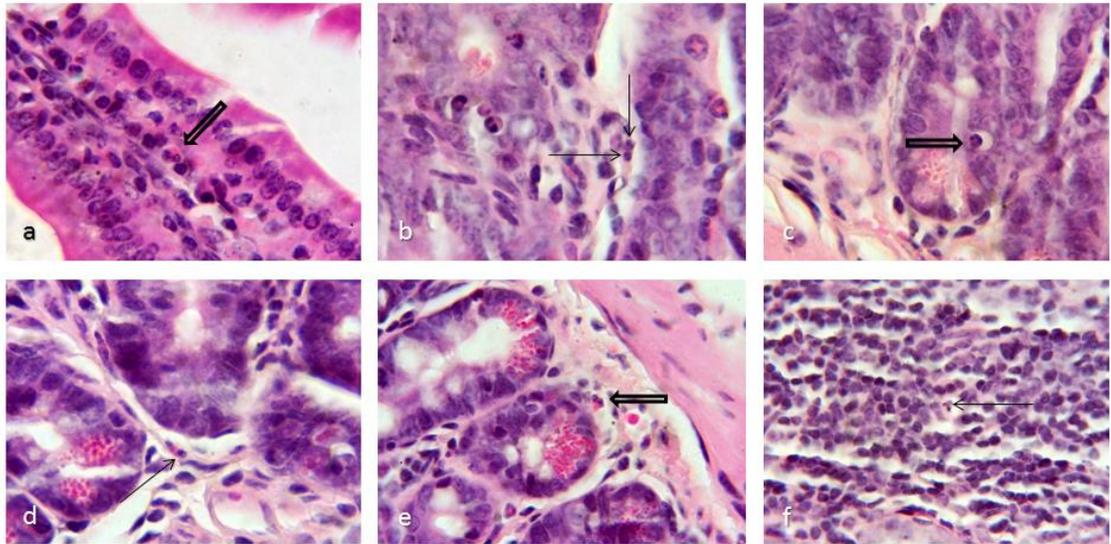


Figura 39. Íleon. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* en el interior de la vellosidad ileal. (Ver flecha hueca). b) Esporas de *E. cuniculi* en uniones intercelulares rodeadas de eosinófilos y en un vaso quilífero. (Ver flechas). c) Espora de *E. cuniculi* dentro del citoplasma de un eosinófilo en epitelio glandular. (Ver flecha hueca). d) Espora de *E. cuniculi* dentro de vaso sanguíneo. (Ver flecha). e) Espora madura siendo transportada por un eosinófilo hacia la base epitelial. (Ver flecha hueca). f) Presencia de esporas libres de *E. cuniculi* en placa de Peyer. (Ver flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.12.2. Íleon (Tinción de Azul de Tricromo):

Escasas esporas de *E. cuniculi* se observaron en el borde de las vellosidades ileales, algunas se van internando en la vellosidad intestinal al parecer por endocitosis (Figuras 40a y b). Otras más, se apreciaron dentro de los vasos quilíferos y algunas se encontraron en el interior de los conductos de las células glandulares, provenientes de su citoplasma (Figura 40c). Algunas esporas, se encontraron en uniones interepiteliales e interglandulares y en las porciones basales del epitelio ileal. Por otro lado, también se apreció la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares (Figuras 40d, e y f).

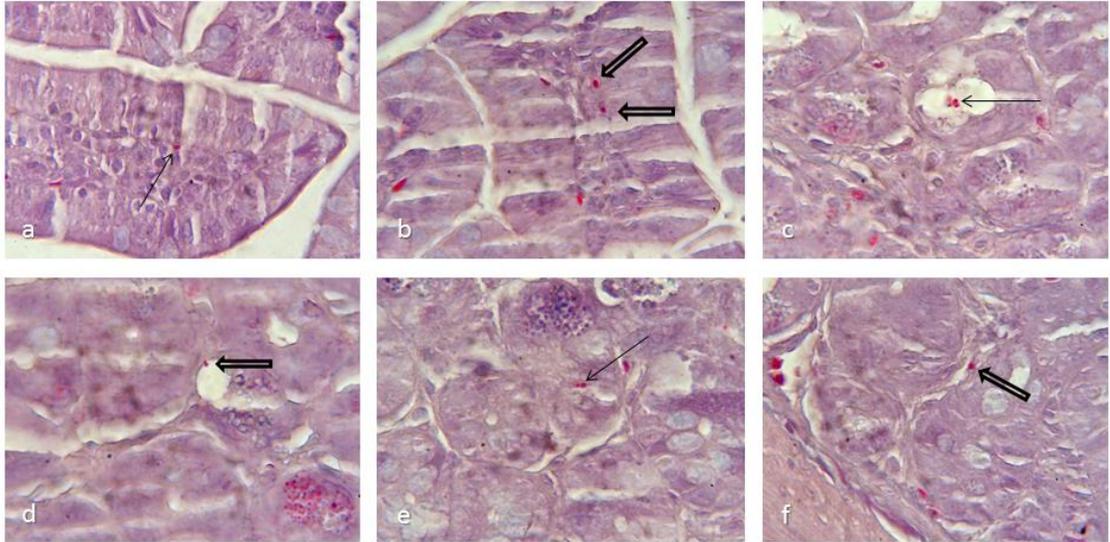


Figura 40. Íleon. a) Internamiento por el fenómeno de endocitosis de una espora madura de *E. cuniculi* desde el borde epitelial de la vellosidad ileal. (Ver flecha). b) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* en un vaso quilífero. (Ver flechas huecas). c) Presencia de esporas de *E. cuniculi* atrapadas en citoplasma de célula glandular. (Ver flecha). d) Presencia de esporas de *E. cuniculi* en conducto de célula glandular y formación de incipiente vacuola parasitófora. (Ver flecha hueca). e) Esporas libres siguiendo su internamiento a través del epitelio glandular y formación de una vacuola parasitófora. (Ver flecha). f) Presencia de espora libre en espacio interglandular. (Ver flecha hueca). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.12.3. Íleon (Tinción de Gram):

En el borde de la mucosa del íleon, se encontraron a varias esporas ovaladas, otras redondas y maduras de *E. cuniculi*, las cuales iniciaron su ingreso hacia el interior de las vellosidades intestinales, a través, de endocitosis mientras que otras tantas, se observaron dentro de vasos quilíferos (Figuras 41a,b y c). Otras esporas, se encontraron en uniones interepiteliales e interglandulares migrando hacia las porciones basales del epitelio ileal (Figura 41d). Por otro lado, también se apreció la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas en el citoplasma de numerosas células glandulares, junto a numerosas células de Paneth, las cuales se observaron con sus

gránulos muy reactivos, además, también se encontraron numerosas esporas maduras de *E. cuniculi* dentro de ellas (Figuras 41e y f).

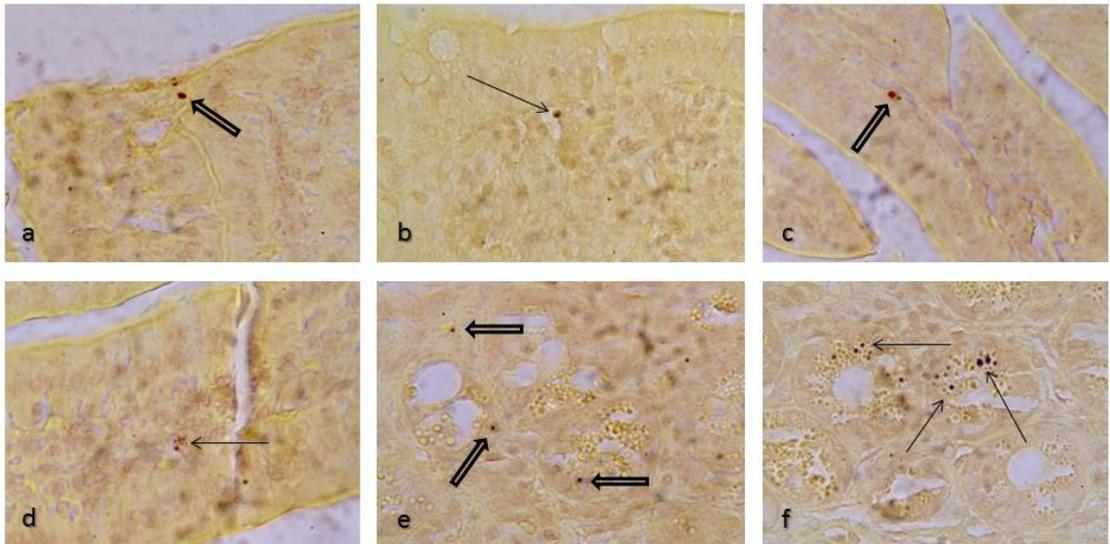


Figura 41. Íleon. a) Penetración de una espora madura de *E. cuniculi* por el proceso de endocitosis en borde epitelial de la vellosidad ileal. (Ver flecha hueca). b) Espora madura de *E. cuniculi* iniciando internamiento hacia vasos quilíferos en epitelio del íleon. (Ver flecha). c) Espora de *E. cuniculi* iniciando ingreso a través de un vaso quilífero. (Ver flecha hueca). d) Formación de una incipiente vacuola parasitófora en el citoplasma de células glandulares. (Ver flecha). e y f) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* en citoplasma de células glandulares y cerca de células de Paneth, la cual presenta sus gránulos muy reactivos. (Ver flechas huecas y flechas, respectivamente). Tinción de Gram. 100X.

4.13. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (60 minutos).

4.13.1. Íleon (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

A nivel de la mucosa de las vellosidades del íleon, se apreciaron escasas esporas de *E. cuniculi*, algunas se encontraron penetrando hacia el interior por el fenómeno de la endocitosis y otras en los vasos quilíferos, iniciando su proceso migratorio hacia las partes inferiores del epitelio intestinal (Figuras 42a y b). Otras, se observaron en diferentes estadios de replicación en el citoplasma de numerosas células glandulares, algunas más formaron vacuolas parasitóforas incipientes, además de ser llevadas hacia la parte basal del epitelio (Figuras 42c y d). También se observaron a algunas esporas migrando libremente y unas en el citoplasma de las células de Paneth, las cuales mostraron muy reactivos sus gránulos citoplasmáticos. Por otro lado, también se encontraron a algunas esporas rodeadas de abundantes gránulos de las células de Paneth y otras más, se apreciaron dirigiéndose a algunos vasos sanguíneos (Figuras 42e y f).

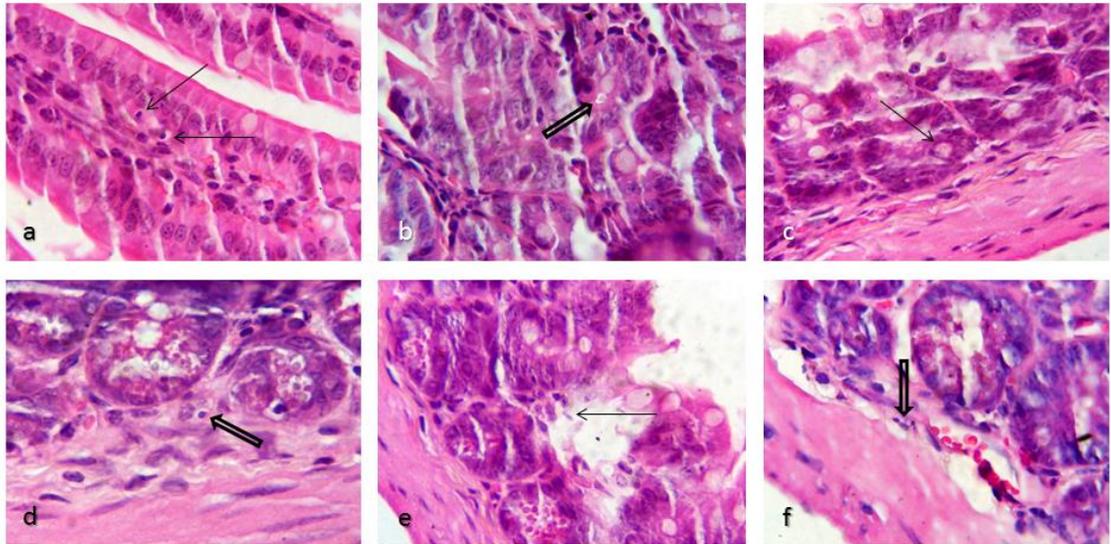


Figura 42. Íleon. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* penetrando hacia el interior del íleon. (Ver flechas). b) Espora de *E. cuniculi* en citoplasma de epitelio glandular. (Ver flecha hueca). c) Formación de vacuola parasitófora incipiente en epitelio glandular. (Ver flecha). d) Espora madura de *E. cuniculi* en lámina propia. (Ver flecha hueca). e) Espora madura de *E. cuniculi* libre y cerca del epitelio glandular. (Ver flecha). f) Presencia de dos esporas libres cerca de un vaso sanguíneo. (Ver flecha hueca). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.13.2. Íleon (Tinción de Azul de Tricromo):

Algunas esporas de *E. cuniculi*, se apreciaron en el borde de las vellosidades del íleon, otras iniciaron su ingreso hacia el interior de la vellosidad por endocitosis, otras por la ruta de los vasos quilíferos y unas más, se apreciaron en el interior de los conductos de las células glandulares, provenientes de su citoplasma (Figuras 43a, b y c). También se encontraron esporas en uniones interepiteliales e interglandulares, migrando hacia las porciones basales del epitelio ileal. Por otro lado, también se apreció la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas, en el citoplasma de numerosas células glandulares y cerca de numerosas células de Paneth las

cuales se observaron con reactividad muy marcada de sus gránulos (Figuras 43d,e y f).

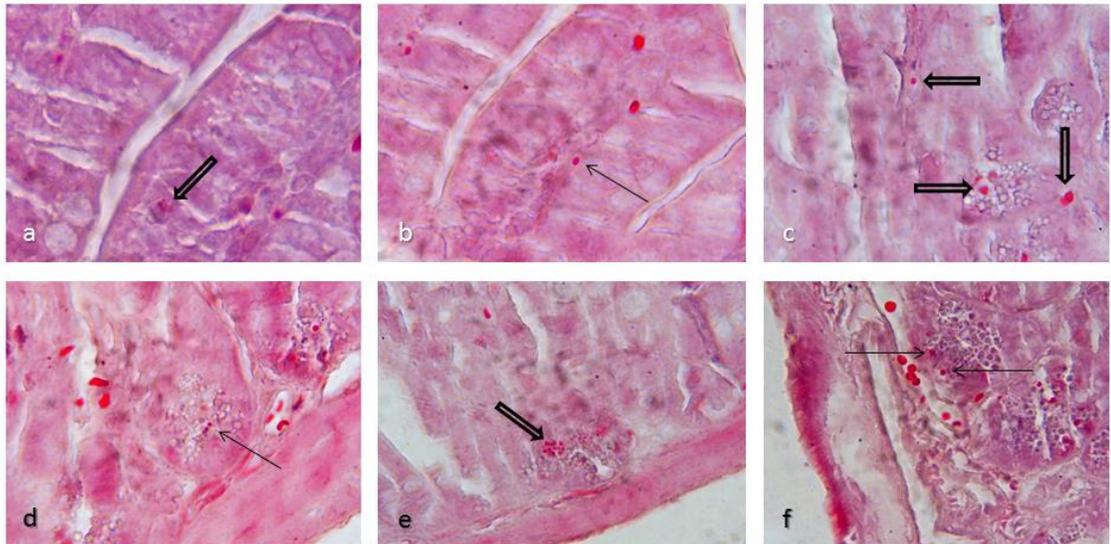


Figura 43. Íleon. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* internándose desde el borde epitelial de la vellosidad del íleon. (Ver flecha hueca). b) Espora madura de *E. cuniculi* iniciando su ingreso a través de un vaso quilífero. (Ver flecha). c) Presencia de esporas de *E. cuniculi* atrapadas en citoplasma de células glandulares. (Ver flechas huecas). d) Presencia de esporas de *E. cuniculi* en citoplasma de una célula glandular y cerca de células de Paneth con sus gránulos muy reactivos. (Ver flecha). e y f) Formación de una vacuola parasitófora con esporas libres siguiendo su internamiento a través del epitelio glandular. (Ver flecha hueca y flechas, respectivamente). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.13.3. Íleon (Tinción de Gram):

En el borde del epitelio de la mucosa ileal, se apreciaron a varias esporas ovaladas, otras redondas, así como maduras e inmaduras de *E. cuniculi*, las cuales iniciaron su ingreso hacia el interior de las vellosidades intestinales, a través de endocitosis, mientras que otras se encontraron dentro de vasos quilíferos (Figura 44a). Algunas esporas, fueron transportadas por los mismos macrófagos intraepiteliales, a través de las uniones interepiteliales e

interglandulares migrando hacia las porciones basales del epitelio del íleon (Figuras 44b y c). Otras esporas se apreciaron en fases de división diporoblástica, migrando hacia las porciones basales del epitelio (Figuras 44d y e). También se encontró la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas en el citoplasma de numerosas células glandulares junto a numerosas células de Paneth, las cuales se apreciaron con sus gránulos muy reactivos, además se observaron numerosas esporas maduras de *E. cuniculi* dentro de ellas (Figura 44f).

