



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**INMUNODETECCIÓN DE LINFOCITOS Y
MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS HEPÁTICOS
INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis*
EN EL CONEJO DOMÉSTICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

P R E S E N T A:

NELSON ANFERNEE TORRES SALGADO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ

CO-DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CLAUDIA HALLAL CALLEROS

ASESORA:

DRA. ROSA DOMÍNGUEZ ROLDAN



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Morelos, junio de 2022.

**INMUNODETECCIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS
HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis* EN EL
CONEJO DOMÉSTICO**

Tesis realizada por Nelson Anfernee Torres Salgado bajo la dirección del comité revisor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el título de:

INGENIERO EN PRODUCCIÓN ANIMAL.

Director de tesis: _____

Dr. Fernando Iván Flores Pérez

Codirectora de tesis: _____

Dr. Claudia Hallal Calleros

Revisor: _____

Dra. Mariana Pedernera Romano

Revisor: _____

Dr. Reyes Vázquez Rosales

Revisor: _____

Dra. Rosa Domínguez Roldan

Revisor: _____

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS (UAEM).

Por acogerme en sus instalaciones, brindándome un mundo lleno de nuevas experiencias.

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS (FCA).

Por mi formación académica y haberme brindado los conocimientos básicos para la realización de este proyecto.

A MIS ASESORES

A al Dr. Iván Flores Pérez, a la Dra. Claudia Hallal Calleros por ser parte de mi formación tanto como profesionista como en mi vida diaria enseñándome el significado de la ética y los diferentes valores del ser humano para realizar lo correcto en las distintas disciplinas de la vida, poder ser empático con todo ser y realizar todo con gusto y ganas lo que lleva como consecuencia el éxito y la felicidad, apoyándome en cada momento que lo necesitaba con las dudas que en el camino tuve durante la realización de esta tesis, también a la Dra. Rosa Domínguez Roldan quien siempre estuvo pendiente para vernos en campo, laboratorio, un mensaje o una llamada para resolver algún problema de esta tesis y que es parte fundamental para conclusión de este trabajo.

A MIS REVISORES DE TESIS

La Dra. Mariana Pedernera Romano, el Dr. Reyes Vázquez Rosales y la Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y por las valiosas observaciones que permitieron mejorar el presente trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres y hermana

Por qué siempre han estado conmigo, hemos pasado situaciones complicadas como todas las familias, pero siempre llenos de aprendizaje y lo más importante juntos, apoyándome desde un inicio de mi vida con el gusto de los animales, hoy es una realidad y quiero decirles a ellos, mis padres, se está logrando el objetivo y quiero que se sientan orgullosos de mí, seguiré trabajando para seguir llenándolos de alegría y a mi papa que se encuentra enfermo de salud en especial es para ti, quiero que continúes viviendo nuestros triunfos.

Contenido

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
JUSTIFICACIÓN	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Animales	18
Obtención de proglótidlos de <i>T. pisiformis</i>	18
Obtención y cuantificación de huevos de <i>T. pisiformis</i>	18
Infección	19
Sacrificio humanitario	19
Obtención de tejidos y procesamiento histológico	19
Inmunodetección de linfocitos CD4+ y CD8+ y macrófagos en tejido hepático	19
Análisis estadístico	21
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIONES	30
LITERATURA CITADA	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>T. pisiformis</i> (Warren, 2002).....	12
Figura 2. Diferentes subgrupos de leucocitos obtenidos de granulomas hepáticos causados por la infección con huevos de <i>T. pisiformis</i> en conejos. Promedio+ ee.....	22
Figura 3. Linfocitos tipo CD4 en granuloma de tejido hepático.....	23
Figura 4. Linfocitos tipo CD8 en granuloma de tejido hepático.....	24
Figura 5. Macrófagos tipo CD14 en granuloma de tejido hepático	25
Figura 6. Proporción de células obtenida para cada una de las subpoblaciones evaluadas en granulomas células CD4+, CD8+ y CD14+ en granulomas de tejido hepático a los 77 días post infección..	26

RESUMEN

La cisticercosis por *Taenia pisiformis* es una enfermedad que puede infectar a los conejos provocando signos que afectan el bienestar del animal y que conllevan a pérdidas socioeconómicas. Los conejos se infectan cuando se alimentan con pastos contaminados con los huevos de *T. pisiformis*, que son eliminados en las heces de los perros y otros carnívoros, y al llegar al intestino liberan la oncósfera o embrión exacanto, que penetra la pared del intestino y migra a sus órganos blancos por circulación porta, diferenciándose a cisticerco o metacéstodo y alojándose principalmente en la cavidad peritoneal, hasta que el conejo sea consumido por un carnívoro, quien es el hospedero definitivo, en el que se desarrollará la fase de Tenia, que es el céstodo adulto. Alternativamente, el establecimiento de los metacéstodos puede ser evitado por células del sistema inmunológico dando lugar a la formación de granulomas hepáticos, que son lesiones nodulares inflamatorias crónicas compuestas principalmente por macrófagos, tejido conectivo denso o laxo, células multinucleadas, linfocitos y fibrosis. Se ha estudiado ampliamente la respuesta inmunitaria para las parasitosis producidas por protozoarios y nemátodos intestinales, no así para las parasitosis tisulares, como las cestodiasis, en las cuales el humano puede ser un hospedero intermediario. Entre las cestodiasis, la causada en conejos por *Taenia pisiformis* ha sido poco estudiada a nivel histológico. En la cisticercosis causada por este parásito, no se han reportado estudios inmunohistológicos que permitan caracterizar las poblaciones linfocitarias que participan en la respuesta inmune inducida por esta parasitosis. En este trabajo nos enfocamos en caracterizar el tipo de linfocitos T (CD4 o CD8) y el influjo de células CD14 en los granulomas hepáticos de conejos infectados con huevos de *T. pisiformis*. Se utilizaron tejidos provenientes de un experimento previo, en el que cinco conejos adultos de la raza Nueva Zelanda sin historia de infección parasitaria o signos de enfermedad fueron mantenidos en jaulas individuales y se les administro agua y alimento *ad libitum*. Tres fueron infectados con 2,900 huevos de *T. pisiformis* y dos fueron usados

como testigos sanos; los cinco fueron sacrificados humanitariamente a los 77 días post infección. De los tres animales infectados se obtuvieron segmentos hepáticos conteniendo lesiones granulomatosas y se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 72 horas. Como control se tuvieron hígados sin lesiones, obtenidos de los animales testigos. Los segmentos de tejido fijados se procesaron conforme a la técnica de inclusión en parafina y se llevaron a cabo secciones histológicas seriadas de 6-8 μm de grosor. La inmunodetección se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos para cada tipo celular (anti CD4+ y anti CD8+ para linfocitos T y anti CD14 para macrófagos), utilizando el sistema Biotina-Avidina-Peroxidasa. Observamos que a los 77 días post infección la subpoblación linfocitaria predominante fue CD8, seguida de CD4, y la que se inmunodetectó en menor cantidad fue CD14.

