

00322

120



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CARACTERIZACION DE LAS POBLACIONES
CELULARES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE
RATONES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA
CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL MURINA POR
*Taenia crassiceps***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGA
PRESENTA:

GABRIELA MENESES RUIZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DEL TESIS

DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZALEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
CUBULA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Autorizo a la Dirección General de Transmisión de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo profesional.

NOMBRE: Gabriela Meneses Ruiz
FECHA: 1-10-03
FIRMA: [Firma]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la Facultad de Ciencias
Presente

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

CARACTERIZACION DE LAS POBLACIONES CELULARES DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES A LA CLISTICEROSIS EXPERIMENTAL MURINA POR Thenia crassiceps.

realizado por Gabriela Meneses Ruiz

con número de cuenta 8930970-8, quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis Propietario Dra. Gladis Fragoso González
- Propietario Dra. Edda Sciutto Conde
- Propietario Dra. Gabriela Rosas Salgado
- Suplente Dra. Laila Gutiérrez Kobeh
- Suplente M. en C. Andrea A. Toledo Rojas

[Firma]
[Firma]
[Firma] Laila Gutiérrez K

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

Agradezco a mis padres Esteban y Alicia

Papito, por todos estos años de trabajo para darme la oportunidad de llegar a este momento, por tu confianza y tus palabras de aliento en los momentos más difíciles y por tu gran ejemplo de amor al trabajo. Gracias por todo tu cariño y por ser el mejor papá del mundo.

Lich, porque siempre haz sido y serás mi mejor amiga, por todo el amor y dedicación con la que haz velado hasta ahora cada sueño, cada pena, cada esperanza mía, por ser mi mejor ejemplo como madre y esposa, por permitirme y apoyarme a volar hacia mi propio destino, sabes, soy muy feliz....

Gracias porque el resultado de todo su trabajo, amor y confianza es mi felicidad, a ustedes dedico este trabajo con todo mi amor y respeto.

C

A mis hermanos: Claudia, por tu gran ejemplo y tu apoyo en todo momento
Esteban, por todo el apoyo y el cariño
Dulce, por tus consejos y todo lo que de ti he aprendido
Martha, por toda tu ternura, cariño y apoyo en todo momento.

Los quiero mucho

A mi gran familia, tíos, primos, cuñados, sobrinos, por todo su cariño y apoyo. En especial a mi tía Lupe, por su apoyo incondicional.

A Ma. de la Luz y Dolores, que físicamente hoy no están aquí pero siempre me apoyaron y confiaron en mí.

A Carlos May, por estar aquí, por todo tu amor, paciencia, confianza, por estar hombro con hombro en cada momento, sobre todo por compartir tu vida conmigo, por que a tu lado soy muy feliz, Te amo.

Lucas A. May, por ser mi más maravillosa experiencia como mujer, por ese tiempo que no estoy a tu lado como lo desea mi corazón, por esa maravillosa sonrisa que es mi mayor motivación para empezar cada día, te amo hijo.



A mis amigos: Elsy, Luis Felipe, Hugo, en especial a Georgina Galicia por todo su apoyo y cariño.

A Cons y Rodrigo por su inigualable amistad y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio: Laurita, Elvira, Agñes, Mario, Brenda, Ernesto, Anahí, René, Marisela, por su apoyo y grata compañía.

A Carmen y Andrea, por todo su cariño, por que se que en los momentos más duros estarán ahí, por su gran amistad y apoyo, las quiero mucho.

A Mercedes Baca, por todo su apoyo, consejos y cariño.

A Gerardo y Gina por todo el apoyo prestado para realizar este trabajo.

A Gabriela Rosas, por invitarme a trabajar en este grupo, por todo tu tiempo, enseñanzas y apoyo en los momentos duros.

Gracias

A la Dra. Edda Sciutto, por todas sus enseñanzas, por toda la confianza y su gran apoyo, gracias por creer en mí.

A Gladis por tu valiosa amistad, por tu confianza, por todo lo que he aprendido de ti, por tu paciencia y por permitirme ser parte de tu equipo de trabajo.

Muchas gracias.