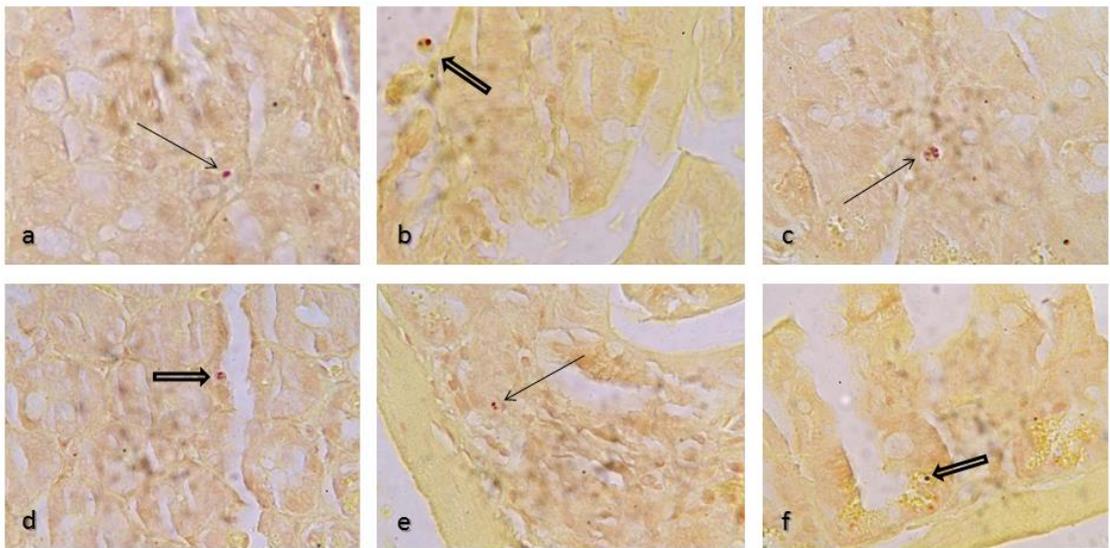


Figura 44. Íleon. a) Penetración de una espora madura de *E. cuniculi* por el proceso de endocitosis en el borde del epitelio ileal. (Ver flecha). b) Espora madura de *E. cuniculi* atrapada por un macrófago en el borde del epitelio del íleon. (Ver flecha hueca). c) Macrófago con varias esporas de *E. cuniculi* iniciando internamiento, a través de un vaso quilífero. (Ver flecha). d y e) Esporas de *E. cuniculi* en fase de replicación diporoblástica, siguiendo su migración hacia la base del epitelio del íleon. (Ver flecha hueca y flecha, respectivamente). f) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en citoplasma de células glandulares y dentro de una célula de Paneth, la cual presenta sus gránulos muy reactivos. (Ver flecha hueca). Tinción de Gram. 100X.

4.13.4. Íleon (Calcoflúor-white):

Se observaron esporas maduras de *E. cuniculi*, distribuyéndose en el interior de los vasos quilíferos. (Figura 45a).

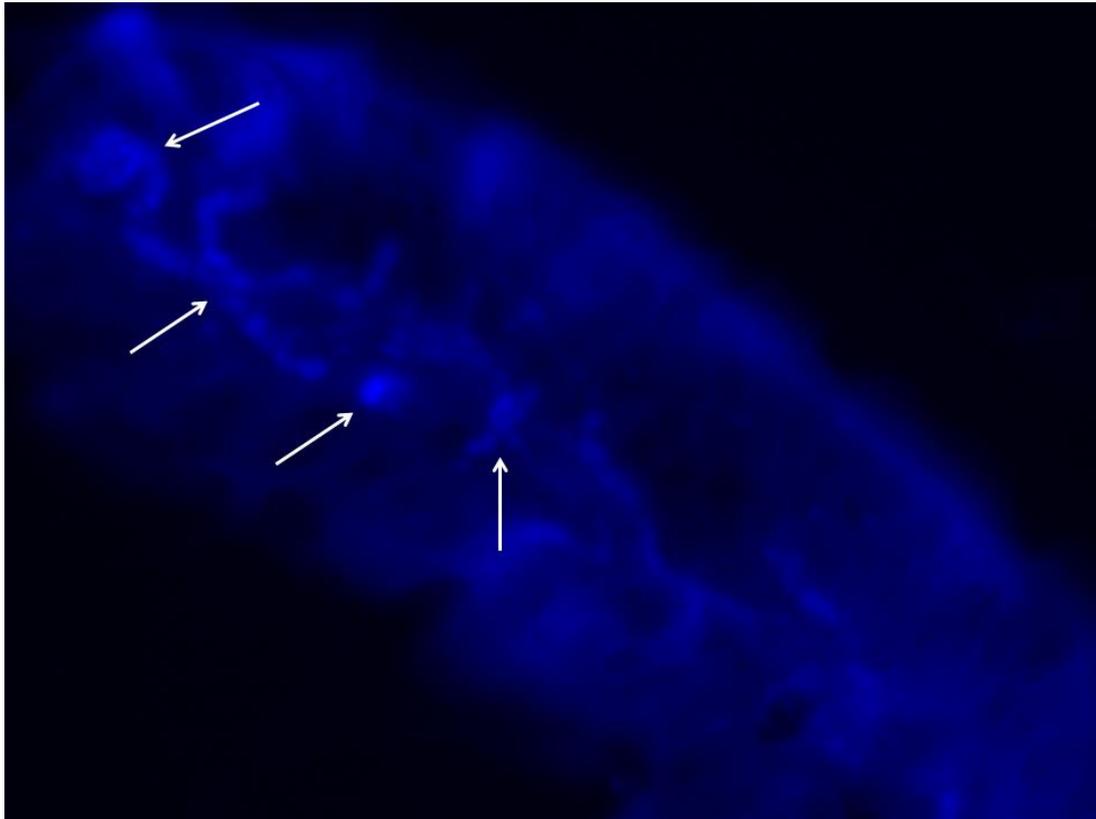


Figura 45. Íleon. a) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi*, distribuidas a lo largo de los vasos quilíferos. (Ver flechas). Calcoflúor-white. 100X.

4.14. Alteraciones Celulares Observadas en Íleon de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (120 minutos).

4.14.1. Íleon (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

A nivel de las vellosidades del íleon, se apreciaron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, penetrando hacia el interior por endocitosis y dirigiéndose hacia los vasos quilíferos, iniciando así, su internamiento hacia la base del epitelio ileal (Figura 46a). Otras se observaron en diferentes estadíos de replicación en el citoplasma de numerosas células glandulares (Figura 46b), siendo llevadas muchas de ellas por macrófagos interepiteliales hacia la parte basal del epitelio (Figuras 46c y d). También, se formaron algunas vacuolas parasitóforas incipientes rodeadas de una gran cantidad de gránulos, además, se apreció que muchas esporas que se encontraron libres y dentro del citoplasma de las células de Paneth, con sus gránulos citoplasmáticos muy reactivos y otras dirigiéndose hacia algunos vasos sanguíneos (Figuras 46e y f).

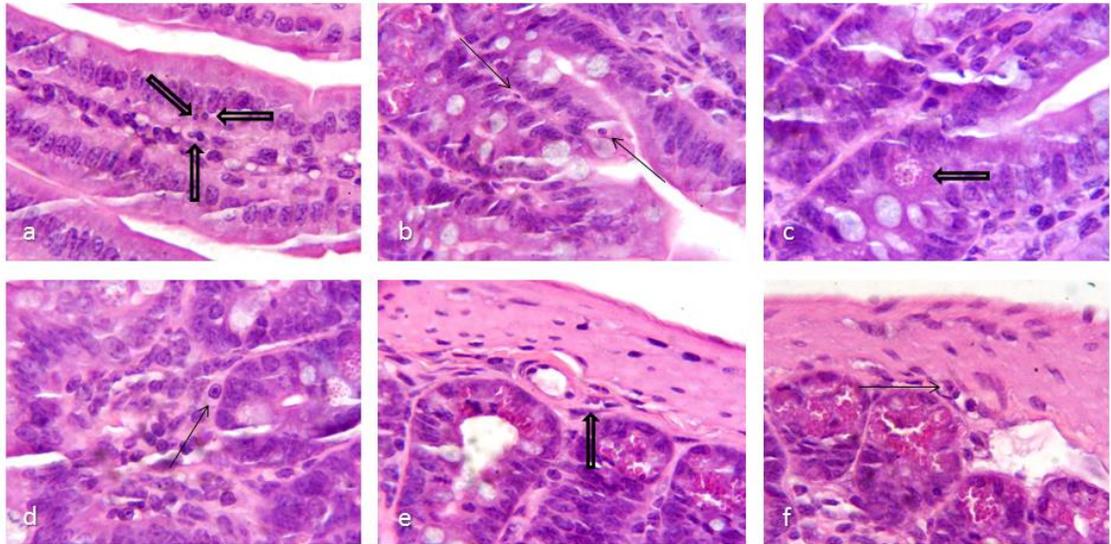


Figura 46. Íleon. a) Presencia de tres esporas maduras de *E. cuniculi* penetrando hacia el interior de la vellosidad del íleon. (Ver flechas huecas). b) Esporas de *E. cuniculi* en citoplasma de epitelio glandular. (Ver flechas). c) Formación de vacuola parasitófora incipiente en el citoplasma del epitelio glandular. (Ver flecha hueca). d) Espora madura de *E. cuniculi* dentro de un macrófago interepitelial, el cual se dirige hacia la base del epitelio. (Ver flecha). e y f) Esporas maduras de *E. cuniculi* libres dentro del citoplasma de las células de Paneth y dirigiéndose hacia la luz de un vaso sanguíneo. (Ver flecha hueca y flecha, respectivamente). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.14.2. Íleon (Tinción de Azul de Tricromo):

Algunas esporas maduras de *E. cuniculi* se encontraron dentro de las vellosidades del íleon, otras más se observaron iniciando su proceso de ingreso hacia el interior de la vellosidad intestinal por endocitosis, y otras tantas por la ruta de los vasos quilíferos, así como de los vasos sanguíneos (Figuras 47a y b). Es importante señalar, la formación de vacuolas parasitóforas en el citoplasma de las células glandulares, así como la presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* dentro de las células de Paneth, las cuales muestran reactividad marcada de sus gránulos citoplasmáticos (Figuras 47c, d y e). Sin embargo, se apreció en varias porciones del íleon, una marcada depleción de

los gránulos citoplasmáticos, en numerosas células de Paneth las cuales se apreciaron invadidas de numerosas esporas maduras (Figuras 47f).

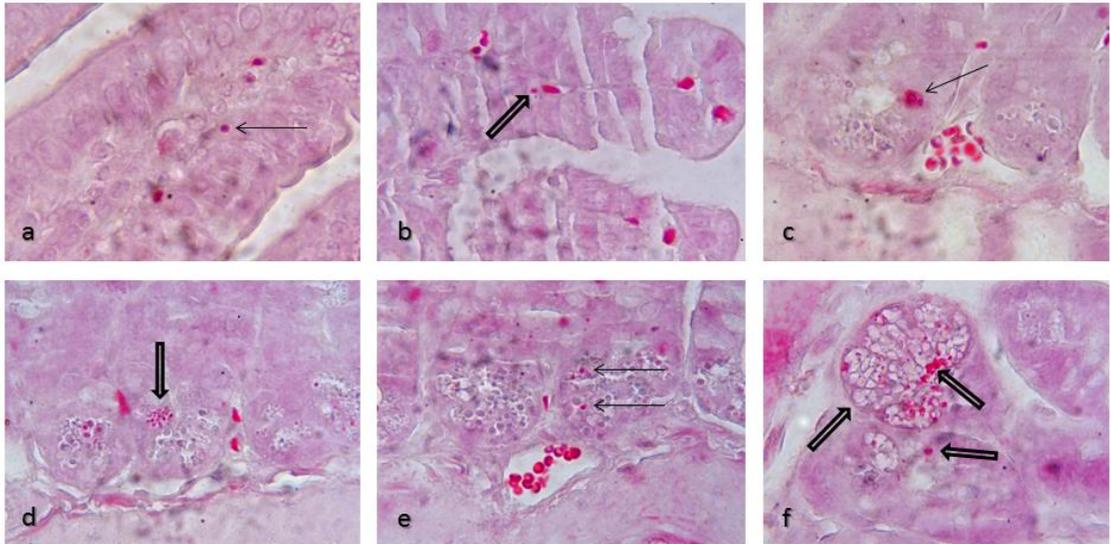


Figura 47. Íleon. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi*, internándose desde el borde epitelial de la vellosidad del íleon hacia un vaso quilífero. (Ver flecha). b) Espora madura de *E. cuniculi* iniciando su proceso de internamiento, a través de un vaso quilífero. (Ver flecha hueca). c) Presencia de esporas de *E. cuniculi* atrapadas en citoplasma de células glandulares, tratando de formar una incipiente vacuola parasitófora y cerca de un vaso sanguíneo. (Ver flecha). d) Presencia de una vacuola parasitófora de *E. cuniculi* en citoplasma de una célula glandular y cerca de células de Paneth con sus gránulos muy reactivos. (Ver flecha hueca). e) Esporas maduras de *E. cuniculi* dentro de células de Paneth con sus gránulos muy reactivos. (Ver flechas). f) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* dentro de células de Paneth con depleción marcada de los gránulos, (nótese los espacios vacíos). (Ver flechas huecas). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.14.3. Íleon (Tinción de Gram):

En la mucosa del íleon, se apreciaron a varias esporas ovaladas, otras redondas, así como maduras e inmaduras de *E. cuniculi*, las cuales van iniciando su internamiento al interior de la vellosidad intestinal, a través de endocitosis, otras tantas se encontraron dentro de vasos quilíferos (Figuras 48a y b). También se observaron macrófagos con esporas en su interior llevándolas

a la base del epitelio (Figura 48c). Por otro lado, se apreció la formación de numerosas e incipientes vacuolas parasitóforas en el citoplasma de numerosas células glandulares, junto a numerosas células de Paneth las cuales presentaron sus gránulos, muy reactivos (Figuras 48d y e). Asimismo, en algunas porciones del íleon, se encontraron en numerosas células de Paneth, amplias áreas de marcada depleción de los gránulos citoplasmáticos, las cuales se observaron invadidas de numerosas esporas maduras (Figura 48f).

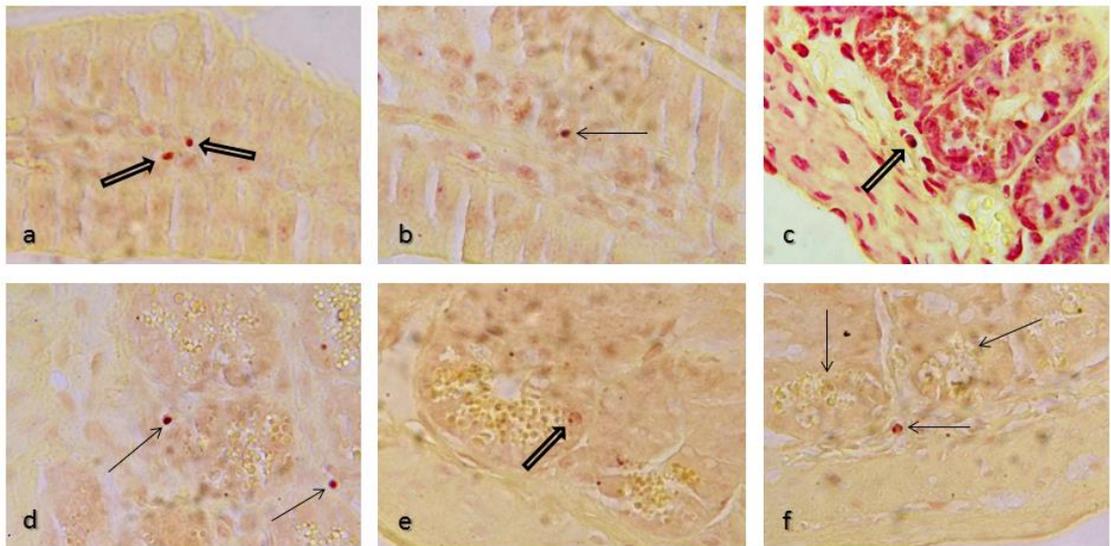


Figura 48. Íleon. a y b) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi* dentro de un vaso quilífero. (Ver flechas huecas y flecha, respectivamente). c) Espora madura de *E. cuniculi* atrapada por un macrófago en el borde del epitelio del íleon. (Ver flecha hueca). d y e) Esporas maduras de *E. cuniculi* en citoplasma de células glandulares, rodeadas de células de Paneth con sus gránulos muy reactivos. (Ver flechas y flecha hueca, respectivamente). f) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* en espacio interglandular y células de Paneth con depleción marcada de los gránulos citoplasmáticos, (nótese los espacios vacíos). (Ver flechas). Tinción de Gram. 100X.

**Esquema de Distribución de Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* y
Hallazgos Celulares en Epitelio Ileal de Ratones Balb/c**

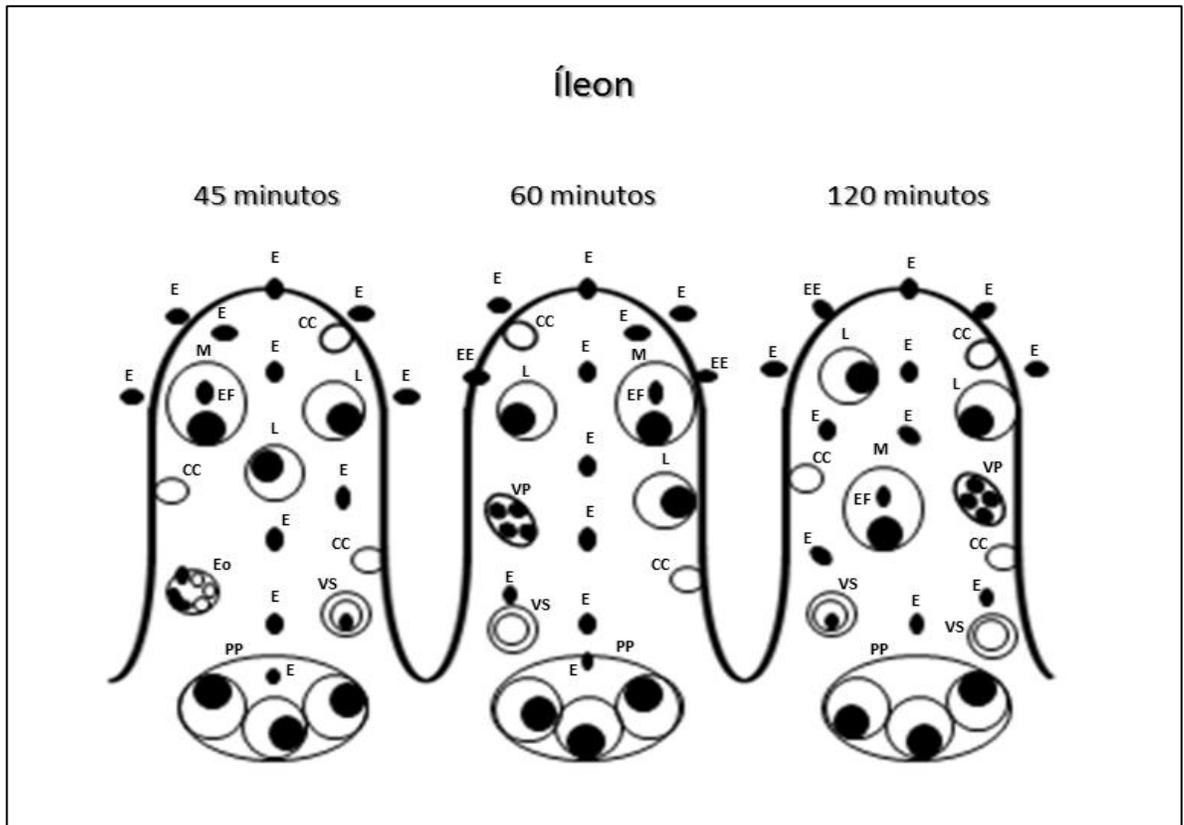


Figura 49. E) Esporas maduras alrededor del epitelio ileal, libres en región de los vasos quilíferos, así como espacios intersticiales, EE) Espora ingresando por endocitosis al interior de la vellosidad ileal, M) Macrófago con esporas en su interior, EF) Esporas fagocitadas, L) Linfocitos intraepiteliales activos, VP) Vacuolas parasitóforas incipientes, Eo) Eosinófilos con esporas en su interior, PP) Placas de Peyer, VS) Vaso sanguíneo con espora en su interior, CC) Célula caliciforme.