ABSTRACT

Cysticercosis caused by *Taenia pisiformis* is a disease that can infect rabbits, causing signs that affect the well-being of the animal and lead to socioeconomic losses. Rabbits become infected when they feed on grasses contaminated with *T. pisiformis* eggs, which are eliminated in the feces of dogs and other carnivores, and when they reach the intestine they release the oncosphere or excant embryo, which penetrates the wall of the intestine and migrates to its white organs by portal circulation, differentiating to cysticercus or metacestode and staying mainly in the peritoneal cavity, until the rabbit is consumed by a carnivore, which is the definitive host, in which the tapeworm, the adult cestode phase, will develop. Alternatively, the establishment of metacestodes can be prevented by cells of the immune system, leading to the formation of hepatic granulomas, which are chronic inflammatory nodular lesions composed mainly of macrophages, dense or loose connective tissue, multinucleated cells, lymphocytes, and fibrosis. Much has been studied about the immune response to parasites caused by intestinal protozoa and nematodes, but not to tissue parasites, such as cestodiasis, in which humans can be an intermediate host. Among the cestodiasis, the one caused in rabbits by *T. pisiformis* has been little studied at the histological level. In cysticercosis caused by *T. pisiformis*, no hepatic immunohistological studies have been reported to characterize the lymphocyte populations that participate in the immune response induced by this parasitosis. In this work we focus on characterizing the type of T lymphocytes (CD4 or CD8) and the influx of CD14 cells in rabbit hepatic granulomas induced by *T. pisiformis* eggs. Tissues from a previous experiment were used, in which five adult New Zealand rabbits with no history of parasitic infection or signs of disease were kept in individual cages and given food and water *ad libitum*. Three were infected with 2,900 *T. pisiformis* eggs and two were used as healthy controls; all five were humanely euthanized 77 days post infection. Liver segments containing granulomatous

lesions were removed from the three animals and fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 72 hours. As a control, livers without lesions were obtained from the two control animals. Fixed tissue segments were processed according to the paraffin embedding technique and serial histological sections of 6-8 μm thickness were made. Immunodetection was performed using specific antibodies for each cell type (anti-CD4+ and anti-CD8+ for T lymphocytes and anti-CD14 for macrophages), using the Biotin-Avidin-Peroxidase detection system. We observed that at 77 days post-infection the predominant lymphocyte subpopulation was CD8, followed by CD4, and the one that was immunodetected in less quantity was CD14.

INTRODUCCIÓN

El conejo es una especie con gran potencial económico debido a sus características como el elevado índice de prolificidad, su tamaño que permite que se transporte y comercialice fácilmente, se alimenta de forrajes y subproductos de la agricultura por lo cual no compite con el humano por el alimento, se utiliza tanto su carne como sus subproductos (Cheeke, 1986), su costo de inversión y mano de obra es menor con relación a otras especies, y su productividad supera a otras especies, ya que una hembra puede generar hasta 40 crías por año, que representan 80 kg de carne (FAO, 1997). Además, el conejo es una de las especies animales más comúnmente utilizada como modelo experimental (Toral-Bastida *et al.*, 2011), para el estudio de diversas enfermedades infecciosas, no infecciosas y para la producción de anticuerpos policlonales (Jeklova, 2007; Mage, 2005). Además, el conejo también es usado ampliamente como animal de compañía, ganando popularidad en Europa, y en Estados Unidos de América donde se han referido 6.1 millones de conejos como mascotas (Tara *et al.*, 2013).

Los conejos, como otros mamíferos, son afectados por diversas enfermedades tanto virales, bacterianas y parasitarias (Yang, 2012). Estas últimas representan fuertes pérdidas económicas debido a que disminuye en gran medida su capacidad productiva (Aiello, 1998; Quiroz, 1994). Dentro de las enfermedades parasitarias destaca la cisticercosis por *Taenia pisiformis* (*T. pisiformis*), que causa además una de las cestodosis más comunes que infectan y causan enfermedad en caninos (Yang *et al.*, 2012).

La cisticercosis por *T. pisiformis* es una enfermedad en la que el conejo o la liebre juegan el papel de intermediarios debido a que *T. pisiformis* tiene un ciclo de vida indirecto (Quiroz, 2005). En los conejos se desarrolla el metacéstodo o *Cysticercus pisiformis* (*C. pisiformis*), el cual puede provocar signos de enfermedad que conllevan a pérdidas socioeconómicas (Yang *et al.*, 2012; Betancourt-Alonso *et al.*, 2011). Los conejos se

infectan cuando se alimentan con pastos contaminados con los huevos de *T. pisiformis*, que son eliminados en las heces de los perros y otros carnívoros. Al llegar al intestino se libera la oncósfera o embrión hexacanto, y una vez que éste llega al hígado, atraviesa el parénquima hepático por medio de la acción de sus ganchos y enzimas y se establece en la superficie, donde madura en aproximadamente 30 días (Quiroz, 2005). Los perros se infectan al ingerir los cisticercos cuando se alimentan con vísceras de conejos o liebres que los contienen (Fig.1), provocando en ellos una cestodiasis por *T. pisiformis* (Cogal, 2003; Quiroz, 2005; Flatt y Moses, 1975).

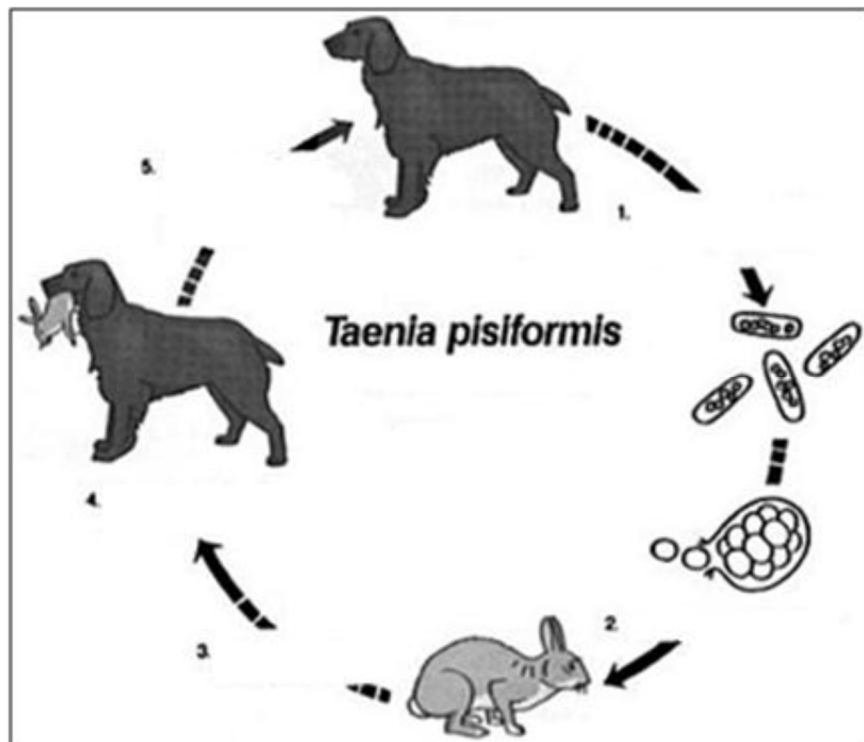


Figura 1. Ciclo de vida de *T. pisiformis* (Warren, 2002)

Alternativamente, el establecimiento de los metacéstodos es evitado por células del sistema inmunitario dando lugar a la formación de granulomas hepáticos. Además, los cisticercos pueden dañar numerosos órganos dependiendo de la migración inicial de las

formas protolarvarias, incluyendo mesenterio, peritoneo y pulmones (Betancourt-Alonso *et al.*, 2011; Gemmell, 1965). Las lesiones en hígado son causa de decomiso del animal, y en ocasiones éstas deben diferenciarse de las causadas por la coccidiosis hepática (Cogal, 2003; Flatt y Moses, 1975) ocasionando pérdidas económicas.