9

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas,
U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Gladis del Carmen Frago González, con la
asesoría de la Dra. Gabriela Rosas Salgado y la Dra. Edda Scitutto Conde y el
apoyo de DGAPA (proyectos No. IN 213102 e IN 214101)

A handwritten signature in black ink, appearing to be a stylized 'S' or similar character, located at the bottom center of the page.

INDICE

	páginas
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	10
IV. JUSTIFICACION	25
V. HIPOTESIS	26
VI. OBJETIVOS	27
VII. METODOLOGIA	28
1.-Evaluación de la cinética poblacional de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en el modelo experimental de cisticercosis murina	
1.1.- Animales de experimentación	28
1.2.- Infección	28
1.3.- Cuantificación de carga parasitaria	29
2.- Estudio de la cinética de las células del sistema inmune relacionadas con la infección experimental murina causada por el metacéstodo de <i>T. crassiceps</i>	29
2.1.- Animales de experimentación	29
2.2.- Infección	30
2.3- Obtención de células de la cavidad peritoneal	30
2.4.- Cuantificación de la carga parasitaria.	30
2.5.- Determinación y cuantificación de las células de la cavidad peritoneal	
2.5.1 Preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina	31

2.5.2.-.- Citometría de flujo	31
VIII. RESULTADOS	35
1.-Cinética poblacional de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en el modelo experimental de cisticercosis murina	35
2.-Cinética de las células del sistema inmune relacionadas con la infección experimental murina causada por el metacéstodo de <i>T. crassiceps</i>	
2.1.- Cuantificación de la carga parasitaria	37
2.2.-Preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina	38
2.3.-Citometría de flujo	44
IX. DISCUSION	58
1.-Cinética poblacional de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en el modelo experimental de cisticercosis murina	58
2.-Cinética de las células del sistema inmune relacionadas con la infección experimental murina causada por el metacéstodo de <i>T. crassiceps</i>	61
2.2.-Preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina	61
2.3.-Citometría de flujo	62
X. BIBLIOGRAFIA	67
XI. APENDICE I	77

h

Abreviaturas

FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	Fluoresceína
H-E	Hematoxilina-Eosina
LPS	Lipopolisacáridos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Factor de inhibición de migración
NK	Células Natural Killer
PSB	Buffer de fosfatos de sodio
PBS*	Buffer de fosfatos de sodio con 1% SFB y NaH ₃ 0.02%
PE	Phycoeritrina
SFB	Suero Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervioso Central
TCR	Receptor de células T
TLR	Toll like receptors
CD	Células dendríticas
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
ITAM	Motivos de activación de inmunoreceptores basados en tirosina
ITIM	Motivos de inhibición de inmunoreceptores basados en Tirosina
RC	Receptores del complemento

SD	Desviación estándar
IL	Interleucina
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
INF γ	Interferon γ
CD	Cluster of differentiation

5

RESUMEN

Taenia crassiceps es un céstodo con un ciclo de vida indirecto que consiste de tres estadios: huevo u oncósfera, larva o cisticerco y adulto o tenia. Los cisticercos pueden infectar a roedores natural y experimentalmente, donde se reproducen por gemación. En experimentos de laboratorio se encontraron diferencias en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental por *T. crassiceps* entre dos cepas de ratones BALB/c: BALB/cAnN (susceptible) y BALB/cJ (relativamente resistente). Se ha demostrado en estudios anteriores que las células T tienen un papel crítico en el control de ésta parasitosis, sin embargo, existen algunas indicaciones que sugieren que la respuesta inmune innata puede ser relevante en la infección temprana. Con el objeto de explorar esta posibilidad, se estudió el transcurso de la infección peritoneal en cepas BALB/c susceptibles y resistentes, evaluando la reproducción del parásito en un estudio cinético y la respuesta inmune asociada a la infección. Al infectar peritonealmente a los ratones con parásitos intactos no se encontraron diferencias de susceptibilidad entre las dos cepas de ratones. Sin embargo, cuando los ratones se infectaron con parásitos fragmentados, se observaron claras diferencias de susceptibilidad entre ambas cepas desde los tres primeros días de infección. Estos hallazgos sugieren que la cepa BALB/cJ puede prevenir efectivamente la regeneración e instalación del parásito, mientras que la cepa BALB/cAnN no. En ambas cepas se observó un patrón complejo de células en la cavidad peritoneal desde los primeros días de infección (5 días) con predominancia de macrófagos, eosinófilos, linfocitos T y células del parásito. De manera interesante, en la cepa resistente (BALB/cJ) presentó poblaciones de macrófagos aparentemente activados así como un

incremento significativo de células NK a los 5 días de infección lo cual señala la posible relevancia de la respuesta inmune innata en los fenómenos tempranos de la instalación del parásito.