4.15. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (45 minutos).

4.15.1. Ciego (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se apreciaron escasas esporas de *E. cuniculi* sobre la mucosa cecal, la gran mayoría, iniciaron su proceso de migración a través de endocitosis, otras más, se transportan a través de las uniones intercelulares, algunas más, exhiben sus divisiones celulares en fase diporoblástica en el citoplasma de algunas células glandulares (Figuras 50a y b). Asimismo, otras esporas se encontraron en la lámina propia del ciego, algunas en la base de las células glandulares mucosas y el resto tratando de ingresar a los vasos sanguíneos y siendo rodeados de algunos eosinófilos (Figuras 50c y d). Por otro lado, se apreció una discreta reactividad de células mononucleares principalmente por linfocitos y células plasmáticas, además de apreciarse a algunas esporas dirigiéndose a algunos vasos sanguíneos de la lámina propia (Figuras 50e y f). No se apreció la formación de vacuolas parasitóforas.

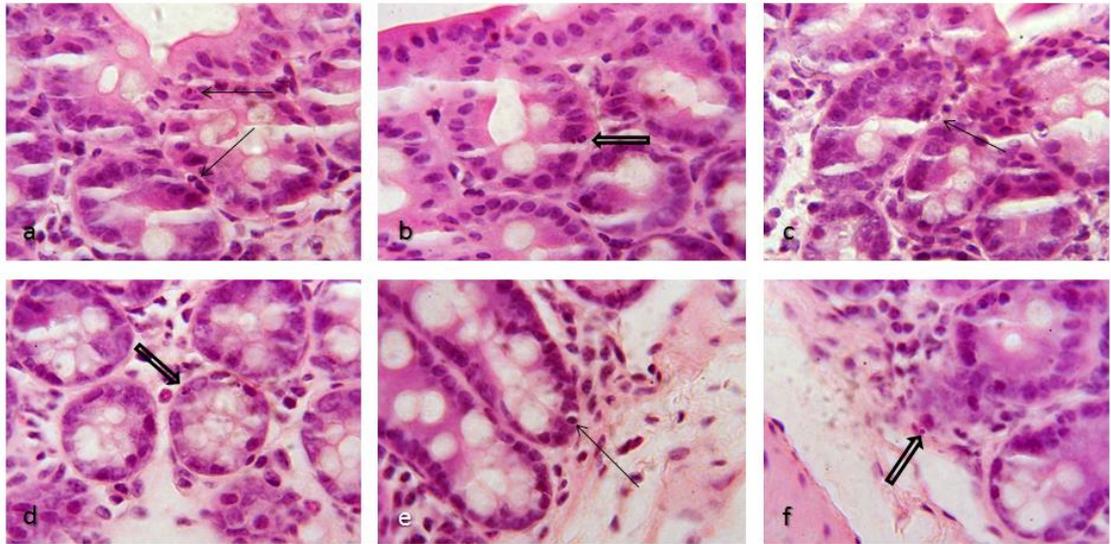


Figura 50. Ciego. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* en parte interna del epitelio cecal. (Ver flechas). b) Espora de *E. cuniculi* en fase diporoblástica en citoplasma de célula glandular. (Ver flecha hueca). c) Espora madura de *E. cuniculi* en espacio interglandular. (Ver flecha). d) Espora de *E. cuniculi* dentro del citoplasma de una glándula mucosa y rodeada de un eosinófilo. (Ver flecha hueca). e) Espora madura de *E. cuniculi* libre en lámina propia. (Ver flecha). f) Presencia de una espora libre de *E. cuniculi* cerca de un vaso sanguíneo en lámina propia. (Ver flecha hueca). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.15.2. Ciego (Tinción de Azul de Tricromo):

Sobre la mucosa cecal, se observaron escasas esporas de *E. cuniculi*, en donde algunas de ellas exhiben diferentes grados de maduración, tamaño y morfología, otras fueron iniciando su proceso de ingreso hacia el interior, a través de endocitosis (Figuras 51a, b y c). Cabe mencionar que se apreciaron a otras tantas, en las uniones intercelulares (Figuras 51d y e). Por otro lado, también se encontraron numerosos macrófagos con esporas en el interior de su citoplasma, llegando a la lámina propia del epitelio, así como esporas libres cerca de los vasos sanguíneos de esta misma área (Figura 51f). La formación de vacuolas parasitóforas estuvo ausente.

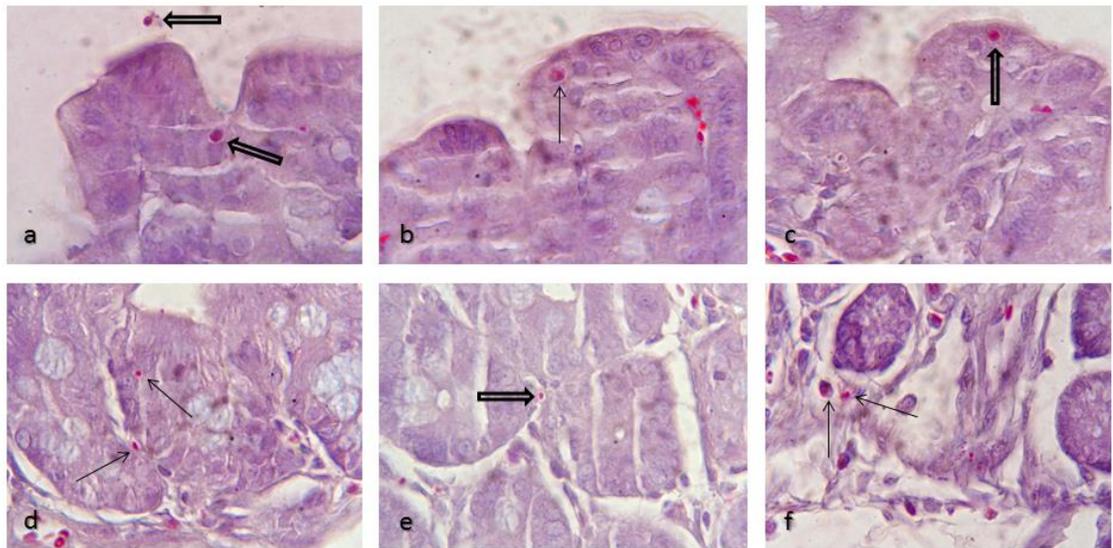


Figura 51. Ciego. a) Presencia de varias esporas maduras de *E. cuniculi* una en el borde epitelial del ciego y la otra iniciando penetración en el citoplasma del epitelio cecal por endocitosis. (Ver flechas huecas). b y c) Esporas de *E. cuniculi* iniciando ingreso al parecer por el proceso de endocitosis, en la porción apical del epitelio del ciego. (Ver flecha y flecha hueca, respectivamente). d y e) Esporas de *E. cuniculi* iniciando internamiento, a través de las uniones intercelulares. (Ver flechas y flecha hueca, respectivamente). f) Presencia de esporas de *E. cuniculi* llegando a lámina propia del epitelio, a través de fagocitosis por macrófago interepitelial, así como por endocitosis. (Ver flechas). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.15.3. Ciego (Tinción de Gram):

A nivel de la mucosa de esta porción intestinal, se observan a numerosas esporas de *E. cuniculi*, tratando de ingresar al interior del epitelio cecal a través de endocitosis (Figuras 52a, b y c). En región de la lámina propia, se apreciaron esporas internándose, a través de las uniones intercelulares e interglandulares, así como por fagocitosis, a través de macrófagos intraepiteliales alrededor de las células glandulares (Figuras 52d, e y f). No se apreció la formación de vacuolas parasitóforas.

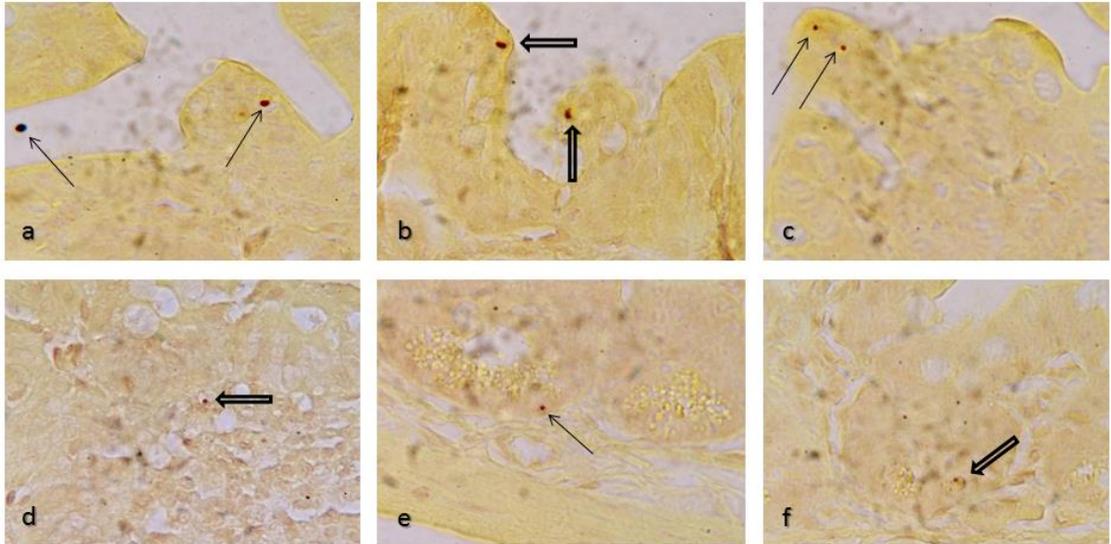


Figura 52. Ciego. a) Presencia de varias esporas maduras de *E. cuniculi* una libre, rodeando el borde de la vellosidad intestinal y la otra en el interior de la vellosidad cecal, penetrando por el fenómeno de la endocitosis. (Ver flechas). b y c) Presencia de esporas maduras e inmaduras de *E. cuniculi* ingresando al interior de la vellosidad intestinal por el fenómeno de la endocitosis. (Ver flechas huecas y flechas, respectivamente). d y e) Presencia de esporas de *E. cuniculi* en región de lámina propia y alrededor de células de Paneth. (Ver flecha hueca y flecha, respectivamente). f) Presencia de espóra de *E. cuniculi* dentro de un macrófago intercelular, en lámina propia. (Ver flecha hueca). Tinción de Gram. 100X.

4.16. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (60 minutos).

4.16.1. Ciego (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

En el interior de la mucosa cecal, se observaron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, exhibiendo diferentes grados de maduración, tamaño y morfología, la mayoría ingresaron a través de endocitosis (Figuras 53a y b). Otras tantas, se apreciaron, a través de los espacios intercelulares. Cabe mencionar que en este tiempo, se apreciaron esporas maduras en vasos sanguíneos, otras más se encontraron en el endotelio vascular de la lámina propia del epitelio cecal (Figuras 53c, d, e y f). No se apreció la formación de vacuolas parasitóforas.

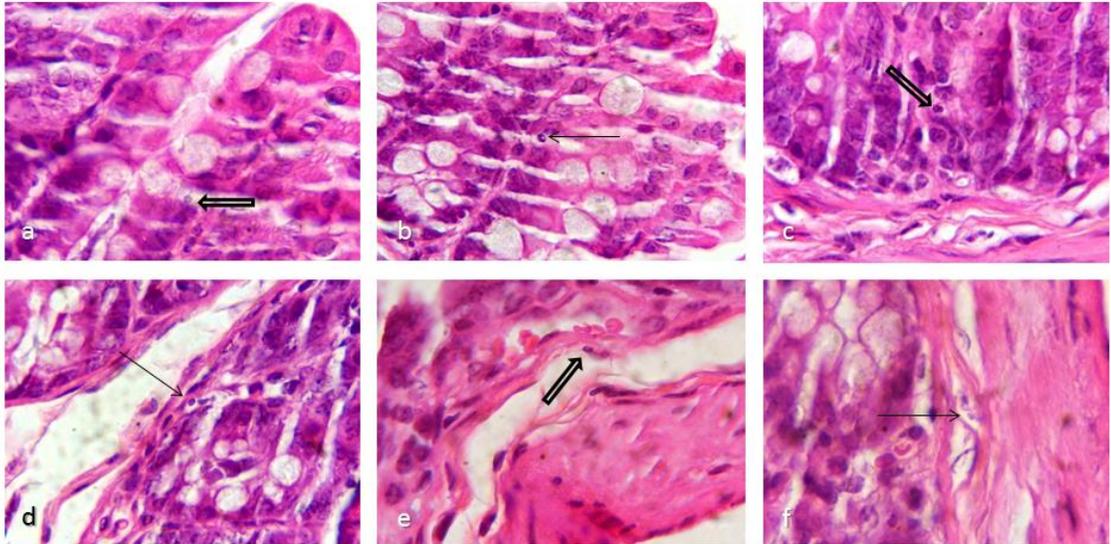


Figura 53. Ciego. a) Presencia de una espora madura de *E. cuniculi* ingresando al interior del epitelio cecal por el fenómeno de endocitosis. (Ver flecha hueca). b) Espora madura de *E. cuniculi* dirigiéndose hacia un vaso quilífero en el epitelio del ciego. (Ver flecha). c) Esporas de *E. cuniculi* maduras y libres, dirigiéndose hacia lámina propia del epitelio cecal. (Ver flecha hueca). d) Espora de *E. cuniculi* llegando a lámina propia, a través, de un vaso sanguíneo. (Ver flecha). e) Espora madura de *E. cuniculi* presente en endotelio vascular de lámina propia. (Ver flecha hueca). f) Espora madura de *E. cuniculi* presente en lámina propia del epitelio cecal. (Ver flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.16.2. Ciego (Tinción de Azul de Tricromo):

En mucosa cecal, se exhibieron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, penetrando a su interior, a través de endocitosis. Otras más, se observaron alrededor de vasos sanguíneos y otras en espacios intercelulares (Figuras 54a, b y c). Es importante mencionar, que algunas esporas maduras de *E. cuniculi*, también estuvieron presentes dentro de capilares de la capa muscular del epitelio cecal, mientras que otras se encontraron libres en el tejido conectivo de la lámina propia, debajo del epitelio glandular de dicha porción intestinal (Figuras 54d, e y f). No se encontró evidencia en la formación de vacuolas parasitóforas.

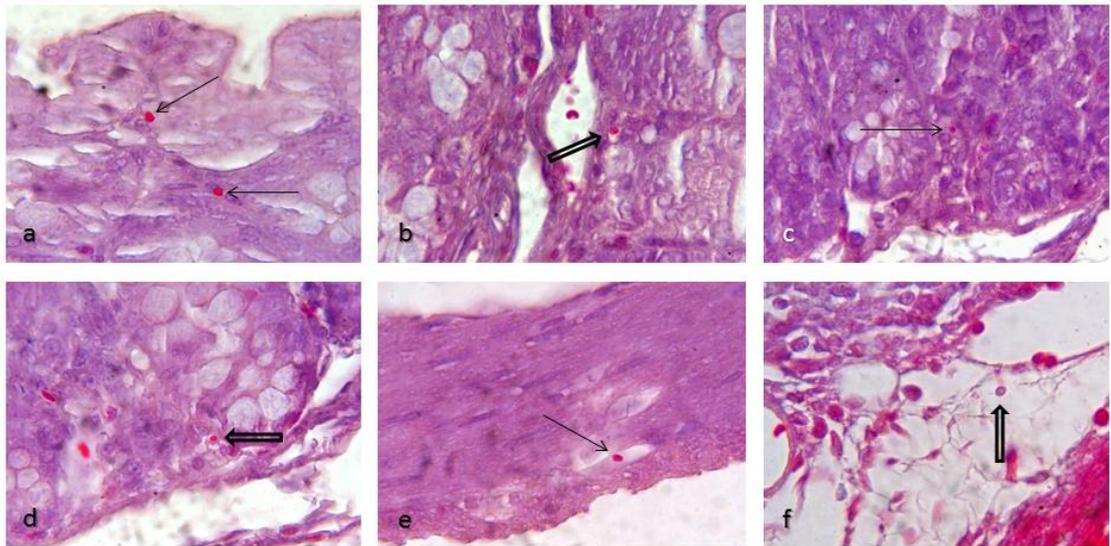


Figura 54. Ciego. a) Presencia de dos esporas maduras de *E. cuniculi* iniciando penetración en el epitelio cecal a través del fenómeno de endocitosis. (Ver flechas). b) Espora libre de *E. cuniculi* tratando de llegar a un vaso sanguíneo. (Ver flecha hueca). c) Espora libre de *E. cuniculi* ingresando a través del espacio interglandular en epitelio del ciego. (Ver flecha). d) Presencia de espora de *E. cuniculi*, en epitelio glandular tratando de llegar a la lámina propia. (Ver flecha hueca). e) Presencia de una espora de *E. cuniculi*, dentro de un capilar en capa muscular del epitelio cecal. (Ver flecha). f) Presencia de espora libre de *E. cuniculi* entre fibras de tejido conectivo de la lámina propia. (Ver flecha hueca). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.16.3. Ciego (Tinción de Gram):

A nivel de la mucosa cecal, se apreciaron a numerosos macrófagos intraepiteliales fagocitando a numerosas esporas de *E. cuniculi* y en lámina propia debajo del epitelio glandular (Figuras 55a, b y c). También se observó que muchas de ellas, empezaron a internarse hacia las porciones basales del epitelio del ciego, a través de endocitosis y otras tantas, por medio de las uniones interepiteliales e interglandulares (Figuras 55d y e). Por otro lado, se logró detectar la presencia de macrófagos fagocitando esporas en el tejido

conectivo de la lámina propia (Figura 55f). No se lograron apreciar vacuolas parasitóforas en este tiempo.