En todas las enfermedades se genera una respuesta inmunológica, que es el conjunto de mecanismos fisiológicos que le permiten al animal identificar los antígenos, neutralizarlos y eliminarlos o metabolizarlos con o sin lesiones de los tejidos (Tizard, 2013). La respuesta inmunológica se divide básicamente en respuesta innata y adaptativa. La respuesta innata es inespecífica y se lleva a cabo desde los primeros minutos del contacto con el antígeno, siendo los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células asesinas naturales o NK los primeros en responder llevando a cabo mecanismos de fagocitosis, activación de las vías del complemento y secreción de citocinas, con el objetivo de destruir al antígeno y también de presentarlo a los linfocitos, que van a generar una respuesta de tipo adaptativa. En esta participan los linfocitos B y sus productos como los anticuerpos. A este tipo de respuesta se le llama inmunidad humoral, y la respuesta celular es llevada a cabo por los linfocitos T con sus diferentes subpoblaciones, los llamados Linfocitos T cooperadores (LTh o CD4+), que se encargan de activar a otras células como macrófagos y Linfocitos B, y los llamados Linfocitos T citotóxicos o CD8+, que destruyen directamente a las células infectadas (Abbas, 2008). Una vez que los antígenos son presentados a los linfocitos T CD4+ vírgenes, estos son activados y la respuesta inmunológica se puede polarizar en Th1 o Th2, de acuerdo con el patrón de citocinas que producen tras su activación, por lo que van a ser determinantes para el control o favorecimiento de los diferentes agentes infecciosos (Lopez-Moreno, 2002).

Se ha estudiado ampliamente la respuesta inmunitaria para las parasitosis producidas por protozoarios y nemátodos intestinales, no así para las parasitosis tisulares,

como las cestodiasis, en las cuales, para algunas especies de Tenias, el humano puede ser un hospedero intermediario.

Con el fin de elucidar la participación de las subpoblaciones de linfocitos T, en la respuesta protectora o permisiva en las cestodiasis se han llevado a cabo diversos estudios en modelos experimentales y en humanos. Entre los modelos más utilizados para el estudio de la división efectora de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en Th1 o Th2, se encuentra la cisticercosis murina, inducida por *T. crassiceps*, y la cisticercosis cunícola, inducida por *T. pisiformis*. Estos modelos se han empleado para estudiar diversos aspectos de la teniasis y cisticercosis (Lopez-Moreno, 2002; Larralde *et al.*, 1995; Morales-Montor *et al.*, 2001; Toral-Bastida *et al.*, 2011) ya que presenta reacción cruzada con antígenos oncosferales y de cisticercos con otras tenias (Garcia-Allan *et al.*, 1996). Además, las células y moléculas del sistema inmunitario del conejo que contribuyen a la inmunidad mediada por células, aunque menos estudiadas y caracterizadas que las de los humanos y los ratones, son comparables (Mage, 2005).

En las cisticercosis en cerdos infectados con huevos de *T. solium* se han descrito reacciones inflamatorias que se presentan en el tejido infectado cuando el sistema inmunitario reconoce al metacéstodo. Esta respuesta inflamatoria se caracteriza por la presencia de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfocitos y monocitos. Cuando estas células no logran la destrucción inicial del parásito llevan a cabo un proceso de inflamación crónica que da lugar a la formación de estructuras comparables con folículos linfoides, la presencia de linfocitos juega un importante papel en la destrucción del parásito, siendo numerosos en la respuesta granulomatosa (Aluja y Vargas, 1988). Aunque no se ha propuesto un mecanismo efector en contra del cisticerco u otras enfermedades por céstodos, es probable que su neutralización y destrucción se lleve a cabo por mecanismos similares, en donde en etapas tempranas de la infección, la línea de ataque puede estar

determinada por eosinófilos, pero al no lograr dañar al parásito, en la etapa tardía, tras la llegada de los macrófagos, el parásito comienza a degenerarse y estos forman células epitelioideas alrededor del metacétodo. En estas etapas hay un incremento en los agregados de linfocitos T, donde los CD4+ presentes pueden diferenciarse en Th1 por la IL-12 producida por macrófagos y a su vez estos activar a otros macrófagos que pueden secretar factores de crecimiento de células mesenquimatosas, favoreciendo de esta manera la fibrosis que se observa en la etapa final (Lopez-Moreno, 2002). Esto coincide con lo determinado por Pérez-Torres *et al.*, (2002), quienes, al correlacionar los diferentes grados histológicos de la infección con la presencia de subtipos de linfocitos mediante el uso de inmunohistoquímica, encontraron que en el grado 1 (con un mínimo infiltrado inflamatorio) contiene eosinófilos y algunas células mononucleares, en las que se muestran más células T CD4+ que CD8+, y células IgM+. Además, en el grado 3 (cuando hay una reacción granulomatosa) hay presencia de macrófagos, fibroblastos y fibrocitos, y en el infiltrado celular se observan células CD4+, CD8+ e IgM+ y comienza la destrucción del parásito. En el grado 5 solo se observan algunas estructuras del parásito, los subtipos de linfocitos disminuyen en número y no es muy diferente a la presencia del grado 1 excepto porque hay células IgM+ (Pérez-Torres *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado, la cisticercosis por *T. pisiformis*, típicamente induce a la formación de granulomas hepáticos. En un estudio previo se analizaron histológicamente granulomas hepáticos obtenidos a los 7 y 21 días pos infección, encontrando linfocitos y macrófagos rodeando la lesión. Algunos de ellos contenían residuos de larvas en el centro, las áreas necróticas tenían restos de hepatocitos, macrófagos y fragmentos del parásito rodeados de células epitelioides, y células gigantes multinucleadas (Betancourt-Alonso *et al.*, 2012). Sin embargo, en la cisticercosis causada por *T. pisiformis*, no se han reportado estudios inmunohistológicos que permitan caracterizar las poblaciones linfocitarias que participan en la respuesta inmune inducida por esta parasitosis. En cuanto a la caracterización de los granulomas en otros órganos como en el pulmón no se han reportado estudios para la cisticercosis por *T. pisiformis*. El conocimiento de los cambios en el patrón de migración de macrófagos y linfocitos en los granulomas será de gran utilidad en la futura modulación de la parasitosis.

HIPÓTESIS

En los granulomas de conejos infectados con huevos de *T. pisiformis* hay reclutamiento de subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+, y de macrófagos.

OBJETIVO GENERAL

Inmunocaracterizar las subpoblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ y macrófagos CD14+ en granulomas de conejos infectados con huevos de *T. pisiformis*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener granulomas hepáticos en conejos con infección crónica por metacéstodo de *T. pisiformis*
2. Obtener cortes histológicos de los granulomas en el tejido hepático
3. Inmunodetectar las poblaciones de linfocitos CD4+, CD8+ y macrófagos CD14+.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tejidos derivados de experimentos previos, que fueron obtenidos con la metodología que se describe a continuación.

Animales

Se utilizaron ocho conejos adultos de la raza Nueva Zelanda sin historia de infección parasitaria o signos de enfermedad. Fueron mantenidos en jaulas individuales y se les administró agua y alimento *ad libitum*. Seis fueron infectados con 2900 huevos de *T. pisiformis* y sacrificados a los 77 días post infección para obtener granulomas hepáticos, y dos fueron usados como testigos sanos.

Obtención de proglótidos de *T. pisiformis*

Se obtuvieron a partir de un perro conseguido en un centro de control canino que fue desparasitado y posteriormente infectado con metacéstodos obtenidos de conejos infectados de manera natural. Se extrajeron los proglótidos grávidos liberados en las heces y se depositaron en un recipiente estéril con solución salina fisiológica (SSF), a 4°C. Después de la obtención de los proglótidos, el perro fue desparasitado y dado en adopción. Se procedió a la identificación de los proglótidos a nivel microscópico, tomando en cuenta sus características morfológicas (Quiroz, 2005).

Obtención y cuantificación de huevos de *T. pisiformis*

En una caja de Petri los proglótidos grávidos maduros obtenidos se maceraron utilizando un mortero. El macerado obtenido se observó al microscopio (40x), para verificar la presencia de huevos y una vez identificados se llevó a cabo la cuantificación de los mismos. Para la cuantificación se tomaron 10 µl de la suspensión de huevos (diluida 1:10), y este volumen se depositó en una cámara de Neubauer, contando los huevos que se encuentren en el cuadrante central con un objetivo 40x (Flores-Perez *et al.*, 2003).