I. INTRODUCCION

Cisticercosis causada por *Taenia solium*

La cisticercosis causada por *Taenia solium* es un problema de salud en países en vías de desarrollo como Asia, Africa y América Latina (White, 2000) y es causada por el estadio larvario (cisticerco). *T. solium* es un parásito del phylum de los Platyhelminthos (gusanos planos), que en su ciclo de vida presenta tres estados de desarrollo: el gusano o tenia (estado adulto), el cisticerco o larva y el huevo u oncósfera (Figura 1).

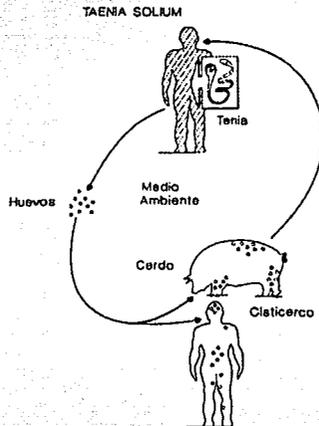


Figura 1: Ciclo de vida de *Taenia solium*. El ciclo de vida contempla un hospedero definitivo (el hombre) en el cual se aloja el gusano o tenia en el intestino y un hospedero intermediario (el cerdo) el cual se infecta con el huevo transformándose en la forma larvaria o cisticerco.

La tenia se ancla en la mucosa intestinal a través de una cabeza ó escolex armada con dos coronas de ganchos denominado rostelo (Figura 2) y a partir de allí comienza a desarrollarse a través de estructuras segmentadas con funciones reproductivas llamadas proglótidos (Figura 3). Cada uno de estos segmentos está equipado de gónadas sexuales masculinas y femeninas que pueden generar huevos. Los proglótidos adquieren grados progresivos de maduración conforme se alejan de la cabeza del gusano.



Figura 2

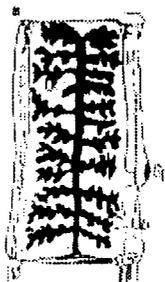


Figura 3

Figura 2. Fotografía del escolex de *T. Solium*, R: rostelo, S: ventosas N: cuello. Visto por microscopia de barrido.

Figura 3. Esquema de los proglótidos maduros de *T. solium*. La característica de bifurcación del útero en el segmento maduro sirve como distintivo entre diferentes especies de tenias, el proglótido mide 12 x 6 mm y posee un útero con siete ramificaciones (Ub), conteniendo órganos reproductivos masculinos y femeninos.

Cada uno de los segmentos puede albergar hasta 50,000 huevos y liberarse en las heces del individuo infectado en forma individual o en fragmentos contaminando así el medio ambiente.

Los huevos u oncosferas están protegidos por una capa que les permite una alta resistencia a factores agresivos del medio (Figura 4). Cuando el humano o el cerdo ingiere los huevos, estos pueden desarrollarse al estado de cisticerco o larva causando la cisticercosis. El ciclo de vida del parásito se completa cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos los cuales se desarrollan al estadio de gusano adulto, el cual causa la teniasis.

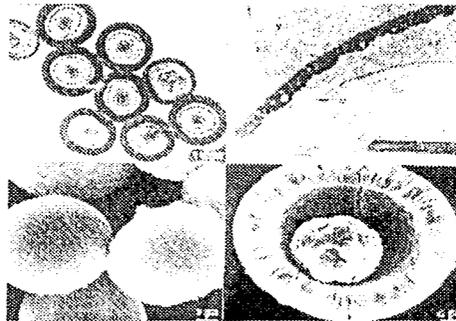


Figura 4: Huevos de *Taenia solium*. A) Observación microscópica de huevo de *Taenia solium*. Los huevos miden entre 30-45 μm y contienen una oncosfera también conocida como embrión hexacanto. B) Fotografía de un corte de un huevo inmaduro visto por microscopía electrónica. C) Fotografía de un huevo de 36-45 μm por 30-40 μm visto por microscopía electrónica de barrido. D) Fotografía de la mitad de un huevo de *Taenia solium* visto por microscopía electrónica de barrido.