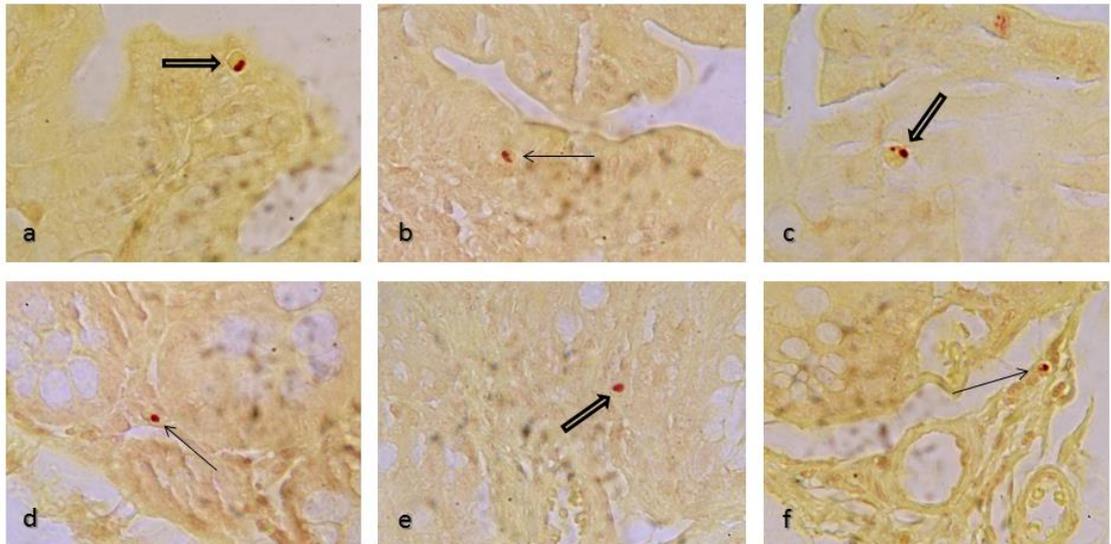


Figura 55. Ciego. a) Presencia de un macrófago con espora de *E. cuniculi* en su interior e ingresando al interior del epitelio del ciego. (Ver flecha hueca). b y c) Esporas de *E. cuniculi* en el interior de la mucosa cecal, una ingresando a través del proceso de endocitosis y la otra dentro de un macrófago intraepitelial, a través del proceso de fagocitosis. (Ver flecha y flecha hueca, respectivamente). d y e) Presencia de esporas libres de *E. cuniculi*, ambas migrando a través de los espacios intercelulares e interglandulares hacia la lámina propia. (Ver flecha y flecha hueca, respectivamente). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* fagocitada por un macrófago, en tejido conectivo de la lámina propia debajo del epitelio glandular. (Ver flecha). Tinción de Gram. 100X.

4.16.4. Ciego (Calcoflúor-white):

Se observaron esporas maduras de *E. cuniculi*, en el interior de la mucosa cecal y alrededor de un vaso sanguíneo. (Figura 56a).

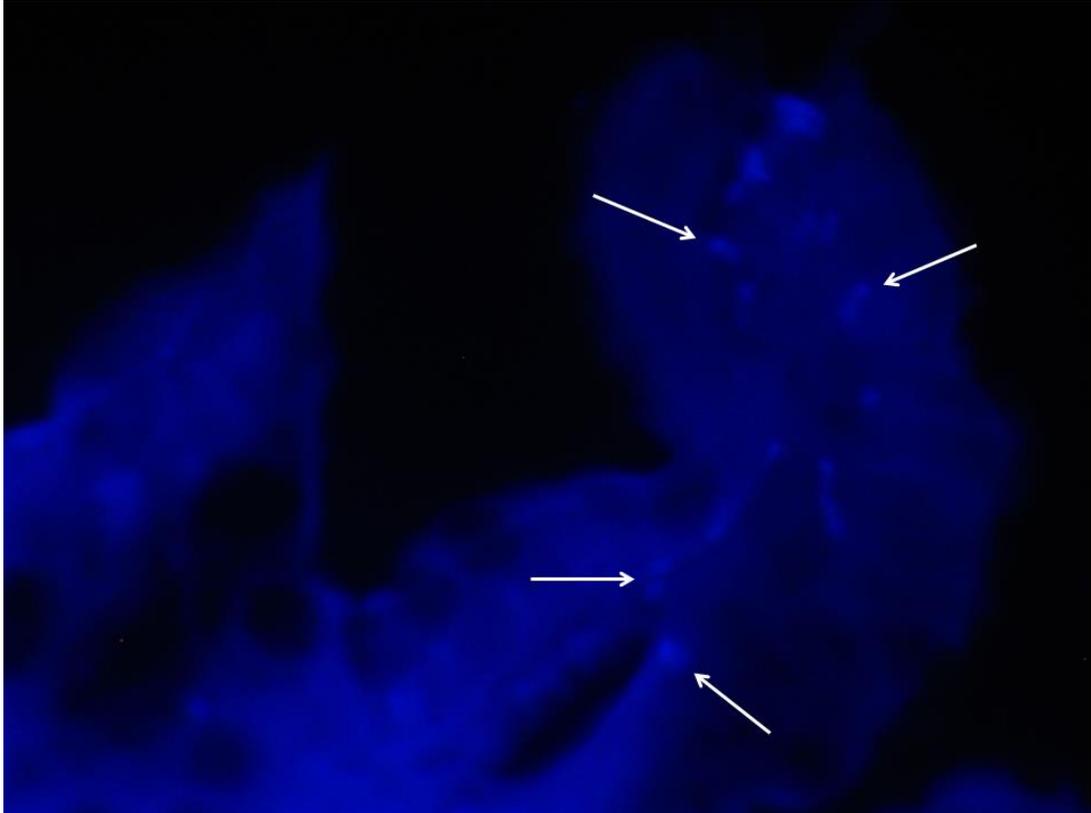


Figura 56. Íleon. a) Presencia de esporas maduras de *E. cuniculi*, dentro de la mucosa cecal y alrededor de un vaso sanguíneo. (Ver flechas). Calcoflúor-white. 100X.

4.17. Alteraciones Celulares Observadas en Ciego de Ratones Balb/c Inoculados con Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* (120 minutos).

4.17.1. Ciego (Tinción de Hematoxilina y Eosina):

Se observaron escasas esporas de *Encephalitozoon cuniculi* sobre la mucosa del ciego, muchas de ellas, empezaron a internarse, a través del fenómeno de endocitosis y otras se encontraron siendo capturadas por numerosos macrófagos intraepiteliales (Figuras 57a, b y c). A nivel de las uniones interepiteliales e interglandulares, se apreciaron a otras esporas maduras siguiendo la ruta hacia las porciones basales del epitelio cilíndrico simple (Figuras 57d, e y f). Por otro lado, no se observó la formación de vacuolas parasitóforas en el interior del epitelio glandular del ciego.

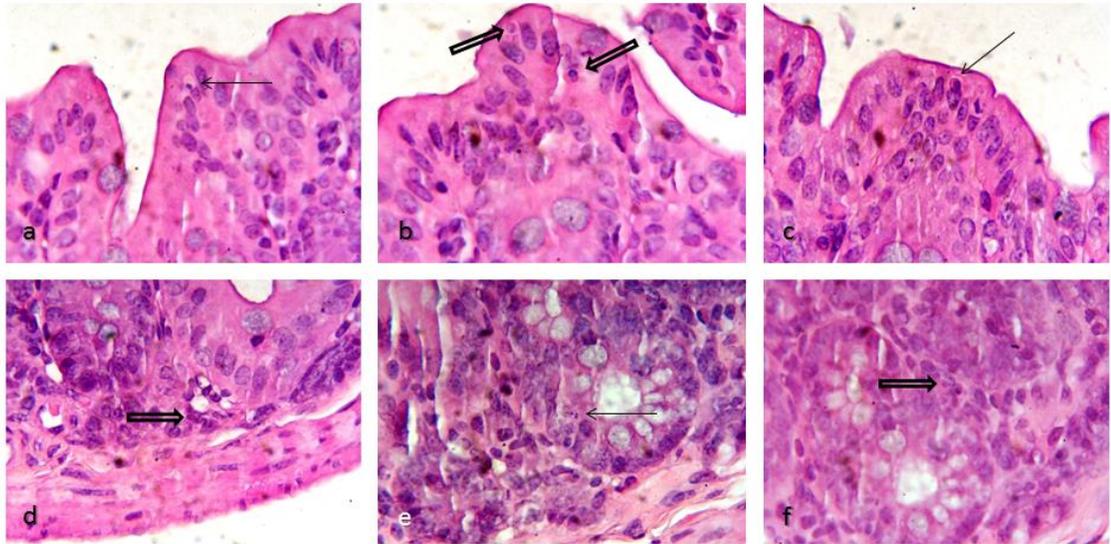


Figura 57. Ciego. a) Presencia de espora madura de *E. cuniculi* ingresando al interior del epitelio del ciego al parecer por endocitosis. (Ver flecha). b y c) Esporas de *E. cuniculi* atrapadas por macrófagos intraepiteliales y otra libre en el citoplasma del epitelio cecal. (Ver flechas huecas y flecha, respectivamente). d) Espora madura de *E. cuniculi* iniciando internamiento a través de una unión intraepitelial. (Ver flecha hueca). e) Espora madura de *E. cuniculi* dentro del epitelio glandular. (Ver flecha). f) Espora madura de *E. cuniculi* iniciando ingreso a través de una unión intraglandular. (Ver flecha). Tinción de Hematoxilina y Eosina. 100X.

4.17.2. Ciego (Tinción de Azul de Tricromo):

En el interior del borde de la mucosa cecal, se observaron a numerosas esporas de *E. cuniculi*, exhibiendo diferentes tamaños, gran parte de ellas iniciaron su proceso de migración, a través de endocitosis, otras se encontraron dentro del citoplasma de numerosos macrófagos intracelulares, a través de fagocitosis (Figuras 58a, b, c y d). Por otro lado, algunas de estas esporas también se apreciaron migrando, a través de las uniones interepiteliales e interglandulares, dirigiéndose hacia las porciones basales del epitelio del ciego (Figuras 58e y f). Asimismo, no se apreció la formación de vacuolas parasitóforas en el citoplasma de células glandulares.

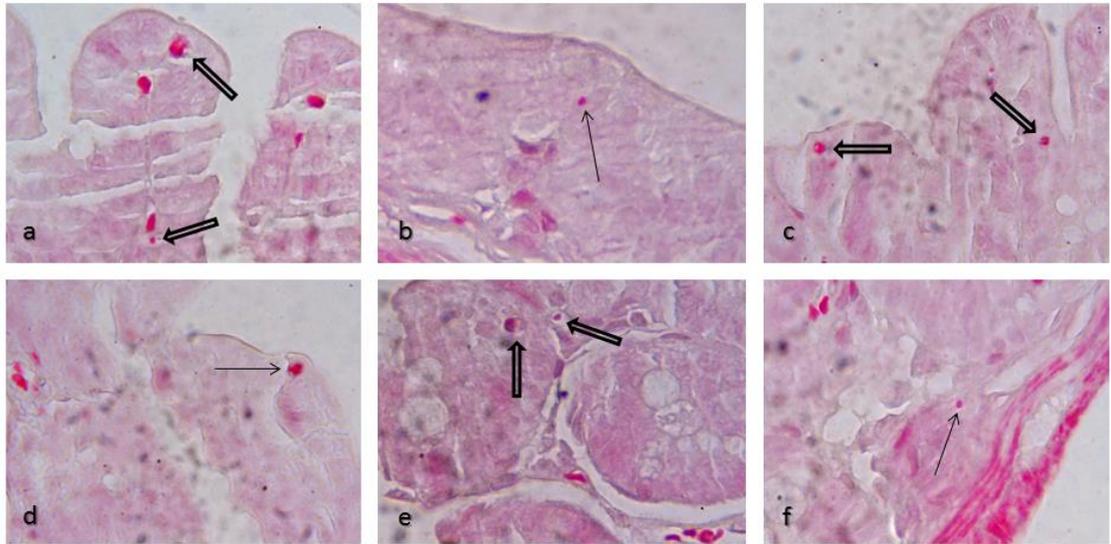


Figura 58. Ciego. a) Presencia de varias esporas maduras de *E. cuniculi* en el interior del epitelio del ciego. (Ver flechas huecas). b y c) Esporas maduras de *E. cuniculi* iniciando internamiento al parecer por el proceso de endocitosis. (Ver flecha y flechas huecas, respectivamente). d) Espora madura de *E. cuniculi* siendo fagocitada por un macrófago intraepitelial. (Ver flecha). e) Presencia de una espora de *E. cuniculi* dentro del citoplasma de un macrófago y espora libre, ingresando a través de unión intercelular. (Ver flechas huecas). f) Presencia de espora de *E. cuniculi* internándose a la porción basal del epitelio cecal. (Ver flecha). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.17.3. Ciego (Tinción de Gram):

Numerosos macrófagos intraepiteliales están presentes a nivel de la mucosa de esta porción intestinal, se les apreció con una marcada actividad fagocítica de esporas de *E. cuniculi*, gran parte de estos macrófagos intraepiteliales estuvieron migrando junto con las esporas fagocitadas, hacia el interior del epitelio del ciego (Figuras 59a, b y c). Otras esporas fueron migrando solas, a través de los espacios interepiteliales e interglandulares hacia la lámina propia y base del epitelio de las vellosidades cecales. También se apreciaron a otros macrófagos transportando a otras esporas, a través de las mismas rutas antes mencionadas. Algunas esporas también se observaron

migrando hacia la base de la mucosa del ciego y algunas esporas se encontraron en diferentes fases de división celular (diporoblástico y tetraporoblástico) (Figuras 59d, e y f). Por otro lado, no se observó la formación de vacuolas parasitóforas en el citoplasma de células glandulares.

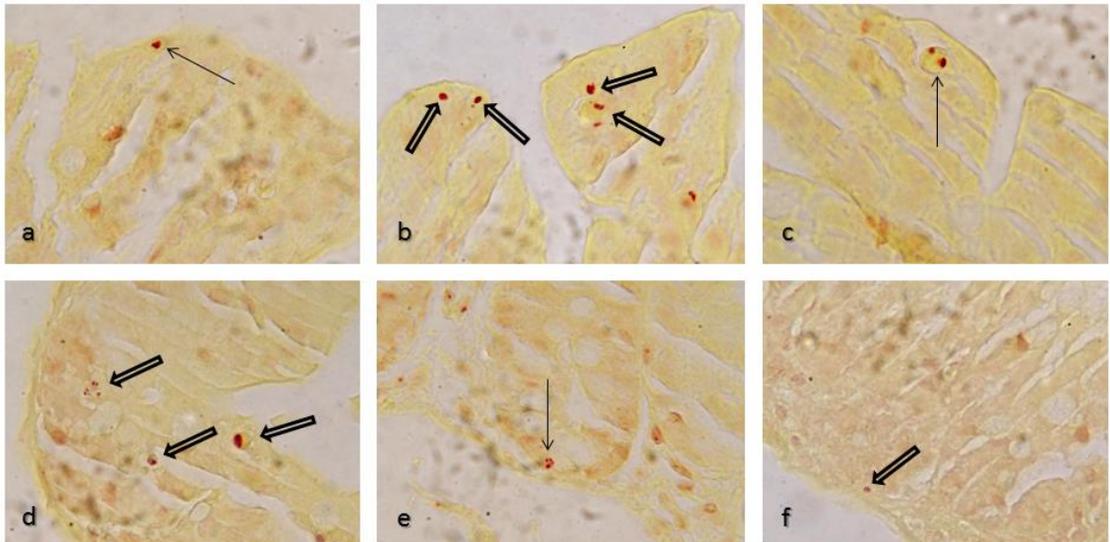


Figura 59. Ciego. a, b y c) Presencia de numerosas esporas de *E. cuniculi* en el interior de algunos macrófagos intraepiteliales y su presencia en el interior del epitelio cecal. (Ver flechas y flechas huecas, respectivamente). d y e) Esporas de *E. cuniculi* dirigiéndose hacia el interior del epitelio del ciego, algunas se aprecian en diferentes fases de división celular (diporoblástico y tetraporoblástico). (Ver flechas huecas y flecha, respectivamente). f) Presencia de espора de *E. cuniculi* en la porción basal del epitelio cecal. (Ver flecha hueca). Tinción de Gram. 100X.