Infección

Los conejos se tranquilizaron utilizando ketamina/xilacina (35/5 mg/kg IM) (Muir, 2001) y se inocularon con 2,900 huevos por conejo, utilizando una sonda estéril via oral (Flores-Perez *et al.*, 2003; Flatt y Moses, 1975).

Sacrificio humanitario

Los conejos se sacrificaron de manera humanitaria, a los 77 días post infección, utilizando una sobredosis de pentobarbital sódico intracardiaco (100 mg/kg de peso) (Muir, 2001), previa tranquilización con xilacina/Ketamina 5/35 mg/kg (AVMA, 2001).

Se registraron los cambios a la necropsia de cada animal en un protocolo diseñado para este fin, en el que se describieron las lesiones existentes. En todos los casos se obtuvieron imágenes representativas de estos hallazgos anatomopatológicos en una cámara digital.

Obtención de tejidos y procesamiento histológico

El hígado de cada animal que presentó granulomas fue obtenido y fijado en una solución de paraformaldehído al 4 % durante 72 horas y como control se tuvieron hígados sin lesiones, obtenidos de los animales testigos. Los segmentos de tejido fijados se procesaron conforme a la técnica de inclusión en parafina, con una previa deshidratación del tejido con alcohol etílico en concentraciones ascendentes hasta llegar al grado reactivo y se llevaron a cabo secciones histológicas seriadas de 6-8 μm de grosor. Se montaron en portaobjetos tratados con Poly-L-lysina (Lab. Sigma aldrich cat # P8920)

Inmunodetección de linfocitos CD4+ y CD8+ y macrófagos en tejido hepático

La inmunodetección se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos para cada tipo celular (anti CD4+ y anti CD8+ para linfocitos T y anti CD14 para macrófagos), los cuales pudieron ser visualizados utilizando el sistema Biotina-Avidina-Peroxidasa, revelado con el cromógeno DAB, sustrato de peroxidasa (Pérez Torres A, 2002). Con esta metodología las células que son positivas adquieren una coloración café que puede ser visualizada por microscopia.

Los cortes histológicos se desparafinaron a 60° C por 15 min en el interior de una estufa, seguido por 2 lavados continuos de xilol de 5 minutos cada uno, posteriormente se llevó a cabo la hidratación iniciando con alcohol absoluto dos cambios de 5 minutos para luego continuar con alcohol al 95%, 80%, 70%, 60% ,50%, durante 5 minutos en cada uno, dos cambios, y por último se hidrato en agua destilada

El desenmascaramiento antigénico se llevó acabo con buffer de Citrato de Sodio a una temperatura de 90 °C durante 25 minutos (0.01 mM, pH 6 en H₂O).

Se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS (10 mM Fosfato de sodio, pH 7.5, 0.9% cloruro de sodio PBS)30 min y se inhibieron las peroxidasas con H₂O₂ al 1%(diluida en agua destilada) durante 60 minutos a 4° C, se lavó con PBS durante 5 minutos y se bloqueó la inespecificidad antigénica con la incubación con albumina al 3% en PBS por 30 min a temperatura ambiente.

Para revelar la señal de peroxidasa se utilizó el kit PK-6102 Mouse IgG Vectastain ABC kit, Vector Labs, Inc. Burlingame, CA y se siguieron las instrucciones del fabricante.

A las muestras correspondientes se añadieron 100 µl de anticuerpos primarios monoclonales diluidos 1:10 en suero de bloqueo (kit Vectastain suero normal, tapon amarillo) (anti CD4, Kingfisher Biotech, Inc cat # WS0778U-100, anti CD14 Antibodies-online cat # ABIN289948 y anti CD8, Novus. Biologicals cat #NB100-64021PECY7) y se incubaron a 4° C durante toda la noche.

Se lavó con PBS y posteriormente se incubó con anticuerpos secundarios 100 µl durante 2 hr a temperatura ambiente, se lavó con PBS durante 5 minutos y se incubo con estreptavidina-peroxidasa (kit Vectastain pk6102) 100 µl por 1 hr a temperatura ambiente.

Se lavó con PBS durante 5 minutos y se reveló la muestra con diaminobenzidina (DAB) (Vector Labs. # SK-4100), que se preparó al momento a temperatura ambiente hasta la visualización del color (sepia) y se lavó con PBS durante 5 minutos.

Los núcleos fueron contra teñidos con hematoxilina de Meller durante 60 segundos.

Se procedió a deshidratar (con alcoholes de distintas graduaciones y dos baños en xilol)5 minutos en cada solución y montar con resina Entellan (Merck Millipore cat #107961) para su observación al microscopio

Las laminillas se observaron y las subpoblaciones celulares se cuantificaron con un microscopio acoplado a un analizador de imágenes que posee una cámara MOTICAM 10+, 10 MP, USB 3.0, Motic, se cuantificaron un total de 90 campos microscópicos con el objetivo de 40X de cada individuo.

Análisis estadístico

Los datos experimentales fueron transformados logarítmicamente, con la finalidad de normalizarlos y posteriormente se aplicó una prueba de ANOVA , seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Tukey para establecer diferencias entre subpoblaciones , posteriormente las proporciones de células obtenidas para cada subpoblación fueron contrastadas con una prueba de Z para la diferencia entre dos proporciones de esta manera se contrastaron las proporciones obtenidas para cada una de las sub poblaciones CD8+, CD4+ y CD14+. Se consideraron los valores significativos cuando el valor P sea menor a 0.05.

RESULTADOS

Se observan las subpoblaciones celulares marcadas con anticuerpos anti CD4+, CD8+ y CD14+ (figuras 1, 2, 3). Se observan las células marcadas mediante el sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa contrastadas con hematoxilina, con una coloración café que se interpretan como células positivas al marcaje con el anticuerpo.

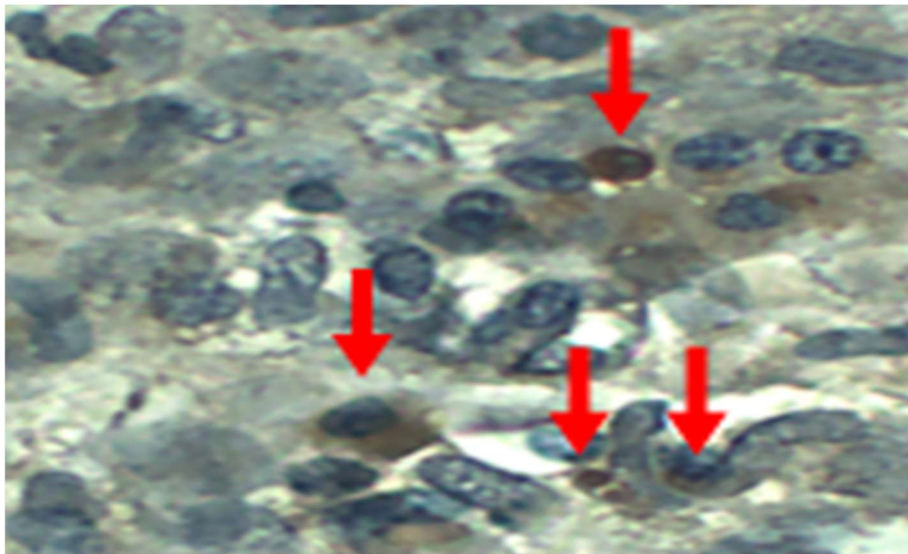


Figura 2. Microfotografía obtenida de secciones histológicas procesadas en parafina, de 7 μ m de grosor, detectadas con la técnica de inmunoperoxidasa y contra teñidas con hematoxilina. Células positivas a CD4+ (flechas) en granuloma de tejido hepático obtenido de conejos infectados con huevos de *T. pisiformis* 77 días post infección (40X).