En el hombre se estima que la infección ocurre en forma accidental por la ingesta de alimentos mal lavados o mal cocidos y/o a consecuencia de malos hábitos de higiene de los propios procesadores de comida (Larralde *et al.*, 1992).

En el cerdo, ésta parasitosis afecta principalmente a los que se crían en condiciones rústicas y se alimentan en base a desperdicios que incluye heces humanas (Aluja *et al.*, 1988). El ciclo de vida de este parásito se favorece, en especial, en medios rurales y cada día más en medios urbanos como consecuencia del desbalance entre el crecimiento poblacional y la urbanización, aunado a la práctica de fecalismo al ras del suelo, lo que favorece los hábitos coprófagos del cerdo (Figura 5). En países no desarrollados y como mecanismo de subsistencia se practica esta forma de crianza rústica. En México se estima que el 40% de la carne de cerdo que se consume se cría en forma rústica.



Figura 5. Fecalismo al ras del suelo en medios rurales una de las condiciones que favorecen la transmisión de esta parasitosis.

En el humano el cisticerco de la *T. solium* puede alojarse en el Sistema Nervioso Central, en ojo, en tejidos subcutáneos y muscular. En el SNC causa la neurocisticercosis (Figura 6), la cual parece ser la localización más frecuente en América (Vega, 2002). La neurocisticercosis puede presentar una gran heterogeneidad de síntomas que dependen del número de cisticercos que se instalan, de su localización y del estado inflamatorio que genera la presencia del parásito en el SNC (Sotelo *et al.*, 1996) asociado a características propias del parásito y su hospedero. Entre los síntomas más frecuentes figuran cefaleas desde leves a intensas, convulsiones, crisis epilépticas y trastornos en la conducta.

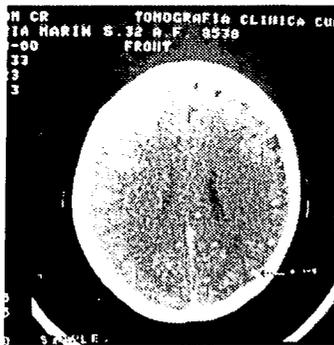


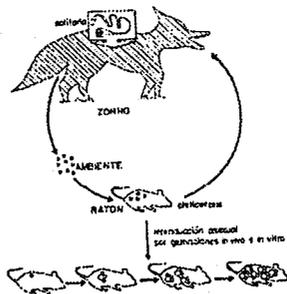
Figura 6. Tomografía de un paciente con Neurocisticercosis, causada por el metacésto de *Taenia solium*.

Además del impacto en la salud humana, deben considerarse sus repercusiones socioeconómicas consecuencia de la frecuente discapacidad del paciente, así como de los costos que implican su diagnóstico y tratamiento.

Este panorama indica claramente la necesidad de estudiar esta parasitosis tanto en función de comprender su patofisiología como en su prevención. Respecto al estudio de la enfermedad, diversos grupos han empleado distintos modelos experimentales para ahondar en los mecanismos inmunológicos, sexuales y genéticos que están implicados en esta parasitosis.

Cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*

El modelo experimental más utilizado ha sido la cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*. *T. crassiceps* es un céstodo cuya forma adulta o gusano se ha localizado naturalmente en el intestino de cánidos de Europa y Estados Unidos (Freeman 1962) (Figura 7). La forma larvaria puede causar en forma experimental una infección crónica en el ratón donde puede crecer mediante reproducción asexual (Freeman, 1962, Figura 8).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. El ciclo contempla un hospedero definitivo (canidos) y un hospedero intermediario (roedores). En el ratón se ha observado que el cisticerco puede reproducirse por gemación tanto in vivo como in vitro.