Esquema de Distribución de Esporas de *Encephalitozoon cuniculi* y Hallazgos Celulares en Epitelio Cecal de Ratones Balb/c

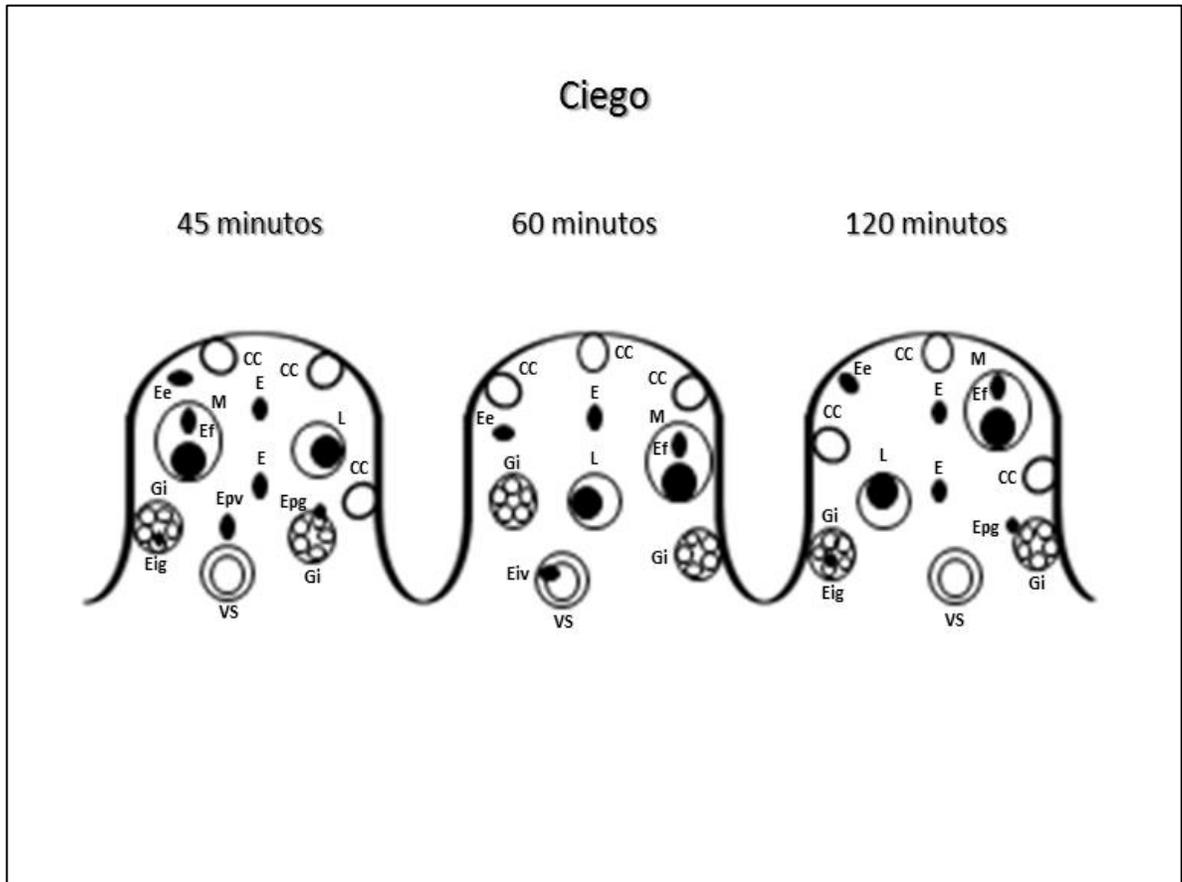


Figura 60. E) Esporas maduras dentro del epitelio cecal y libres en espacios intersticiales. Ee) Espora ingresando al interior de la mucosa del ciego por endocitosis. M) Macrófago con esporas en su interior. Ef) Esporas fagocitadas. L) Linfocitos intraepiteliales. CC) Célula caliciforme. Epg) Epitelio glandular. Eiv) Espora intravascular. VS) Vaso sanguíneo. Epv) Espora perivascular. Eig) Espora intraglandular. Gi) Glándula intraepitelial.

4.18. Observación de los Frotis Sanguíneos

Las muestras sanguíneas de los grupos de animales tratados de 45 minutos, 60 minutos, 120 minutos post- infección y de los grupos control, fueron teñidas con las tinciones de Gram, Azul de Tricromo, Romanowsky y Calcoflúor-white, esto con la finalidad de determinar la presencia o la ausencia de esporas circulantes de *E. cuniculi*, su cantidad y distribución, además de algunos hallazgos y cambios en la morfología de los eritrocitos y demás células sanguíneas. Cabe mencionar, que a la fecha no hay información disponible con respecto al diseño de este estudio, por tanto, los datos obtenidos serán de gran utilidad, para estudios comparativos que se implementen en la investigación de la patogenia de este microsporidio.

4.18.1. Frotis Sanguíneos con Tinción de Gram

Grupo 1 (45 minutos): Se pudieron observar al microscopio de luz en un frotis sanguíneo con tinción de Gram, unas estructuras similares a esporas dentro de los eritrocitos, esporas liberando el tubo polar, esporas libres y esporas alrededor de eritrocitos (Figura 61a y b).

Grupo 2 (60 minutos): En este grupo también se apreciaron estructuras similares a esporas dentro de eritrocitos, esporas liberando el tubo polar, esporas libres y esporas alrededor de eritrocitos (Figura 62a y b).

Grupo 3 (120 minutos): A este tiempo de inoculación, también se observaron estructuras similares a esporas dentro de eritrocitos, esporas libres, esporas alrededor de eritrocitos, esporas liberando el tubo polar, otras esporas alrededor de neutrófilos y algunas más dentro de los mismos (Figura 63a y b).

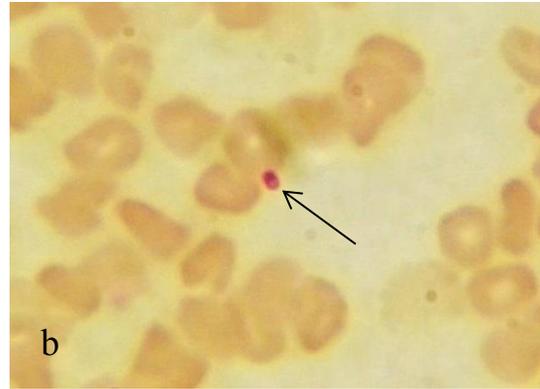
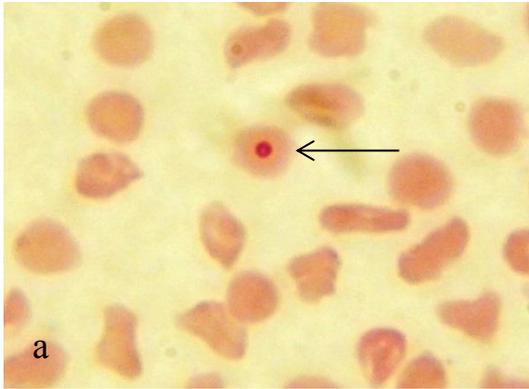


Figura 61. Grupo 1 (45 minutos). a) Estructura similar a espora dentro de eritrocito (flecha). b) Figura similar a espora adyacente a un eritrocito (flecha). Tinción de Gram. 100X.



Figura 62. Grupo 2 (60 minutos). a) Figura similar a espora adyacente a eritrocito (flecha). b) Estructura similar a espora dentro de un eritrocito (flecha). Tinción de Gram. 100X.

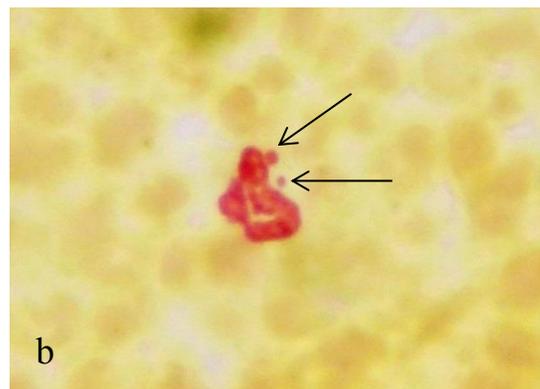
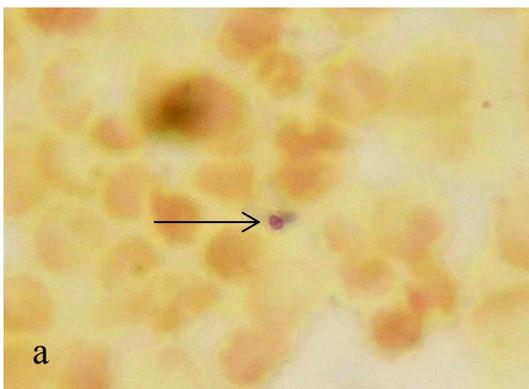


Figura 63. Grupo 3 (120 minutos). a) Espora madura en un eritrocito (flecha). b) Esporas adyacentes a un neutrófilo (flechas). Tinción de Gram. 100X.

4.18.2. Frotis Sanguíneos con Tinción de Azul de Tricromo

Grupo 1 (45 minutos): Se observaron estructuras similares a esporas dentro de eritrocitos, otras libres y algunas esporas liberando el tubo polar (Figura 64a y b).

Grupo 2 (60 minutos): Se encontraron estructuras similares a esporas dentro y alrededor de eritrocitos, mientras que algunas más salían del citoplasma de numerosos eritrocitos y otras se encontraban liberando el tubo polar (Figura 65a y b).

Grupo 3 (120 minutos): Se observaron estructuras similares a esporas dentro de eritrocitos, libres y adyacentes a eritrocitos, asimismo hubo escasas esporas liberando el tubo polar (Figura 66a y b).

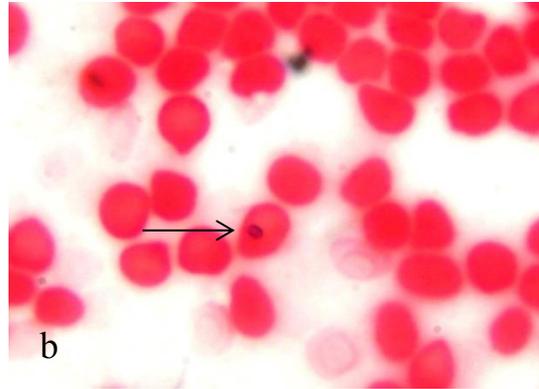
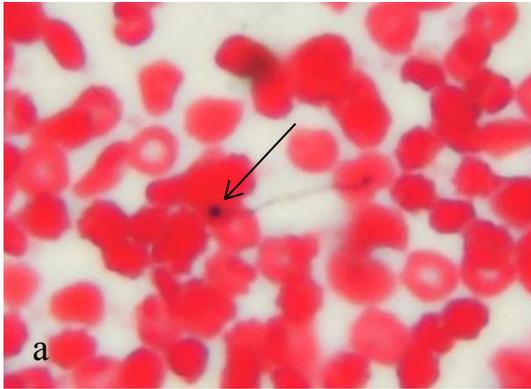


Figura 64. Grupo 1 (45 minutos). a) Espora dentro de un eritrocito con extrusión del tubo polar dirigiéndola hacia otro eritrocito (flecha). b) Espora dentro de un eritrocito (flecha). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

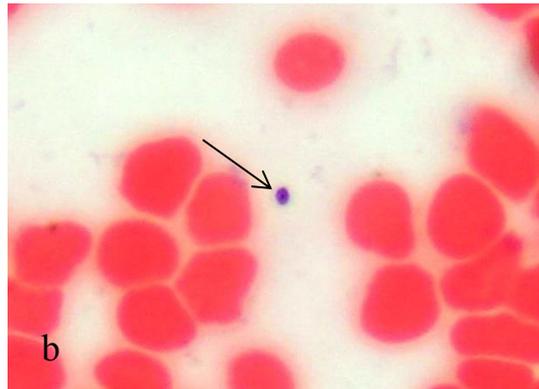


Figura 65. Grupo 2 (60 minutos). a) Espora libre madura alrededor de eritrocitos (flecha). b) Espora libre madura (flecha). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.



Figura 66. Grupo 3 (120 minutos). a) Esporas maduras al parecer liberando tubo polar en citoplasma de eritrocitos (flechas). Tinción de Azul de Tricromo. 100X.

4.18.3. Frotis Sanguíneos con Tinción de Romanowsky

Grupo 1 (45 minutos): Se observaron numerosas estructuras similares a esporas alrededor de eritrocitos, otras libres y algunas esporas alrededor de neutrófilos (Figura 67a y b).

Grupo 2 (60 minutos): Se apreciaron estructuras similares a esporas dentro de eritrocitos, así como de esporas libres, moderada cantidad de esporas alrededor de eritrocitos y escasas esporas alrededor de neutrófilos y otras liberando el tubo polar. Por otro lado, hay algunas esporas dentro de neutrófilos (Figura 68a y b).

Grupo 3 (120 minutos): Se observaron estructuras similares a esporas dentro de eritrocitos, esporas libres, esporas alrededor de eritrocitos, esporas liberando el tubo polar, otras esporas alrededor de neutrófilos y algunas más dentro de los mismos (Figura 69a y b).

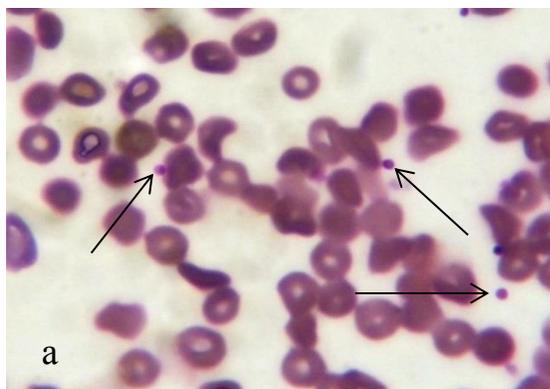


Figura 67. Grupo 1 (45 minutos). a) Esporas maduras de *E. cuniculi* alrededor de eritrocitos y libres (flechas). Tinción de Romanowsky. 100X.

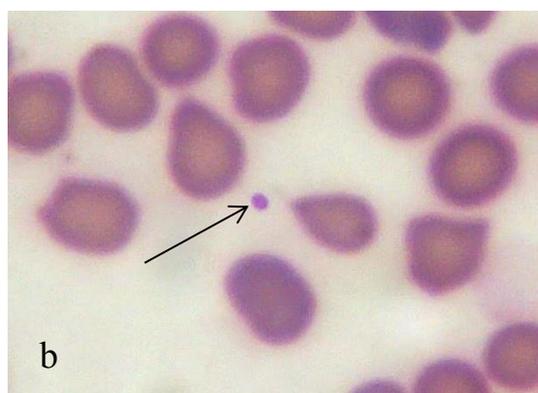


Figura 68. Grupo 2 (60 minutos). a) Espora de *E. cuniculi* dentro del citoplasma de un eritrocito (flecha). b) Espora madura libre y adyacente a un eritrocito (flecha). Tinción de Romanowsky. 100X.

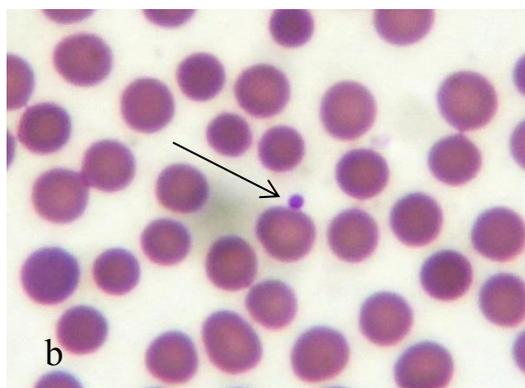


Figura 69. Grupo 3 (120 minutos). a) Espora en citoplasma de eritrocito (flecha). b) Espora en contacto directo con un eritrocito (flecha). Tinción de Romanowsky. 100X.

4.18.4. Frotis Sanguíneos con Calcoflúor-white

Grupo 1 (45 minutos): Se observaron algunas esporas libres y otras alrededor de eritrocitos.

Grupo 2 (60 minutos): Se apreciaron esporas adyacentes a algunos eritrocitos, así como esporas libres (Figura 70a).

Grupo 3 (120 minutos): Se observaron esporas libres y esporas alrededor de eritrocitos (Figura 70b).

Los hallazgos hematológicos más sobresalientes observados en cada grupo experimental, se muestran en la Figura 70.

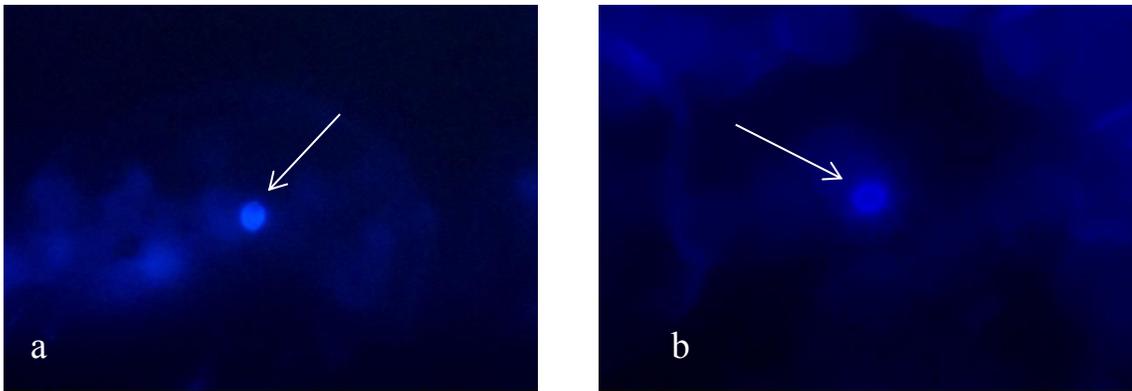


Figura 70. Grupo 2 (60 minutos). a) Espora libre entre eritrocitos (flecha). **Grupo 3 (120 minutos).** b) Espora de *E. cuniculi* en contacto directo con eritrocitos (flecha). Tinción de Calcoflúor-White. 100X.