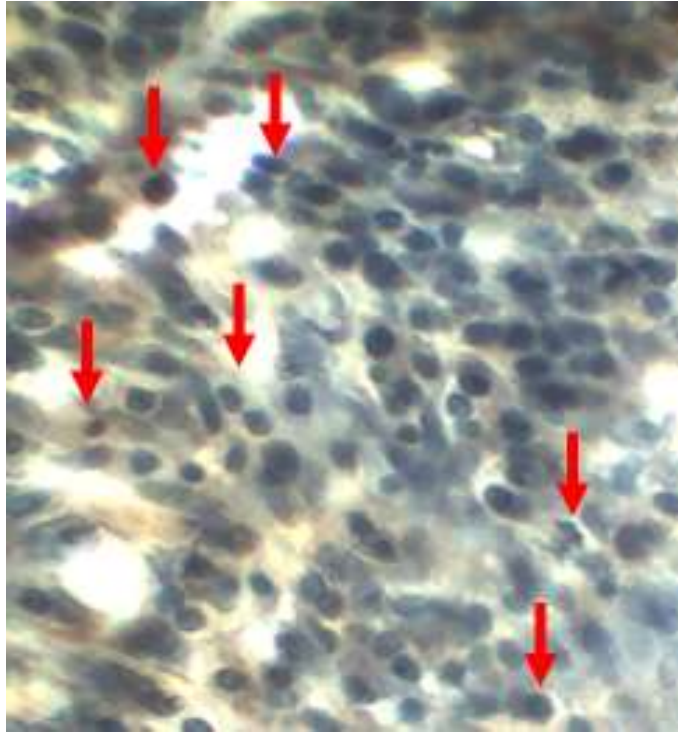


Figura 3. Microfotografía obtenida de secciones histológicas procesadas en parafina cortes de 7 μ m de grosor, procesadas con la técnica de inmunoperoxidasa y contra teñidas con hematoxilina positivas a CD8+ (flechas) en granuloma de tejido hepático de conejos infectados con huevos de *Taenia pisiformis* 77 días post infección (40X).

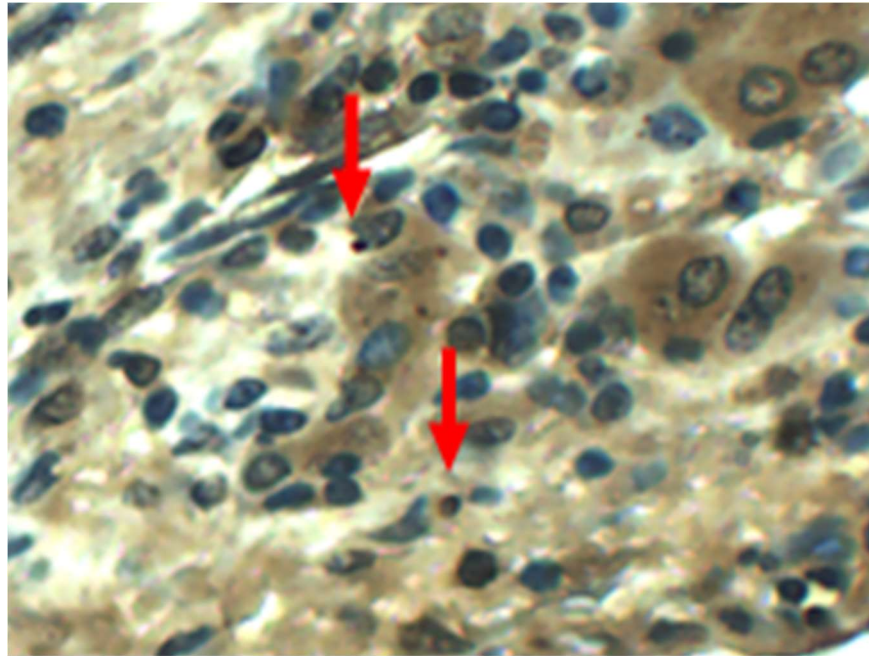


Figura 4. Microfotografía obtenida a partir secciones histológicas procesadas en parafina cortes de 7 μ m de grosor, procesadas con la técnica de inmunoperoxidasa y contra teñidas con hematoxilina positivas a CD14 (flechas) en granuloma de tejido hepático de conejos infectados con huevos de *Taenia pisiformis*. 40X

Al llevar a cabo la cuantificación de linfocitos en los granulomas obtenidos a partir de conejos infectados experimentalmente se observó que las células que se obtuvieron en mayor número fueron los linfocitos CD8+, para los cuales el número máximo que se observó en un campo fue de 9 y el mínimo de cero. En tanto para los linfocitos CD14+, el mayor número fue de 5 y el menor número de células fue de 1, que se evidenciaron con la inmunodetección (Figura 4).

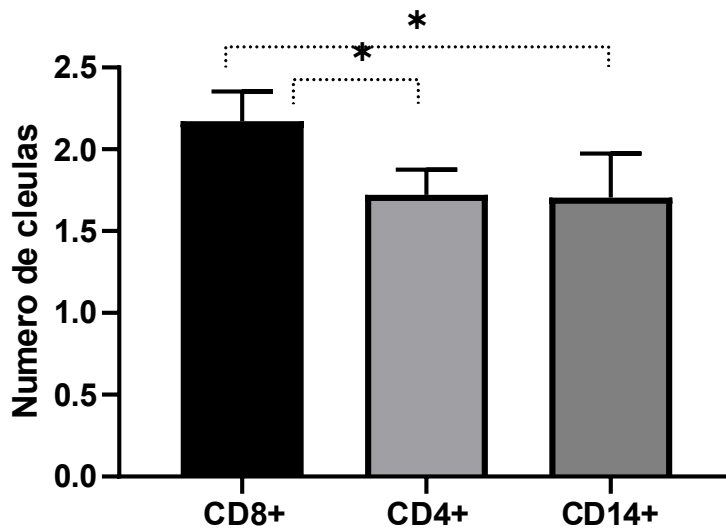


Figura 5. Diferentes subgrupos de leucocitos obtenidos de granulomas hepáticos causados por la infección con huevos de *T. pisiformis* en conejos. Prueba de ANOVA y post prueba de Tukey, promedio ± EE.

La mayor subpoblación correspondió a los linfocitos CD8+ con el 57.49 % vs los linfocitos CD4+ con el 32.40%, y por último la población que se registró, en menor proporción correspondió a los linfocitos CD14+ que se tradujo en un 10.10% de un total de 287 células inmunodetectadas en las secciones histológicas (figura 5). Al contrastar las células CD8+ resultaron ser 25% más en relación a las células con fenotipo CD4+ ($P \leq 0.01$), en tanto que al contrastarlas con las células cd14 resultaron ser una población casi 6 veces más abundante ($P \leq 0.0001$); Figura 5A y 5B), finalmente al comparar la proporción obtenida e células CD 4+, resultaron ser 3 veces más abundantes en relación a las células CD14+, confirmando así que esta última es la población menos abundante ($P \leq 0.01$)