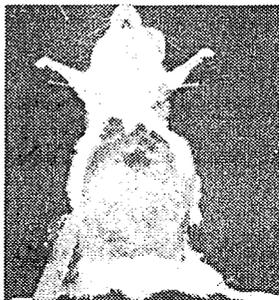


Figura 8. Presencia de cisticercos en la cavidad peritoneal de un ratón BALB/cAnN 30 días después de haber sido infectado con 10 cisticercos de *T. crassiceps*

Este modelo ha resultado ser muy adecuado para avanzar en el conocimiento de los factores inmunológicos (Robinson *et al.* 1997; Terrazas *et al.* 1999; Toenjes *et al.* 1999), genéticos (Sciutto *et al.* 1991; Fragoso *et al.* 1996, 1998) y sexuales (Bojalil *et al.* 1993; Larralde *et al.* 1995) implicados en la resistencia y/o susceptibilidad a la cisticercosis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ANTECEDENTES

Factores sexuales

Laralde y colaboradores han encontrado que las hembras son más susceptibles que los machos (Laralde *et al.*, 1989), midiendo la susceptibilidad como la capacidad del parásito de instalarse y reproducirse, lo cual se refleja en el número de parásitos recuperados de la cavidad peritoneal de ratones 30 días después de la infección. Existen evidencias que permiten sostener que factores asociados al sexo podrían interactuar con la respuesta inmune que justifiquen las diferencias de susceptibilidad entre hembras y machos (Huerta *et al.*, 1992). Esta influencia hormonal parece estar dada a nivel del timo y en células T periféricas (Bojalil, 1993). Se ha encontrado que la hormona 17β estradiol participa de manera importante ya que influye directamente en una mayor susceptibilidad en los dos sexos y altera la respuesta de hipersensibilidad tardía a antígenos específicos del parásito (Terrazas *et al.*, 1994). Además, el crecimiento parasitario aparentemente se ve favorecido por un ambiente sexual femenino. En los machos, se ha observado un fenómeno de feminización durante la infección crónica, caracterizado por el incremento de los niveles de estradiol en el suero, 100 veces más que lo normal, al mismo tiempo el decremento de testosterona y dihidrotes-tosterona de 85 y 95% respectivamente (Morales-Montor, 2002). Así, estos cambios ocurridos en ratones machos durante la infección crónica en los niveles hormonales ocurren simultáneamente con el incremento de una respuesta inmune inflamatoria (Morales-Montor, 2001). En ratones castrados y tratados con testosterona y dihidrotestosterona antes de la infección, disminuye el número de parásitos entre el 50 y 70%, respectivamente. Se especula que los andrógenos

participan en el control del crecimiento de los parásitos a través de la estimulación de una inmunidad específica celular (Morales-Montor, 2002). Además, se ha encontrado que tanto IL-6 como MIF están relacionados en la susceptibilidad asociada al sexo en la cisticercosis por *Taenia crassiceps* (Morales-Montor, 2002).

Factores genéticos

Al respecto de la relevancia de los factores genéticos, inicialmente se mostró que los genes del Complejo principal de Histocompatibilidad (*MHC*) del ratón (*H2*) podrían estar implicados en el control del crecimiento del parásito (Sciutto *et al.*, 1991). Las cepas de haplotipo *H-2^d* (BALB/cAnN y DBA/2) eran más susceptibles que las cepas de haplotipo *H-2^b* (BALB/B, C57BL/6J, y C57BL/10J) o *H-2^k* (BALB/K, C3H/HeJ, y C3H/FeJ) (Fragoso *et al.*, 1996). El empleo de cepas congénicas recombinantes en fondo B10 demostraron ser resistentes independientemente de su haplotipo, lo cual sugirió que en el fondo B10 podían existir genes de resistencia que enmascararan el efecto de los genes *H-2* (Fragoso *et al.*, 1996). El efecto de genes diferentes a los clásicos del *H-2* se comprobó mediante el uso de sublíneas de la cepa BALB/c, en las cuales BALB/cAnN fue notoriamente más susceptible que las sublíneas BALB/cJ y BALB/cByJ (Fragoso *et al.*, 1996). Si bien estas sublíneas son muy similares genéticamente (Roderick *et al.*, 1985), existen reportes que muestran diferencias en algunas características fenotípicas, entre las cuales destaca la expresión del antígeno Qa-2 en la cepa BALB/cJ (Potter 1985). Qa-2 es un antígeno no clásico de clase I del *MHC* codificado por 4 genes (*Q6-Q9*), localizados en el extremo telomérico al loci *H-2D*. Qa-2 no se expresa en BALB/cAnN (susceptible a la