Esquema de Hallazgos Hematológicos en Ratones Inoculados con *Encephalitozoon cuniculi*

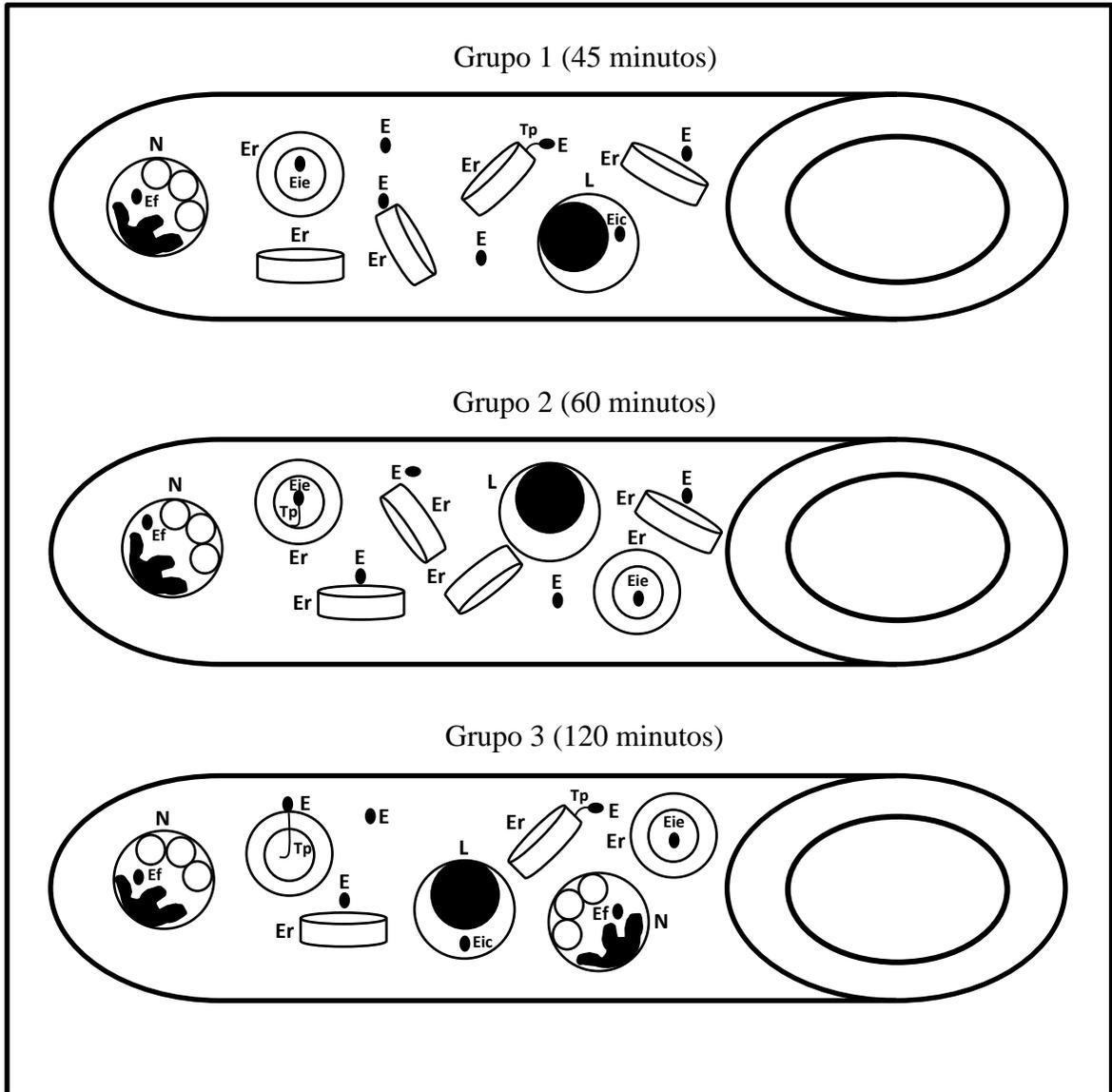


Figura 71. E) Esporas maduras libres y alrededor de eritrocitos y neutrófilos, Er) Eritrocito, N) Neutrófilo, Ef) Espora fagocitada, L) Linfocito, Tp) Tubo polar, Eie) Espora intraeritrocítica, Eic) Espora intracitoplasmática.

5. DISCUSIÓN

En este estudio, pudimos establecer un sistema descriptivo que nos permitió observar las diferentes alteraciones celulares, así como, hallazgos histológicos y hematológicos, asociados a la presencia de las esporas de *E. cuniculi* inoculadas por vía oral, en las diferentes porciones del tracto digestivo y sangre de ratones Balb/c a diferentes tiempos (45, 60 y 120 minutos), de acuerdo a un estudio realizado para determinar la trayectoria que sigue el alimento en esta especie (Tamez-Treviño, E., *et al.*, 1996). Esto, nos permitió entender los mecanismos, que este agente patógeno utilizó para poder invadir a las células huésped, registrar la actividad de las células involucradas en su proceso de captación y fagocitosis, las rutas de acceso para poder diseminarse, a través del sistema circulatorio, así como las alteraciones celulares asociadas al proceso de invasión en las diferentes tunicas y porciones del tracto digestivo.

Algunos cambios macroscópicos que fueron observados en nuestro estudio, como la esplenomegalia y la distensión intestinal, también han sido reportadas en ratones atímicos que fueron inoculados con *E. cuniculi*, por vía intraperitoneal (Didier, E., *et al.*, 1994). Diversos estudios, han mostrado como este agente patógeno, ha desarrollado la habilidad de invadir a diferentes tipos de células, bajo ciertas circunstancias y variables controladas (Cox, J., *et al.*, 1979; Sprague, V & Sanford, H.V., 1971). Como la infección de diferentes tipos de células con diferentes concentraciones de este microsporidio, en donde se encontró que muy pocas células fueron infectadas por el proceso de penetración del tubo polar, en comparación al proceso de la fagocitosis, así como la exposición de los tubos polares dentro de las células, por parte de

estas esporas o la germinación dentro de la célula fagocítica y el escape del fagosoma que madura dentro del lisosoma, además de la positividad para marcadores endosomales tardíos y lisosómicos de las membranas de las vacuolas, que rodeaban a las esporas que ingresaron hacia el interior. (Franzen, C., *et al.*, 2005). Esto correlaciona con nuestra investigación, ya que a nivel gástrico algunas esporas expusieron sus vacuolas posteriores y tubo polar. En ciertas áreas del epitelio, principalmente a los 45 minutos, se observaron algunas esporas en fase de esporonte, tratando de dividirse en dos esporoblastos, parecido a lo reportado en macrófagos de líquido ascítico de un ratón inoculado vía intraperitoneal. (Sprague, V & Sanford, H.V., 1971). Por otro lado, esto contrasta con un estudio reciente en donde se utilizaron conejos inoculados vía oral con esporas de *E. cuniculi*, en los cuales no se detectaron esporas en estómago, esto debido quizá, al tiempo de incubación de 2 semanas post-inoculación (Jeklova, E., *et al.*, 2020). Por vía endocitosis, otras esporas estuvieron en las dilataciones citoplasmáticas, surcos inter-epiteliales y por fagocitosis dentro de macrófagos intraepiteliales. También, formaron incipientes vacuolas parasitóforas y se encontraron dentro de vasos sanguíneos. Por otro lado, se observaron a numerosos eosinófilos, algunos con esporas en su interior.

Un aspecto importante a considerar en la fagocitosis, es el papel de los macrófagos en la captación de estos microorganismos y su posterior diseminación por todo el cuerpo, principalmente, en pacientes con afectaciones en múltiples órganos, formando microabcesos o granulomas y dónde estas células fagocitarias infectadas con estos microsporidios son muy evidentes,

como lo reportado en un dragón barbudo (*Pogona vitticeps*) en el cuál se observaron a macrófagos infectados con *E. pogonae*, en granulomas cerca del corazón. (Sokolova, Y.Y., *et al.*, 2016). Al inicio de una infección, que involucra a los macrófagos residentes en el intestino, estas células reconocen al microorganismo patógeno y responden en forma eficiente, al secretar sustancias quimioatrayentes para reclutar nuevas células, dentro de los que se incluyen a los monocitos, para resolver la infección. Si estas células, no logran matar al patógeno intracelular, se activa una segunda fase, donde, los macrófagos infectados migran de los sitios de infección inicial al sistema linfático, para finalizar en la sangre y los tejidos. (Valencakova, A & Halanova, M., 2012).

En el duodeno, escasas esporas de *E. cuniculi*, se observaron en los vasos quilíferos y otras, fueron fagocitadas por macrófagos intraepiteliales. También, formaron incipientes vacuolas parasitóforas y estuvieron rodeadas de eosinófilos, algunos con esporas en su interior y en lámina propia del epitelio. Otras, dentro de vasos sanguíneos rodeadas de eritrocitos y en capa muscular de la mucosa. Estos descubrimientos, concuerdan con la formación de vacuolas parasitóforas en la mucosa del duodeno, reportado en un paciente humano portador del virus del VIH y la presencia de esporas en la capa muscular de la mucosa, en ratones desnudos atímicos a los 22-29 días post-inoculación vía oral. (Franzen, C., *et al.*, 1995, Gannon, J., 1980).

Hallazgos similares fueron apreciados en el yeyuno, sin embargo algunas esporas se encontraron dentro de agregados linfoides en algunas placas de Peyer, hubo fagocitosis por parte de macrófagos intraepiteliales y en su

citoplasma presentaron diferentes estadios de replicación. También, se observaron esporas en las células de Paneth con sus gránulos eosinofílicos y otras, dentro de vasos sanguíneos e invadiendo el endotelio vascular. Se apreciaron a varios eosinófilos con esporas de *E. cuniculi*, cerca de numerosos vasos sanguíneos y en criptoplasmas linfoides. Un estudio previo, no especificó el segmento intestinal donde se pudieron observar lesiones a nivel de las células epiteliales, sin embargo sugirió que las esporas pueden pasar de la luz intestinal al tejido linfoide adyacente. Esto puede suceder, a través, de pinocitosis en la capa linfopitelial de la cúpula del tejido linfoide o por medio de fagocitosis dentro de la luz intestinal. También, se ha propuesto que las esporas intactas y viables pueden pasar fácilmente del intestino, a las células en las que puede ocurrir su primer ciclo de crecimiento. (Cox, J.C., *et al.*, 1979).

En el caso del íleon, algunas esporas de *E. cuniculi* se observaron siendo capturadas por eosinófilos. También, se encontraron dentro del citoplasma de otros eosinófilos en la base del epitelio y dentro de agregados linfoides en placas de Peyer. Además, se encontraron numerosas esporas libres y otras formando vacuolas parasitóforas incipientes, en el citoplasma de las células de Paneth, las cuales presentaron depleción de sus gránulos citoplasmáticos. Este hallazgo, es muy importante ya que las células de Paneth tienen gránulos de secreción muy abundantes, compuestos de lisozima, α -defensinas, una proteína rica en arginina, otras glucoproteínas y zinc. Por lo que tienen una acción antibacteriana muy importante, debido a su capacidad para fagocitar ciertas bacterias y protozoos, indicando su importante desempeño en la

regulación de la flora bacteriana normal del intestino delgado. (Pawlina, W., 2015).

En ciego, las alteraciones más importantes fue la exhibición de sus divisiones celulares en fase diporoblástica, de algunas esporas de *E. cuniculi* en el citoplasma de algunas células glandulares. También, se encontraron escasas esporas en las uniones intercelulares y en el endotelio vascular de la lámina propia y dentro de capilares de la mucosa del epitelio. Por otro lado, se apreció una discreta reactividad de linfocitos y células plasmáticas y no se observó la formación de vacuolas parasitóforas.

Todos los hallazgos encontrados en esta porción intestinal, hasta el momento no han sido descritos. En estudios previos, solo se ha mencionado la aparición de diarrea persistente, en pacientes portadores del virus del VIH-Sida e infectados con *Encephalitozoon (Septata) intestinalis*. (Molina, J.M., et al., 1995; Franzen, C., et al., 1995). Sin embargo, en otro estudio se describe una infección diseminada por *E. cuniculi*, sin reporte de diarrea a pesar de encontrar microorganismos en la mucosa del duodeno. (Franzen, C., et al., 1995). Por lo que, el aporte de este estudio, con respecto a la diseminación de este microorganismo patógeno, a través, de macrófagos infectados o su presencia en la circulación sanguínea y linfática, fortalece la forma en que este microorganismo invade a otros órganos, sobre todo aquellos que están muy irrigados, así como su eliminación, a través de las heces fecales.

Con respecto a las alteraciones hematológicas encontradas en el presente estudio, es importante resaltar la capacidad que tienen las esporas de *E. cuniculi* de diseminarse a través de la sangre, ya sea en forma individual o

adheridas al citoplasma de los eritrocitos y leucocitos al liberar su tubo polar. Este tipo de observaciones hasta la fecha, no han sido descritos.

6. CONCLUSIONES

Las características versátiles que *E. cuniculi*, ha desarrollado a través de los diversos mecanismos implementados en su proceso de replicación, así como su propagación, a través del tracto digestivo y posterior diseminación vía hematógena, nos muestra cómo este microorganismo maneja los procesos de adaptación e interdependencia energética, una vez que ha encontrado a células huésped capaces de proporcionarle los medios adecuados para llevar a cabo su reproducción y supervivencia. Dentro de los mecanismos implementados en el tracto gastrointestinal de los ratones Balb/c, destaca la presencia de macrófagos en la superficie de la mucosa gástrica y las vellosidades intestinales, así como de los macrófagos intraepiteliales los cuales realizaron la fagocitosis de las esporas y su posterior migración hacia las porciones basales del epitelio gastrointestinal y las criptoplasmas linfoides.

Por otro lado, el proceso de migración de las esporas de *E. cuniculi*, a través de la endocitosis y la formación de vacuolas parasitóforas, fueron dos de los mecanismos más relevantes en su camino hacia los vasos sanguíneos en la base del epitelio intestinal. Asimismo, la presencia de eosinófilos capturando esporas, así como su presencia en el citoplasma de las células de Paneth junto a sus gránulos reactivos ricos en arginina, nos permiten determinar su actividad antibacteriana y antiparasitaria esencial. Además, la presencia de esporas de *E. cuniculi* alrededor de los vasos sanguíneos, así como su presencia dentro de

los mismos y rodeados de numerosos eritrocitos, nos sugiere que este microorganismo es capaz de atravesar el endotelio vascular y usar la corriente sanguínea, para poderse diseminar por todo el organismo.

Con respecto a los hallazgos encontrados en la sangre de los ratones Balb/c, la presencia de las esporas de *E. cuniculi* rodeadas de eritrocitos, algunas de ellas dirigiendo su tubo polar hacia su citoplasma de algunos de ellos o su presencia dentro de ellos, nos permite determinar que este patógeno utiliza a estas células como vehículo de diseminación, a través del torrente sanguíneo para distribuirse por todo el organismo.

Estos hallazgos, fueron muy importantes: primero, porque no hay estudios centrados en la descripción de los cambios celulares que se presentan en el tracto gastrointestinal de ratones Balb/c inoculados *per os* con esporas de *E. cuniculi* y su posible diseminación, a través de vasos sanguíneos del aparato digestivo y segundo, la presencia de estas esporas en sangre y su interacción con las células sanguíneas, tanto de la línea roja como de la blanca.

PERSPECTIVAS

1.- Se revisará el hígado, los riñones y el cerebro de los animales inoculados con las esporas de *E. cuniculi*, ya que son los órganos blanco en los que frecuentemente se presentan granulomas microsporidianos, realizando las histoquímicas de Gram, Azul de Tricromo y Calcoflúor-white.

2.- Analizar por medio de las histoquímicas de Gram, Azul de Tricromo y Calcoflúor-white la presencia de las esporas de *E. cuniculi*, en el resto de los órganos parenquimatosos como son los pulmones y el bazo, debido a su abundante irrigación.

3.- Hacer uso de la inmunohistoquímica en busca de esporas de *E. cuniculi*, sobre todo en órganos, donde se encuentren las células presentadoras de antígenos, como son las criptoplasmas intestinales, las placas de Peyer, además de los linfonódulos regionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2012). Cellular and Molecular Immunology. 7th Ed, Elsevier-Saunders, Philadelphia, pp. 295-308.

Abu-Akkada, S.S., El Kerdany, E.D., Mady, R.F., Diab, R.G., Khedr, G.A., Ashmawy, K.I., Lotfy, W.M. (2015). *Encephalitozoon cuniculi* infection among immunocompromised and immunocompetent humans in Egypt. Iran J Parasitol. 10(4):561-570.

Adam, J., Valenčáková, A., Halánová, M., Danišová, O., Gorbarová, K., Čisláková, L. (2014). Serological screening of selected microsporidia in HPV-positive women. Acta Parasitol. 60(1):50-53.

Agaud, A., Achbarou, A., Desportes-Livage, I. (1997). Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. J Eukaryot Microbiol. 44(6):81S.

Åkerstedt, J., Nordstoga, K., Mathis, A., Smeds, E., Deplazes, P. (2002). Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 49(8):400-405.

Alaux, C., Folschweiller, M., McDonell, C., Beslay, D., Cousin, M., Dussaubat, C., Brunet, J.L., Le Conte, Y. (2011). Pathological effects of the microsporidium *Nosema ceranae* on honey bee queen Physiology (*Apis mellifera*). J Invertebr Pathol. 106(3):380-385.

Andreu-Ballester, J.C., García-Ballesteros, C., Amigo, V., Ballester, F., Gil-Borrás, R., Catalán-Serra, I., Magnet, A., Fenoy, S., del Aguila, C., Ferrando-Marco, J and Cuéllar, Carmen. (2013). Microsporidia and Its Relation to Crohn´s Disease. A Retrospective Study. PLoS One. 8(4):e62107.

Anver, M.R., King, N.W., Hunt, R.D. (1972). Congenital Encephalitozoonosis in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). Vet Pathol. 9(6): 475-480.

Arnesen, K., Nordstoga, K. (1977). Ocular Encephalitozoonosis (*Nosematosis*) in blue foxes. Acta Ophthalmologica. 55(4):641-651.

Ashton, N., Wirashina, P.A. (1973). Encephalitozoonosis (*Nosematosis*) of the cornea. Br J Ophthalmol. 57(9):669-674.

Ashton, N., Cook, C., Clegg, F. (1976). Encephalitozoonosis (*Nosematosis*) causing bilateral cataract in a rabbit. Br J Ophthalmol. 60(9):618-631.

Ashmawy, K.I., Abuakkada, S., Awad, A.M. (2011). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in farmed domestic rabbits in Egypt. *Zoonoses Public Health*. 58(5):357-364.

Baldotto, S.B., Cray, C., Turner, G.A., Reifur, L., Montiani-Ferreira, F. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Pet Rabbits in Brazil. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 24(4):435-440.

Barker, R. J. (1975). Ultrastructural observation on *Encephalitozoon cuniculi* Levaditi, Nicolau et Schoen, 1922, from mouse peritoneal macrophages. *Folia Parasitol*. 22:1–9.

Benz, P., Maass, G., Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Tichy, A., Nell, B. (2011). Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in the feline cataractous lens. *Vet Ophthalmol*. 14 Suppl 1:37-47.

Bergquist, N.R., Stintzing, G., Smedman, L., Waller, T., Andersson, T. (1984). Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological tests. *Br Med J*. 288(6421):902.

Biderre, C., Pagés, M., Méténier, G., Canning, E. U., & Christian, V. P. (1995). Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol Biochem Parasitol*. 74(2), 229-231.