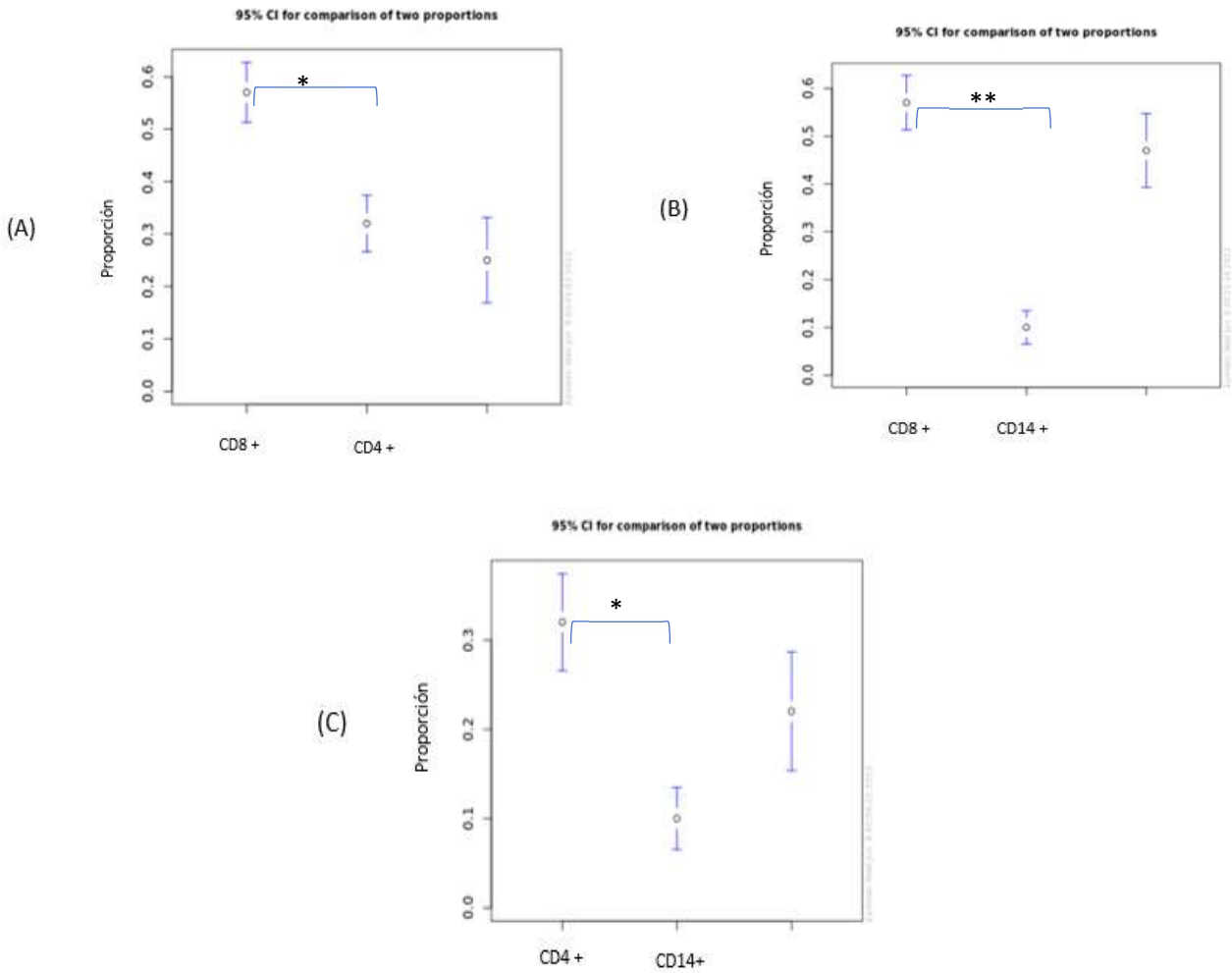


Figura 6. Proporción de células obtenida para cada una de las subpoblaciones evaluadas en granulomas células CD4+, CD8+ y CD14+ en granulomas de tejido hepático a los 77 días post infección. A) Comparación entre proporciones de linfocitos CD8+ y CD4+. B) Contraste de proporción entre CD8+ y CD14+. C) Comparación de proporciones CD4+ vs CD14+. Prueba de Z para la diferencia entre dos proporciones (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

DISCUSIÓN

En la inmunodetección de los granulomas obtenidos de tejido hepático en conejos infectados con huevos de *Taenia pisiformis*, se observa que la inmunodetección al ser capaz de detectar la presencia de distintas poblaciones celulares del sistema inmune con la reacción antígeno anticuerpo, evidenció que la subpoblación mayoritaria en granulomas corresponde a CD8+, seguida de linfocitos CD4+, y por ultima de la subpoblación de macrófagos CD14+.

Las células T CD8+ (citotóxicas), se generan en el timo de manera similar las células CD4+, así mismo, expresan el receptor de células T (TCR). En particular las células CD8+ expresan el correceptor dimérico CD8, compuesto por una cadena CD8 α y otra CD8 β , y carecen de la expresión de la molécula CD4. En este contexto, las células CD8 reconocen péptidos unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), de clase I, que existen en prácticamente todas las células nucleadas. El heterodímero CD8 se une a la llamada región $\alpha 3$ de la molécula de MHC durante la presentación de antígenos, entre células T y células presentadoras de antígenos (APC). Las células CD8, se consideran células T citotóxicas, que al activarse poseen tres mecanismos para eliminar patógenos, el primero que en términos generales consiste en la secreción de citocinas como TNF- α e IFN- γ , con acción antitumoral y antimicrobiana. La segunda, Síntesis y producción de gránulos, que en su interior contienen proteasas como son perforinas y granzimas. Comúnmente las perforinas forman un poro en la membrana de la célula blanco, en tanto que las granzimas poseen una función secuencial secundaria al ingresar por los poros preformados y como serin-proteasas procesan las proteínas del interior celular, inhibiendo la síntesis proteica por parte de microorganismos para después inducir muerte celular por apoptosis. Además, lo hacen de manera selectiva y específica por medio de la sinapsis inmunitaria, evitando así dañar células sanas. Por último, el mecanismo de

inducción de apoptosis por la vía de Fas/FasL, es la vía por la cual las células CD8+ eliminan patógenos. Esta vía depende de la activación de caspasas, aquí la muerte celular puede ser inducida a otras células o incluso a la misma célula CD8+, de este modo se puede regular la respuesta inmunitaria.

En el caso de granulomas hepáticos inducidos por otras parasitosis provocadas por cestodo como es la *Taenia solium*, existen descripciones morfológicas de las células que los componen e incluso se han propuesto grados de afectación, en el caso del metacéstodo de *Taenia pisiformis* existen trabajos previos centrados únicamente en una descripción morfológica de los granulomas a nivel hepático (Aluja y Vargas 1989), y con respecto a los granulomas hepáticos se menciona que las células predominantes en el cerdo son CD4+ y que el segundo tipo células más abundante es CD8+. Así mismo, los autores mencionan que entre mayor es el grado de destrucción, las células CD8+ tienden a incrementar, sin embargo, no superan a las CD4+ (Pérez-Torres et al 2002.). Con respecto a los metacéstodos de *Taenia pisiformis*, hay escasa información referente a las subpoblaciones de las células que los componen, ya que los estudios previos se han enfocado en describir a los linfocitos presentes a nivel hepático (Flatt et al 1975, Flores-Pérez et al 2018). En el estudio de Flores-Pérez et al., (2018) se comenta que los linfocitos se incrementan mientras más tiempo pasa de la infección. También se menciona que el tamaño de los granulomas va decreciendo según el tiempo post infección. Tomando en cuenta lo anterior, el presente estudio es pionero en proponer el predominio de las células CD8+ con respecto a otras subpoblaciones como las células CD4+ y CD14+. Por otra parte, las diferencias que se encontraron con respecto al presente estudio, relativo a granulomas hepáticos de *Taenia pisiformis* vs. el estudio en el que se menciona el predominio a nivel hepático de células CD8+, seguidas de CD4+, podrían ser atribuidas a distintos factores como son los tiempos de infección empleados, tipo de infección (natural vs. experimental),

cargas parasitarias y posiblemente la especie, entre otros, ya que en el caso de los suinos se ha previamente referido que alrededor de un 60% de los linfocitos con los que cuentan corresponden a él fenotipo doble positivo CD8+ / CD4+ (Overgad et al. 2014)

La presencia de linfocitos CD8+ y CD4+, y en menor grado de macrófagos CD14+, que se inmunodetectaron con anticuerpos en el presente estudio, podría sugerir el predominio de una respuesta tipo definir (TH1). Sin embargo, una limitante del presente estudio es que no se determinaron las citocinas a nivel celular, por lo cual se propone en un futuro llevar a cabo ese abordaje experimental. Esta hipótesis de proponer el predominio de la respuesta TH1 ha sido planteada previamente en el caso del metacéstodos de *T. crassiceps* (Terrazas et al.,1999). También es importante mencionar que se ha documentado previamente que los granulomas cuentan con tipo celulares capaces de sintetizar citosinas, como son interferón y IFN- γ), factor de necrosis tumoral α (TNF α), interleucina-1 (IL-1) (Silva et al., 2012) que es un criterio muy importante para definir si la respuesta es TH1 o TH2.