Bigliardi, E., Selmi, M.G., Lupetti, P., Corona, S., Gatti, S., Scaglia, M., Sacchi, L. (1996). Microsporidian spore wall: ultrastructural finding *Encephalitozoon hellem* exospore. *J Eukaryot Microbiol*. 43(3):181-186.

Bigliardi, E., Sacchi, L. (2001). Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect*. 3: 373–379.

Bjerkås, I. (1990). Brain and spinal cord lesions in encephalitozoonosis in mink. *Acta Vet Scand*. 31, 423–432.

Black, S.S., Steinohrt, L.A., Bertucci, D.C., Rogers, L.B., Didier, E.S. (1997). *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol*. 34(3):189-198.

Böhne, W., Ferguson, D. J., Kohler, K. and Gross, U. (2000). Developmental expression of a tandemly repeated, glycine- and serine-rich spore wall protein in the microsporidian pathogen *Encephalitozoon cuniculi*. *Infect Immun*. 68(4), 2268–2275.

Böhne, W., Böttcher, K., Großs, U. (2011). The parasitophorous vacuole of *Encephalitozoon cuniculi*: biogenesis and characteristics of the host cell pathogen interface. *Int J Med Microbiol*. 301:395–399.

Buyukmihci, N., Bellhorn, R.W., Hunziker, J., Clinton, J. (1977). *Encephalitozoon* infection of the cornea in a cat. J Am vet Med Assoc. 15;171(4):355-357.

Cali, A., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., Owen, R.L. (1991). A comparison of two microsporidian parasites in enterocytes of AIDS patients with chronic diarrhea. J Protozool. 38(6): 96S -98S.

Cali, A., Kotler, D.P., Orenstein, J.M. (1993). *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS patients. J Eukaryot Microbiol. 40(1):101-112.

Cali, A., Weiss, L.M., Takvorian, P.M. (1996). Microsporidian taxonomy and the status of *Septata intestinalis*. J Eukaryot Microbiol. 43(5):106S-107S.

Cali, A., Takvorian, P.M. (2014). Developmental Morphology and Life Cycles of the Microsporidia. In: L.M. Weiss and J.J. Becnel (Eds.), Microsporidia (Pathogens of Opportunity). Wiley Blackwell, Ames, IA, pp 71-133.

Canning, E.U., Field, A.S., Hing, M.C., Mariott, D.J. (1994). Further observations on the ultrastructure of *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993. Eur J Protistol. 30(4):414-422.

Cao, X.M., Yang, Y.P., Li, H.R., Cui, J.Y. (2012). Morphology of the developing muscularis externa in the mouse esophagus. Dis Esophagus. 25(1):10-16.

Capella-Gutiérrez, S., Marcet-Houben, M., Gabaldón, T. (2012). Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi. BMC Biol. 31;10:47.

Chalupský, J., Vávra, J., Bedrník, P. (1979). Encephalitozoonosis in laboratory animals-a serological Survey. Folia Parasitol (Praha). 26(1):1-8.

Clark, M.A., Jepson, M.A., Simmons, N.L., Booth, T.A., Hirst, B.H. (1993). Differential expression of lectin-binding sites defines mouse intestinal M-cells. J. Histochem Cytochem. 41(11):1679-1687.

Corradi, N., & Keeling, P. J. (2009). Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. Fungal Biology Reviews, 23(1–2), 1-8.

Coulon, G. (1929). Présence d'un nouvel *Encephalitozoon* (*encephalitozoon brumpti* n. sp.) dans le liquid céphalo-rachidien d'un sujet atteint de méningite suraigue. Ann Parasitol Hum Comp. 7(6):449-452.

Couzinet, S., Cejas, E., Schittny, J., Deplazes, P., Weber, R., & Zimmerli, S. (2000). Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. Infect Immun. 68(12), 6939-6945.

Cox, J.C., Gallichio, H.A., Pye, D., Walden, N.B. (1977). Application of immunofluorescence to the establishment of an *Encephalitozoon cuniculi* free rabbit colony. Lab Anim Sci. 27(2):2014-209.

Cox, J.C., Gallichio, H.A. (1978). Serological and histological studies on adult rabbits with recent naturally acquired encephalitozoonosis. Res Vet Sci. 24:260-261.

Cox, J.C., Hamilton, R.C., Attwood, H.D. (1979). An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. J Protozool. 26:260-265.

Cray, C., Arcia, G., Schneider, R., Kelleher, S.A., Arheart, K.L. (2009). Evaluation of the usefulness of an ELISA and protein electrophoresis in the diagnosis of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. Am J Vet Res. 70(4):478-482.

Csokai, J., Gruber, A., Künzel, F., Tichy, A., Joachim, A. (2009a). Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. Parasitol Res. 104:629-635.

Csokai, J., Fuchs-Baumgartinger, A., Maass, G., Joachim, A. (2010). Detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection (strain II) by PCR in a cat with anterior uveitis. Wiener Tierärztliche Monatsschrift. 97, 210-215.

Dall, D.J. (1983). A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. J Theor Biol. 105(4), 647-659.

De Groote, M.A., Visvesvara, G.S., Wilson, M.L., Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., da Silva, A.J., Leitch, G.J., Bryan, R.T., Reves, R. (1995). Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. J Infect Dis. 171:1375–1378.

Del Aguila, C., Croppo, G.P., Moura, H., Da Silva, A.J., Leitch, G.J., Moss, D.M., Wallace, S., Slemenda, S.B., Pieniazek, N.J., Visvesvara, G.S. (1998). Ultrastructure, Immunofluorescence, Western Blot and PCR Analysis of Eight Isolates of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* Established in Culture from Sputum and Urine Samples and Duodenal Aspirates of Five Patients with AIDS. J Clin Microbiol. 36(5):1201-1208.

Delbac, F., David, D., Metenier, G., Vivarès, C. (1997). First complete amino acid sequence of a polar tube protein in a microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi*. J Eukaryot Microbiol. 44:77S.

Desportes, I., Le Charpentier, Y., Galian, A., Bernard, B., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Ravisse, P., Modigliani, R. (1985). Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool.* 32(2):250-254.

Desportes-Livage, I. (2000). Biology of microsporidia. *Contrib. Microbiol.* 6, 140-165.

Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M., Bohm, R., Shadduck, J.A. (1994). Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol (Praha)*. 41(1):1-11.

Didier, E., Orenstein, J.M., Aldras, A., Bertucci, D., Rogers, L.B., Janney, A. (1995a). Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol.* 33:3138-3145.

Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shadduck, J.A. (1995b). Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*. 111(Pt4):411-421.

Didier, E.S., Visvesvara, G.S., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., De Groote, M.A., Vossbrinck, C.R. (1996). A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol.* 34:2835-2837.

Didier, E.S., Snowden, K. F., & Shadduck, J. A. (1998). Biology of Microsporidian Species Infecting Mammals. *Adv Parasitol.* 40:283-320.

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

Eröksüz, Y., Eröksüz, H., Özer, H., Cevik, A., Ünver, Ö. (1999). A survey of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbit colonies in Elazig, Turkey: pathomorphologic and serologic (carbonimmunoassay test) studies. *Isr J Vet Med.* 54:73-77.

Everds, N.E. (2006). In: Foster HL, Small JD, Fox JG, eds. *Hematology of the Laboratory Mouse. The Mouse in Biomedical Research*, 2nd ed., Vol 3. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp.133-170.

Fasshauer, V., Gross, U., Bohne, W. (2005). The parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* lacks host cell membrane proteins immediately after invasion. *Eukaryotic Cell*, 4, 221–4.

Flatt, R.E., Jackson, S.J. (1970). Renal nosematosis in young rabbits. *Path Vet.* 7:492-497.

Franzen, C., Schwartz, D.A., Visvesvara, G.S., Müller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., Fätkenheuer, G., Hartmann, P., Mahrle, G., Diehl, V., Schrappe, M. (1995). Immunologically confirmed disseminated, asymptomatic *Encephalitozoon cuniculi* infection of the gastrointestinal tract in a patient with AIDS. Clin Infect Dis. 21(6):1480-1484.

Franzen, C., Müller, A., Schwenk, A., Salzberger, B., Fätkenheuer, G., Mahrle, G., Diehl, V., Schrappe, M. (1995). Intestinal microsporidiosis with *Septata intestinalis* in a patient with AIDS-response to albendazole. J Infect. 31(3):237-239.

Franzen, C., Müller, A., Hartmann, P., Salzberger, P. (2005). Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). Parasitology. 130 (Pt 3):285-292.

Franzen, C. (2005). How do microsporidia invade cells? Folia Parasitologica. 52:36-40.

Friedberg, D.N., Stenson, S.M., Orenstein, J.M., Tierno, P.M., Charles, N.C. (1990). Microsporidial keratoconjunctivitis in acquired immunodeficiency. Arch Ophthalmol. 108(4):504-508.

Frixione, E., Ruiz, L., Cerbon, J., Undeen, A.H. (1997). Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg²⁺ suggests dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. J. Eukaryot. Microbiol. 44:109-116.

Galván, A.L., Magnet, A., Izquierdo, F., Fenoy, S., Rueda, C., Fernández-Vadillo, C., Henriques-Gil, N., del Águila, C. (2013). Molecular characterisation of human-pathogenic microsporidia and *Cyclospora cayetanensis* isolated from various water sources in Spain: a year-long longitudinal study. Appl Environ Microbiol. 79(2):449-459.

Gamboa-Domínguez, A., De Anda, J., Donis, J., Ruiz-Maza, F., Visvesvara, G.S., Diliz, H. (2003). Disseminated *Encephalitozoon cuniculi* infection in a Mexican kidney transplant recipient. Transplantation. 15;75(11):1898-900.

Gannon J. (1980). A survey of *Encephalitozoon cuniculi* in laboratory animal colonies in the United Kingdom. Lab Anim. 14(2):91-94.

Gannon, J. (1980). The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. Lab Anim. 14(3):189-192.

Gebert A., Rothkötter, H.J., Pabst, R. (1996). M cells in Peyer's patches of the intestine. Int Rev Cytol. 167:91-159.

Giordano, C., Weigt, A., Vercelli, A., Rondena, M., Grilli, G., Giudice, C. (2005). Immunohistochemical identification of *Encephalitozoon cuniculi* in phacoclastic uveitis in four rabbits. *Vet Ophthalmol.* 8(4):271-5.

González-Machorro, J.R., Rodríguez-Tovar, L.E., Gómez-Flores, R., Soto-Domínguez, A., Rodríguez-Rocha, H., García-García, A., Tamez-Guerra, P., Castillo-Velázquez, U. (2019). Increased phagocytosis and growth inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* by LPS-activated J774A.1 murine macrophages. *Parasitol Res.* 118(6):1841-1848.

Gupta, S.K., Hossain, Z., Nanu, M.M., Mondal, K. (2016). Impact of microsporidian infection on growth and development of silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *Agriculture and Natural Resources.* 50(5):388-395.

Guscetti, F., Mathis, A., Hatt, J.M., Deplazes, P. (2003). Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *J Med Primatol.* 32(2):111-119.

Habib, A.M., Richards, P., Cairns, L.S., Rogers, G.J., Bannon, C.A., Parker, H.E., Morley, T.C., Yeo, G.S., Reimann, F., Gribble, F.M. (2012). Overlap of endocrine hormone expression in the mouse intestine revealed by transcriptional profiling and flow cytometry. *Endocrinology.* 153(7):3054-3065.

Halánová, M., Cisláková, L., Valenkáková, A., Bálent, P., Adam, J., Trávnicek, M. (2003). Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med.* 10(1):117-120.

Harcourt-Brown, F.M. (2002). *Textbook of Rabbit Medicine.* 1st Ed, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 304-305.

Harcourt-Brown, F.M. (2004). *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine.* 13(2):86-93.

Hartskeerl, R.A., Van Gool, T., Schuitema, A.R., Didier, E.S., Terpstra, W.J. (1995). Genetic and immunological characterization of the microsporidia *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology.* 110 (Pt 3):277-285.

Hayman, J.R., Southern, T.R., Nash, T.E. (2005). Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells in vitro. *Infect Immun.* 73(2):841-848.

Hedrich, H.J., Bullock, G. (2004). *The Laboratory Mouse.* 1st edition, Academic Press-Elsevier, San Diego, CA, pp. 338.

Hein, J., Flock, U., Sauter-Louis, C., Hartmann, K. (2014). *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Germany: prevalence and sensitivity of antibody testing. *Vet Rec.* 174(14):350.

Herve, O., Zender, H.O., Arrigoni, E., Eckert, J., Kapanci, Y. (1989). A Case of *Encephalitozoon cuniculi* Peritonitis in a Patient with AIDS. *Am J Clin Pathol.* 92(3):352-6.

Higes, M., Meana, A., Bartolomé, C., Botías, C., Martín-Hernández, R. (2013). *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environ Microbiol Rep.* 5(1):17-29.

Hofmannová, L., Sak, B., Jekl, V., Mináriková, A., Skorič, M., Kvač, M. (2014). Lethal *Encephalitozoon cuniculi* genotype III infection in Steppe lemmings (*Lagurus lagurus*). *Vet Parasitol.* 205(1-2):357-360.

Hollister, W.S., Canning, E.U., Willcox, A. (1991). Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology.* 102 Pt 1:33-43.

Hollister, W. S., E. U. Canning, N. I. Colbourn, and E. J. Aarons. (1995). *Encephalitozoon cuniculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. *J Eukaryot Microbiol.* 42:367–372.

Hunt, R.D., King, N.W., Foster, H.L. (1972). Encephalitozoonosis: Evidence for vertical transmission. *J Infect Dis.* 126:212-214.

Igarashi, M., Oohashi, E., Dautu, G., Ueno, A., Kariya, T., Furuya, K. (2008). High seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Japan. *J Vet Med Sci.* 70(12):1301-1304.

Ishihara, R. (1968). Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of a microsporidian, *Nosema bombycis*. *J Invertebr Pathol.* 12(3):245-258.

Jedrzejewski, S., Graczyk, T.K., Słodkiewicz-Kowalska, A., Tamang, L., Majewska, A.C. (2007). Quantitative assessment of contamination of fresh food produce of various retail types by human-virulent microsporidian spores. *Appl Environ Microbiol.* 73(12):4071-4073.

Jeklova, E., Leva, L., Matiasovic, J., Ondrackova, P., Kummer, V., Faldyna, M. (2020). Characterization of humoral and cell-mediated immunity in rabbits orally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Vet Res* 51:79.

Joseph, J., Sharma, S. (2009). In vitro culture of various species of microsporidia causing keratitis: evaluation of three immortalized cell lines. *Indian J Med Microbiol.* 27(1):35-39.

Juan C. Andreu-Ballester., Carlos Garcia-Ballesteros., Victoria Amigo., Ferran Ballester., Rafael Gil-Borrás, Ignacio Catalán-Serra., Angela Magnet., Soledad Fenoy., Carmen del Aguila., Jose Ferrando-Marco., Carmen Cuéllar. (2013). Microsporidia and Its Relation to Crohn's Disease. A Retrospective Study. *Plos One*. 8(4): e62107.

Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., Delbac, F., El Alaoui, H., Peyret, P., Saurin, W., Gouy, M., Weissenbach, J., Vivarès, C.P. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature*. 414(6862):450-453.

Keeble, E.J., Shaw, D.J. (2006). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in the United Kingdom. *Vet Rec*. 158(16):539-544.

Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D. (2000). Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol Biol Evol*. 17(1):23-31.

Keohane, E. M., & Weiss, L. M. (1999). The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In *The microsporidia and microsporidiosis* (pp. 196-224): American Society of Microbiology.

Kile, B.T., Mason-Garrison, C.L., Justice, M.J. (2003). Sex and strain-related differences in the peripheral blood cell values of inbred mouse strains. *Mamm Genome*. 14(1):81-85.

Kitz, S., Grimm, F., Wenger, S., Hatt, J., Kipar, A., Hetzel, U. (2018). *Encephalitozoon cuniculi* infection in Barbary striped grass mice (*Lemniscomys barbarus*). *Schweiz Arch Tierheilkd*. 160(6):394-400.

Kodjikian, L., Garweg, J.G., Nguyen, M., Schaffner, T., Deplazes, P., Zimmerli, S. (2005). Intraocular microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with idiopathic CD4+T-lymphocytopenia. *Int J Med Microbiol*. 294(8):529-533.

Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Endelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M., Thalhammer, J.G., Joachim, A. (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet Parasitol*. 151(2-4):115-124.

Künzel, F., Joachim, A. (2010). Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitol Res*. 106:299–309.

Larsson, J.I. (2005). Fixation of microsporidian spores for electron microscopy. *J Invertebr Pathol*. 90(1):47-50.

Lavazza, A., Chiari, M., Nassuato, C., Giardiello, D., Tittarelli, C., Grilli, G. (2016). Serological Investigation on *Encephalitozoon cuniculi* in pet Rabbits in North Central-Italy. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 25(1):52-59.

Lefrançois, L., Lycke N. (2001). Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells. *Curr Protoc Immunol*. May;Chapter 3:Unit 3.19.

Leitch, G. J., Visvesvara, G. S., He, Q. (1993). Inhibition of microsporidian spore germination. *Parasitol Today*. 9(11):422-424.

Leonard, C.A., Hayman, J.R. (2017). Role of host cell integrins in the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis* adherence and infection in vitro. *FEMS Microbiol Lett*. 364(17):1-8.

Lom, J., Vávra, J. (1963a). The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool*, 1:81-89.

Magaud, A., Achbarou, A., Desportes-Livage, I. (1997). Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol*. 44:81S.

Malcekova, B., Valencakova, A., Luptakova, L., Molnar, L., Ravaszova, P., Novotny, F. (2011). First detection and genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*). *Parasitol Res*. 108(6):1479-1482.

Mathews, A., Hotard, A., Hale-Donze, H. (2009). Innate immune responses to *Encephalitozoon* species infections. *Microbes Infect*. 11(12):905–911.

Matsubayashi, H., Kioke, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S. (1959). A case of *Encephalitozoon-like* body infection in man. *Arch Pathol*. 67:181-187.

Meng, Q.F., Wang, W.L., Ni, X.T., Li, H.B., Yao, G.Z., Sun, X.L., Wang, W.L., Cong, W. (2015). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Toxoplasma gondii* in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in China. *Korean J Parasitol*. 53(6):759-763.