En el caso de los granulomas a nivel del encéfalo que han sido obtenidos de pacientes humanos infectados con el metacéstodo de *Taenia solium*, se ha mencionado que la población predominante de linfocitos T son los CD8+ (Restrepo et al 2001), lo que coincide con las observaciones llevadas a cabo en el presente estudio a nivel hepático, lo que podría hacer a la *Taenia pisiformis* un candidato idóneo para el estudio comparado de las cestodiasis presentes en el humano.

CONCLUSIONES

- A los 77 días post infección la subpoblación linfocitaria predominante fue CD8+.
- A los 77 días la población leucocitaria que se inmunodetectó en menor cantidad fue CD14+.

LITERATURA CITADA

- Abbas A, Lichman A (2008) Inmunología celular y molecular. 6ta edición Elsevier España, Madrid.
- Aluja A, Vargas G. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* Apr;28(1-2):65-77.
- AVMA American Veterinary Medical Association (2001) Report of the AVMA panel on euthanasia. *J Am Vet Assoc* 218: 669-696.
- Betancourt MA, de Aluja A., Sciutto E., Hernández M, Bobes R, Rosas G, Hernández B, Fragoso G, Hallal-Calleros C., Aguilar L., Flores-Peréz I. 2012. Effective protection induced by three different versions of the porcine S3Pvac anti cysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia Pisiformis* cysticercosis. *Vaccine.* 5:30 (17):2760-7. doi: 10.1016/j.vaccine
- Betancourt-Alonso, M.; Orihuela, A.; Aguirre, V.; Vázquez, R.; Flores-Pérez, F. (2011). Changes in behavioural and physiological parameters associated with *Taenia pisiformis* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) that may improve early detection of sick rabbits. *World Rabbit Science.* 19(1):21-30.
- Cheeke P R. 1986. Potentials of rabbit production in tropical and subtropical agricultural systems. *J. of Anim. Sci.* 63: 1581-1856.
- Cogal (2003) Problemas parasitarios en cunicultura: medidas para su buen control. En P. Diez Baños, COGAL (págs. 13-19). Galicia España: Cogal.
- Co D, Hogan L, Sandor M, *et al.* 2004. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. *Immunol Lett.* 2004 Mar 29; 92(1-2):135-42.
- Diez-Baños P. 2003. Problemas parasitarios en cunicultura: medidas para su buen control. COGAL. España 13-19
- FAO (1997) The Rabbit Husbandry Health and Production. Rome: FAO.

Faleiro R, Kumar R, Hafner L, *et al.* 2014. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(7): e2914. doi:10.1371/journal.pntd.0002914

Flatt R, Moses R. 1975. Lesions of experimental cisticercosis in domestic rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 25(2): 162-7.

Flores-Pérez FI; M. Pérez-Martínez; A. Pérez-Torres; I. Camacho-Arroyo; M.L. Garduño-Millán; R. Ramírez- Aquino; H. Jiménez-Cortez, C. Hallal-Calleros. 2018. Histological analysis of the temporal influx of immune cells into hepatic granulomas induced by *Taenia pisiformis* in rabbits. *The J. Anim. Plant Sci.* 28(2)

Garcia-Allan C, Flisser Martinez N. 1996. Inmunocharacterization of *Taenia solium* oncospherean metacestode antigens. *J. Helminthol.* Dec; 70(4):271-80.

Gemmell MA, 1965. Immunological Responses of the Mammalian Host against tape worm infections. *Immunol.* 8. 281.

Geramizadeh B, Jahangiri R, Moradi E. 2011. Causes of Hepatic Granuloma: A 12-Year Single Center Experience. From Southern Iran. *Arch Iran Med.* Jul; 14(4):288-9. doi: 0011144/AIM.0012.

Jeklova E, Leva L, Faldina M. 2007. Lymphoid organ development in rabbits: Major lymphocyte subsets. *Dev Comp Immunol.* 31(6):632-44. Epub 2006 Nov 7.

Larralde C, Morales J, Terrazas I, *et al.* 1995. Sex hormones in changes induced buthe parasite lead to feminization of the male host in murine *taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, pp. 52: 575-580.

Lopez-Moreno, Hector Samuel 2002. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. *Salud Publica Mex.* 44: 145-152.

Mage G, Rose. 2005. Rabbit immune system. *Encyclopedic Reference of Immunotoxicology*, de Hans-Werner Vohr. Springer-Verlang,

Morales-Montor J, Newhouse E, Mohamed F, Baghdadi A, Damian RT. Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*. 2001 Jan 15;183(2):313-320.

Muir W (2001) Manual de anestesia veterinaria. España: Harcourt, 3a edición.

Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol*. 2015 Jan;97(1):31-8. doi: 10.1189/jlb.1RU0814-382. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25360000.

Pérez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, de AA. 2002. *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res*. Feb;88(2):150-2. doi: 10.1007/s00436-001-0510-6. PMID: 11936504.

Quiroz H. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México: Editorial LIMUSA

Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun*. 2001 Jul;69(7):4554-60. doi: 10.1128/IAI.69.7.4554-4560.2001. PMID: 11401999; PMCID: PMC98532.

Tara S S, White S D, Hawkins M G; *et al.* (2013) Skin diseases in pet rabbits: a retrospective study of 334 seen at the University of California at Davis, USA (1984-2004). *Veterinary Dermatology* 24(6): 613- e148

Tizard I (2013) *Veterinary Immunology*. Saunders, an Imprint of Elsevier Inc.

Toral-Bastida E, Garza-Rodríguez A, Jimenez-Gonzalez D E, *et al.* (2011) Development of *Taenia pisiformis* in golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasites & Vectors* 4:147-150

Warren D (2002) *Small animal care and management*. Albany: McHugh pratt M.

Yang D, Fu Y, Wu X, *et al.* (2012) Annotation of the Transcriptome from *Taenia pisiformis* and Its Comparative Analysis with Three Taeniidae Species. *plos ONE* 7(4): e32283.



Cuernavaca, Morelos, 10 de mayo de 2022

DRA. MARTHA LAURA GARDUÑO MILLÁN
JEFATURA DEL PE DE IAPA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

En respuesta al oficio con fecha 25 de abril de 2022, donde se me nombra miembro del jurado calificador de la tesis denominado **INMUNODETENCIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis* EN EL CONEJO DOMÉSTICO.**

Que presenta el **C. NELSON ANFERNEE TORRES SALGADO**, pasante de la carrera de Ingeniería en Producción Animal, bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la **codirección de la DRA. CLAUDIA HALLAL CALLEROS** le comunico que el documento lo considero **APROBADO.**

Sin más por el momento, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

DR. FERNANDO IVÁN FLORES PEREZ
(firma electrónica)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO IVAN FLORES PEREZ | Fecha:2022-05-16 14:33:19 | Firmante