Meredith, A. L., Richardson, J. (2015). Neurological Diseases of Rabbits and Rodents. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 24(1):21-33.

Méténier, G., Vivarès, C.P. (2001). Molecular characteristics and physiology of microsporidia. *Microbes Infect*. 3(5):407-415.

Milnes, E., Delnatte, P., Cai, H.Y., Nemeth, N. (2018). Systemic *Encephalitozoon* infection due to *Encephalitozoon cuniculi* strain IV in a Vancouver Island Marmot (*Marmota vancouverensis*). *J Zoo Wildl Med*. 49(2):484-488.

Molina, J.M., Oksenhendler, E., Beauvais, B., Sarfati, C., Jaccard, A., Derouin, F., Modai, J. (1995). Disseminated microsporidiosis due to *Septata intestinalis* in patients with AIDS: clinical features and response to albendazole therapy. *J Infect Dis.* 171(1):245-249.

Montuenga, B.L., Esteban, R.F.J., Calvo, G.A. (2014). Técnicas en histología y biología celular. 2^{da} Edición. Ed, Elsevier-Masson, Barcelona, España, pp. 46-47.

Müller-Doblies, U.U., Herzog, K., Tanner, I., Mathis, A., Deplazes, P. (2002). First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Parasitol.* 107(4):279-285.

Nagarajan, P., Shailendra, A., Venkatesan, R., Kumar, M.J.M., Majumdar, S.S., Juyal, R.C. (2012). Sex-and strain-related differences in the peripheral blood cell values of mutant mouse strains. *Comp Clin Pathol.* 21:1577-1585.

Nast, R., Middleton, D.M., Wheeler, C.L. (1996). Generalized encephalitozoonosis in a Jersey wooly rabbit. *Can Vet J.* 37:303-305.

National Research Council. (1991). Infectious diseases of mice and rats: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. National Academy Press, Washington, D.C.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

O'Connell, K.E., Mikkola, A.M., Stepanek, A.M., Vernet, A., Hall, C.D., Sun, C.C., Yildirim, E., Staropoli, J.F., Lee, J.T., Brown, D.E. (2015). Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. *Comp Med.* 65(2):96-113.

Ohshima, K. (1937). On the function of the polar filament of *Nosema bombycis*. *Parasitology.* 29(02):220-224.

Orenstein, J.M., Russo, P., Didier, E.S., Bowers, C., Bunin, N., Teachey, D.T. (2005). Fatal pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. *Ultrastruct Pathol.* 29(3-4):269-276.

Okewole, E.A. (2008). Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in domestic rabbits in Nigeria. *Onderstepoort J Vet Res.* 75(1):33-38.

Pabst, O., Herbrand, H., Worbs, T., Friedrichsen, M., Yan, S., Hoffmann, M.W., Körner, H., Bernhardt, G., Pabst, R., Förster, R. (2005). Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol.* 35(1):98-107.

Pan, Y., Wang, S., Liu, X., Li, R., Sun, Y., Gadahi, J.A. (2015). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in Humans and Rabbits in China. *Iran J Parasitol.* 10(2):290-295.

Pawlina, W. (2015). *Histología: Texto y Atlas. Correlación con biología molecular y celular.* 7ª edición, Wolters Kluwer, Barcelona, España, pp. 479-499.

Peuvel, I., Delbac, F., Metenier, G., Peyret, P., Vivarès, C.P. (2000). Polymorphism of the gene encoding a major polar tube protein PTP1 in two microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Parasitology.* 121 (6):581–587.

Postma, G.C., Pardini, L., Carnevale, S., Gregnoli, E., Quiroga, M.A., Venturini, M.C., Minatel, L. (2018). Fatal canine encephalitozoonosis in Latin America, first report. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 11:15-18.

Provencher Bollinger, A., Everds, N.E., Zimmerman, K.L., Moore, D.M., Smith, S.A., Barnhart, K.F. (2010). Hematology of Laboratory Animals. In: Weiss, D, Wardrop, J, Schalm, O.W, editors. *Schalm's Veterinary Hematology.* 6th Ed, Wiley-Blackwell, Iowa, pp. 852-887.

Rafferty, N.S., Scholz, D.L. (1991). Development of actin polygonal arrays in rabbit lens epithelial cells. *Curr Eye Res.* 10(7):637-643.

Reetz, J. (1995). Microsporidien als ursache von aborten beim rind. *Tierarztl Umschau.* 60:660–4.

Reetz, J., Nöckler, K., Reckinger, S., Vargas, M.M., Weiske, W., Broglia, A. (2009). Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol Int.* 58(3):285-292.

Rebel-Bauder, B., Leschnik, M., Maderner, A., Url, A. (2011). Generalized encephalitozoonosis in a young kitten with cerebellar hypoplasia. *J Comp Pathol.* 145(2-3):126-131.

Richter, B., Csokai, J., Graner, I., Eisenberg, T., Pantchev, N., Eskens, H.U., Nedorost, N. (2013). Encephalitozoonosis in two inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*). *J Comp Pathol.* 148(2-3):278-282.

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. *J Vet Diagn Invest.* 29(3):269-277.

Rönnebäumer, K., Gross, U., & Bohne, W. (2008). The nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryotic cell*. 7(6):1001-1008.

Rossi, P., Urbani, C., Donelli, G., Pozio, E. (1999). Resolution of microsporidial sinusitis and keratoconjunctivitis by itraconazole treatment. *Am J Ophthalmol*. 127(2):210-212.

Rowiński, J., Lamprecht, J., Siciński, P. (1984). Non-random distribution of intraepithelial lymphoid cells in follicle-associated epithelium of Peyer's patches in mice. *J Anat*. 139 (Pt 1):21-32.

Sak, B., Ditrich, O. (2005). Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. *Folia Parasitol (Praha)*. 52(1-2):158-162.

Santaniello, A., Dipineto, L., Rinaldi, L., Menna, L.F., Cringoli, G., Fioretti, A. (2009). Serological survey of *Encephalitozoon cuniculi* in farm rabbits in Italy. *Res Vet Sci*. 87(1):67-69.

Scudamore, C.L. (2014). *A Practical Guide to the Histology of the Mouse*. 1st edition. Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp. 50-55.

Scurrall, E.J., Holding, E., Hopper, J., Denk, D., Fuchs-Baumgartinger, A., Silbermayr, K., Nell, B. (2015). Bilateral lenticular *Encephalitozoon cuniculi* infection in a snow leopard (*Panthera uncia*). *Vet Ophthalmol*. 18 Suppl 1:143-147.

Seguel, M., Howerth, E.W., Ritter, J., Paredes, E., Colegrove, K., Gottdenker, N. (2015). Encephalitozoonosis in 2 South American Fur Seal (*Arctocephalus australis*) Pups. *Vet Pathol*. 52(4):720-723.

Shadduck, J.A., Bendele, R., Robinson, G.T. (1978). Isolation of the causative organism of canine encephalitozoonosis. *Vet Pathol*. 15(4):449-460.

Shadduck, J.A., Greeley, E. (1989). Microsporidia and human infections. *Clin Microbiol Rev*. 2(2):158-165.

Shaw, R.W., Kent, M.L., Docker, M.F., Brown, A.M., Devlin, R.H., Adamson, M.L. (1997). A new species of Loma (Microsporea) in shiner perch (*Cymatogaster aggregata*). *J Parasitol*. 83(2):296-301.

Sheridan, B.S., Lefrançois, L. (2012). Isolation of mouse lymphocytes from small intestine tissues. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 3:Unit 3.19.

- Shin, J.C., Kim, D.G., Kim, S.H., Kim, S., Song, K.H. (2014). Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in pet rabbits in Korea. Korean J Parasitol. 52(3):321-323.
- Smith, C.L., Econome, J.G., Schutt, A., Klco, S. and Cantor, C.R. (1987). A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome. Science. 236:1448-1453.
- Sodqi, M., Brazille, P., Gonzalez-Canali, G., Cornet, M., Piketty, C., Weiss, L. (2004). Unusual Pulmonary *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in an AIDS patient: case report and review. Scand J Infect Dis. 36(3):230-231.
- Sokolova Y.Y., Sakaguchi, K., Paulsen, D.B. (2016). Establishing a New Species *Encephalitozoon pogonae* for the Microsporidian Parasite of Inland Bearded Dragon *Pogona vitticeps* Ahl 1927 (Reptilia, Squamata, Agamidae). J Eukaryot Microbiol. 63(4):524-535.
- Sprague, V., Sanford, H.V. (1971). The ultrastructure of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporida, Nosematidae) and its taxonomic significance. J Protozool. 18(4):560-569.
- 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. Eukaryot cell. 6(8):1354-1362.
- 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. J Clin Microbiol. 48(7):2651-2653.
- Tamez-Treviño, E., Sepúlveda-Saavedra, J., Ramírez-Romero, R., Flores-Castañeda, M.S. (1996). Determinación de la velocidad de tránsito intestinal en el ratón BALB/c. Vet-Méx, 27(3).
- Tamura, A., Soga, H., Yaguchi, K., Yamagishi, M., Toyota, T., Sato, J., Oka, Y., Itoh, T. (2003). Distribution of two types of lymphocytes (intraepithelial and lamina-propria-associated) in the murine small intestine. Cell Tissue Res. 313(1):47-53.
- 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 alpha-1,2 linkages. Glycobiology. 17(1):56-67.
- Tee, K.Y., Kao, J.P., Chiu, H.Y., Chang, M.H., Wang, J.H., Tung, K.C., Cheng, F.P., Wu, J.T. (2011). Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits in Taiwan. Vet Parasitol. 183(1-2):68-71.

Thelohan, P. (1894). Sur la presence d'une capsule a filament dans les spores des microsporidies. CR Acad. Sci. 118:1425-1427.

Tizard, I.R. (2013). Veterinary Immunology. 9th edition, Elsevier-Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 117-118.

Undeen, A. H. (1990). A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. J Theor Biol. 142(2):223-235.

Undeen, A.H., Frixione, E. (1991). Structural alteration of the plasma membrane in spores of the microsporidium *Nosema algerae* on germination. J Protozool. 38(5):511-518.

Undeen, A. H., & Vander Meer, R. K. (1999). Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. J Invertebr Pathol. 73(3):294-302.

Valencakova, A., Halanova, M. (2012). Immune response to *Encephalitozoon* infection review. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 35(1):1-7.

Van Rensburg, I.B.J., Volkmann D.H., Soley, J.T., Stewart, C.J. (1991). *Encephalitozoon* infection in a still-born foal. J S Afr Vet Ass. 62(3):130-132.

Vávra, J., Larsson, J.I.R. (2014). Microsporidia (Pathogens of Opportunity). 1st Ed, Wiley Blackwell, Ames, IA, pp 1-4.

Vávra, J., Lukeš, J. (2013). Microsporidia and “the art of living together”. Adv Parasitol. 82:253-319.

Vávra, J. (2005). “Polar vesicles” of microsporidia are mitochondrial remnants (“mitosomes”)? Folia Parasitol. 52:193-195.

Vávra, J. (1976). Structure of microsporidia, in: Bulla L.A., Cheng T.C. (Eds.), Comparative Pathobiology, Vol. 1, Plenum Press, New York, pp. 1-86.

Visvesvara, G. S. (2002). In Vitro Cultivation of Microsporidia of Clinical Importance. Clin Microbiol Rev. 15(3):401-413.

Vossbrinck, C. R., Woese, C. R. (1986). Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8 S RNA. Nature. 320(6059):287-288.

Waller, T. (1979). Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. Lab Anim. 13(3):227-230.

Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L., Visvesvara, G.S. (1992). Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. N Engl J Med. 326(3):161-166.

- Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A., Owen, R.L. (1994). Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev.* 7(4):426-461.
- Webster, J.D., Miller, M.A., Vemulapalli, R. (2008). *Encephalitozoon cuniculi*-associated Placentitis and perinatal death in an alpaca (*Lama pacos*). *Vet Pathol.* 45(2):255-258.
- Weidner, E. (1972). Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Z Parasitenkd.* 40:227-242.
- Weidner, E., Byrd, W. (1982). The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *J Cell Biol.* 93(3):970-975.
- Weiss, L.M., Edlind, T.D., Vossbrinck, C.R., Hashimoto, T. (1999). Microsporidian molecular phylogeny: the fungal connection. *J Eukaryot Microbiol.* 46(5):17S-18S.
- Weiss, L.M., Becnel, J.J. (2014). *Microsporidia (Pathogens of Opportunity)*. 1st Ed, Wiley Blackwell, Ames, IA, pp 1-4.
- West, G., Heard, D., Caulkett, N. (2007). *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. 1st edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 658.
- Wicher, V., Baughn, R.E., Fuentealba, C., Shadduck, J.A., Abbruscato, F., Wicher, K. (1991). Enteric infection with an obligate intracellular parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in an experimental model. *Infect Immun.* 59:2225-2231.
- Williams, B.A.P. (2009). Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology.* 11(11):1551-1560.
- Wolf, A., Cowen, D. (1937). Granulomatous encephalomyelitis due to an *encephalitozoon* (encephalitozoic encephalomyelitis) a new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst NY.* 6:306-371.
- Wolfer, J., Grahn, B., Wilcock, B., Percy, D. (1993). Phacoclastic uveitis in the rabbit. *Prog Vet Comp Ophthalmol.* 3:92-97.

APÉNDICES

A. Técnicas y tinciones

A. 1 Técnica de inclusión en parafina

Esta técnica se utiliza para los tejidos.

Procedimiento:

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

A. 2 Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE)

Esta tinción es para teñir los tejidos.

Procedimiento:

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

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

Esta tinción se utiliza para la sangre y los tejidos.

Pasos precedentes:

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

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con el frotis sanguíneo o el tejido previamente desparafinado, en la canastilla porta laminillas para pasar por el tren de tinción.
2. Sumergir en metanol por 5 minutos.
3. Secar a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos.
4. Sumergir en azul de tricromo por 90 minutos y escurrir el exceso.
5. Sumergir dentro del alcohol ácido por 10 segundos y escurrir.
6. Pasar por el alcohol a 95%, por 5 minutos cada uno y escurrir.
7. Introducir en alcohol al 100% por 10 minutos y escurrir.
8. Aclarar en xileno (xilol) por 10 minutos.
9. Escurrir la canastilla y dejar secar sobre una toalla de papel a temperatura ambiente (TA).
10. Colocar el cubreobjetos y aplicar una gota de resina sintética.
11. Etiquetarlas y dejarlas secar toda la noche.

A. 4 Tinción de Gram

Esta tinción se utiliza para la sangre y los tejidos.

Pasos precedentes:

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

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con el frotis sanguíneo o el tejido previamente desparafinado, en la canastilla porta laminillas para pasar por el tren de tinción.
2. Colocar sobre la muestra una solución de cristal violeta al 1% (20 gotas) y adicionar 5 gotas de una solución de bicarbonato de sodio al 5% por 1 minuto.
3. Enjuagar con agua destilada.
4. Colocar sobre la muestra una solución de yodo de Gram (20 gotas) por 1 minuto.
5. Enjuagar con agua destilada.
6. Decolorar con acetona.
7. Enjuagar con agua destilada.
8. Colocar sobre la muestra una solución de fuscina básica (20 gotas) por 1 minuto.
9. Enjuagar con agua destilada.
10. Diferenciar inmediatamente cada laminilla con una solución de ácido pícrico-acetona, hasta que las secciones aparezcan de un color amarillento rosado.
11. Enjuagar rápidamente con una solución de acetona-xilol.
12. Aclarar con xilol (2 cambios) y montar con resina.

A. 5 Técnica con Calcoflúor-white

Esta tinción se utiliza para la sangre y los tejidos.

Pasos precedentes:

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

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con el frotis sanguíneo o el tejido previamente desparafinado, en la canastilla porta laminillas para pasar por el tren de tinción.
2. Sumergir para fijar en metanol por 5 minutos.
3. Dejar secar mientras se realiza el siguiente paso.
4. Colocar una charola cubierta con aluminio e instalar un soporte para las laminillas (para evitar el contacto de las laminillas con el aluminio) y mantenerlas en posición horizontal con el frotis o el tejido hacia arriba y acomodar las laminillas en el soporte.
6. Apagar el foco del laboratorio y cubrir las laminillas de cualquier fuente de luz. **Nota:** Continuar con esta condición por el resto procedimiento.
7. Colocar con una pipeta el fluorocromo sobre el tejido por 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Retirar la tintura con agua destilada utilizando una pipeta Pasteur sin bañar directamente el área de la muestra.
9. Secar completamente al aire libre.
10. Colocar el cubreobjetos y aplicar una gota de resina sintética, dejar secarlas y guardarlas en un recipiente cerrado, protegerlas de la luz.
11. Observar en un microscopio de epifluorescencia para identificar las esporas. **Nota:** No exponer estas laminillas a la luz.

A. 6 Tinción con Romanowsky

Esta tinción se utiliza para la sangre.

Pasos precedentes:

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

Procedimiento:

1. Colocar las laminillas con el frotis sanguíneo, en la canastilla porta laminillas para pasar por el tren de tinción.
2. Sumergir para fijar en metanol por 5 minutos.
3. Dejar secar mientras se realiza el siguiente paso.
4. Colocar la solución A (Naranja) de Romanowsky (20 gotas) por 30 segundos.
5. Colocar la solución B (Azul) de Romanowsky (20 gotas) por 30 segundos.
6. Enjuagar con agua destilada.
7. Escurrir y dejar secar sobre una toalla de papel a temperatura ambiente.
8. Colocar el cubreobjetos y aplicar una gota de resina sintética.
9. Etiquetarlas y dejarlas secar toda la noche.

B. Preparación de soluciones y reactivos

B.1. Solución fijadora para la técnica histológica

B.1.1. Formaldehído amortiguado al 10% bufferado

- 100 ml de formaldehído 37-40 %
- 6.5 grs de fosfato de sodio monobásico.
- 4 grs de fosfato de sodio dibásico.
- 900 ml de agua destilada.

Para preparar 1 litro de formaldehído amortiguado al 10% bufferado, disolver el fosfato de sodio dibásico y fosfato de sodio monobásico en 500 ml de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer de 2 litros, una vez disueltas las sales se vierten los restantes 400 ml de agua destilada, así como los 100 ml de formaldehído al 37-40%, agitar por unos 5 minutos para homogenizar las soluciones y filtrar.