RFxFfEFeQ0PZcUQpd1VzOjJxJKKTRoTswsyV3WWEgzhH7QR7yrL4quHRZlgXkFFkPaxwDwPs0u+5QKVICEDMMAeFzwd6GOVJUyH7o556dNII+Vm83/FdNast0VU/GzjQ9TbQA1zI9eArpo5sWiiK2raYPkXYcnPeWJA2bUGBVT1xaAh55T3mda0dDum9oh0PQ9LCylov8iQbZcr+6hJOEKQ9JgkNYxLD1O88z+ZD4oRFxR5EkfeUS7XEceXB/pFk3keoPuEo olJd5JC5ruSOSCvqly+R00v85+LwqKeO4jSGzwTDNspceIE+cr1ntte8w5QcV3kvSnnD1OBbelQqw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[KkxdWVDsH](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/HXtQ7GJhKhmb3S1oGIIRoMsKZCj4WoO9>





Cuernavaca, Morelos, 10 de mayo de 2022

DRA. MARTHA LAURA GARDUÑO MILLÁN
JEFATURA DEL PE DE IAPA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

En respuesta al oficio con fecha 25 de abril de 2022, donde se me nombra miembro del jurado calificador de la tesis denominada **INMUNODETENCIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis* EN EL CONEJO DOMÉSTICO.**

Que presenta el **C. NELSON ANFERNEE TORRES SALGADO**, pasante de la carrera de Ingeniería en Producción Animal, bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la **codirección de la DRA. CLAUDIA HALLAL CALLEROS** le comunico que el documento lo considero **APROBADO.**

Sin más por el momento, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

DRA. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRIGUEZ
(firma electrónica)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ | Fecha:2022-05-14 13:04:16 | Firmante

sYE9/hKfT0coo4rojTsrQYBEpPgvZ7ZX9M8qkXcuAzYm5RQgVzBaOjHoJXi7j5hPojKCC60S749SSxkv8KDJ+TwpX9SXUR2VOy5w2dH0g/6bREqQ8DHezCx5qJHgA10SEe+K527YB0iGIMFf8gcymMy69LpnQaTzKzvKMPJaRZ65aAJNsXSHExbcjsOApisilvMU0VyI5LRp7EXX4K0i4s8hJ4nRcln1KL7cWUUnvykC2BySTDghMzDuexANGaKml3Ct0/Eyy9W/KaiAtY6hYK6+IxgKhTP0pFm9Wjk2y0a08BnQ5pmwC8GdHZJZFSGWin54shJWrgMleUSYBiCKHg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[0gD2CoTpY](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Rk2X7BstfKfkh7cTRiJQaiZjnkIzZnC3>





Cuernavaca, Morelos, 10 de mayo de 2022

DRA. MARTHA LAURA GARDUÑO MILLÁN
JEFATURA DEL PE DE IAPA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

En respuesta al oficio con fecha 25 de abril de 2022, donde se me nombra miembro del jurado calificador de la tesis denominada **INMUNODETENCIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis* EN EL CONEJO DOMÉSTICO.**

Que presenta el **C. NELSON ANFERNEE TORRES SALGADO**, pasante de la carrera de Ingeniería en Producción Animal, bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la **codirección de la DRA. CLAUDIA HALLAL CALLEROS** le comunico que el documento lo considero **APROBADO.**

Sin más por el momento, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

DR. GERMAN BERNAL FERNANDEZ
(firma electrónica)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha:2022-05-13 15:40:27 | Firmante

VoZdSaxwFiyGAYz5fXoubztjianHsmFjzz3H8SHeObAXUMunkkcHcTXPwnb8LKib5qa7kL95cJh65N/BW0FxRZjj3bozLXphlWQOPn/6tCqUrG36oVkshKga8TIW6z8QMYeWeSpSpXAt8Wxf4xXVxJEjowyDcdxyCcmbtz2+mG7pF5tLvz80RyEpNJGu5DVRVjTHm7P+EF5lp+SyX/z5nQ6oUxO8iO0xxhTMBR/XHCSJSH3C+JUHS3aWkTBvbGf01Sd3ub96THJh4R0spAuJHkfia7b3dTTr7m+K5bvo8kvCngLmey2pQHiYz0zQo+ny05LpFOH+VysmJHgfmzCXJlw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[mLSxf6GsR](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Jzrp6wLTZXRRYd6FxoGhtjAspywJVORl>





Cuernavaca, Morelos, 10 de mayo de 2022

DRA. MARTHA LAURA GARDUÑO MILLÁN
JEFATURA DEL PE DE IAPA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

En respuesta al oficio con fecha 25 de abril de 2022, donde se me nombra miembro del jurado calificador de la tesis denominada **INMUNODETENCIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis* EN EL CONEJO DOMÉSTICO.**

Que presenta el **C. NELSON ANFERNEE TORRES SALGADO**, pasante de la carrera de Ingeniería en Producción Animal, bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la **codirección de la DRA. CLAUDIA HALLAL CALLEROS** le comunico que el documento lo considero **APROBADO.**

Sin más por el momento, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

DRA. MARIANA PEDERNEIRA ROMANO
(firma electrónica)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIANA PEDRNERA ROMANO | Fecha:2022-05-17 15:37:41 | Firmante

bZjE/QNslZSDVL3tf81maxBAY6cUKAd2255mbox+9HRC1j7mcAw48Z5PbXswGyzOCqBhDoZTO1xNTEEnJLb9nKaKobJ36UX6t2xBvOpCQkHvRkdbWdyd5Ac4XCziJCBzYXNrw
VX+2mA01IFaFkvgRGloqS6NunxT+CTwlbLzbg9C6Ho//GQA2fg7Be5C0AoAgsfmqapkyHbvfb0Q5gBNfjuRjs2s1cBR1R8CKt1Ikj+Hd61umakP5MfNlaHig4CL5VrQfmY6fW2TQj
+Msur8tfGoz/kjGTfvnZZ4r9rJm3meNiO82PPsIUx4y0XldW+wI0OHVY6b41GmFTd9VFHlg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SZDI4XOmc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8vvgEktfSMhTEIFpJhjNHqVCYUsttEF>





Cuernavaca, Morelos, 10 de mayo de 2022

DRA. MARTHA LAURA GARDUÑO MILLÁN
JEFATURA DEL PE DE IAPA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E.

En respuesta al oficio con fecha 25 de abril de 2022, donde se me nombra miembro del jurado calificador de la tesis denominado **INMUNODETENCIÓN DE LINFOCITOS Y MACRÓFAGOS EN GRANULOMAS HEPÁTICOS INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON *Taenia pisiformis* EN EL CONEJO DOMÉSTICO.**

Que presenta el **C. NELSON ANFERNEE TORRES SALGADO**, pasante de la carrera de Ingeniería en Producción Animal, bajo la dirección del **DR. FERNANDO IVÁN FLORES PÉREZ** y la **codirección de la DRA. CLAUDIA HALLAL CALLEROS** le comunico que el documento lo considero **APROBADO.**

Sin más por el momento, agradezco de antemano su valiosa colaboración y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta

DR. REYES VAZQUEZ ROSALES
(firma electrónica)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYES VAZQUEZ ROSALES | Fecha:2022-05-16 13:16:32 | Firmante

qrQz1E+mHU5e1+X1yjFNEFKpMjOlhcsfvF0p7eyNBUtd2he0503Ng/nRTFiH5UyhhxNP0kO3u50jzQ7wsMOQRug0ofpiX8U9mIZ7h5MH4BkEivTJnf3/GkQxAcP7ER1sZX8b1XX
vkb/ljG3sP/yhXMzDrr9FXowz9aJ4hfxJZJU7stPvAkvxQBfR7BKWsFAPxayBCD5Z8kFGst8PyKoEuz1seMkNXfjKvibP7JfiowKy9A4IHdmxBnXA8GgB1F1IZJ27xs0sOzXGUMBOp
WuGQrZF5JSkpRK6kdlC9nr+gN6yGridrk5OEGUYIFjCqLVHt6vUdljjTnrOxTFtDH9w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



PKChRx6T0

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7LR2kKmpB0cAcQcQU6wAOT8YuWLSn3no>