cisticercosis experimental murina), mientras que sí en BALB/cJ (resistente). Mediante estudios de ligamiento genético "linkage" entre BALB/cAnN y BALB/cJ, se observó una asociación entre la expresión de la proteína Qa-2 y la resistencia a la cisticercosis experimental murina (Fragoso *et al.*, 1996). La relevancia de la presencia de Qa-2 se confirmó mediante la producción de un ratón transgénico de fondo susceptible que expresó la proteína Qa-2 (Fragoso *et al.*, 1998). Qa-2 es detectable en células epiteliales tímicas, y esencial para la selección positiva (Perarnau *et al.*, 1999; Ungchusri *et al.*, 2001), es capaz de asociarse a diversos péptidos probablemente por la vía de TAP (Tabaczewski *et al.*, 1997; He *et al.*, 2001). Además, afecta y modifica la presencia de células CD8 $\alpha\alpha$ (TCR $\alpha\beta$) en los linfocitos intraepiteliales del intestino (Das *et al.*, 2000). Recientemente se ha observado que Qa-2 puede además inhibir la actividad citolítica de las células NK (Chiang *et al.*, 2002). A pesar de todos los escenarios de la respuesta inmune adaptativa estudiados entre ratones susceptibles y resistentes, ninguno se ha podido asociar aún con la proteína Qa-2.

Factores inmunológicos

En la cisticercosis experimental murina causada por el cisticerco de *T. crassiceps*, se ha reportado en estudios previos la relevancia de diferentes componentes del sistema inmunológico en el control de la cisticercosis. Así, recientemente se observó que la resistencia a la parasitosis depende de células del sistema hematopoyético. En ratones de fondo susceptible irradiados, se transfirió resistencia repoblándolos con células de médula ósea de ratones

resistentes a la infección (López-Briones *et al.*, 2003). Ante células de médula ósea, la participación de linfocitos T ha sido muy documentada. Se ha observado una clara participación de los linfocitos T ya que en ratones timectomizados existe un notorio incremento de susceptibilidad a la infección, la cual puede ser restaurada mediante la transferencia de células T (Bojalil *et al.*, 1993). La infección puede inducir también un estado de inmunosupresión (Sciutto *et al.*, 1995; Villa and Kuhn, 1996; Toenjes *et al.*, 1999). Se ha propuesto que una respuesta de tipo Th1 pudiera estar involucrada en el control del crecimiento parasitario en etapas tempranas de la infección, mientras que en etapas tardías se ha encontrado una respuesta Th2, la cual resulta ya inefectiva para el control del crecimiento parasitario (Villa and Kuhn, 1996; Terrazas *et al.*, 1998; Terrazas *et al.*, 1999). También se ha observado que ratones con el gen *STAT6* mutado (un gen implicado en la transducción y activación de la señal de transcripción), son incapaces de desarrollar una respuesta de tipo Th2, siendo permisivos para el crecimiento del parásito (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Además, existen evidencias que muestran que las células TCR $\alpha\beta$ /CD4⁺ son importantes en el control del crecimiento del parásito, ya que en ratones mutados en cualquiera de estas dos proteínas de superficie, no sólo se observó un incremento del número de parásitos recuperados en la cavidad de ratones infectados, sino que su ausencia condujo también a su muerte (López-Briones *et al.*, 2001). Recientemente se ha observado la participación de células T mediante el incremento de la respuesta proliferativa y niveles de IL-2 inducidos por antígenos del cisticerco en la cepa resistente (López-Briones *et al.*, 2003), así como por una

disminución porcentual de células T esplénicas CD4, CD8 y células TCR $\alpha\beta$ dado por la población TCR V β 2 en la cepa susceptible (BALB/cAnN) (López-Briones *et al.*, 2003).

Mientras tanto la participación de la respuesta inmune innata en el control de esta parasitosis ha sido recientemente abordada enfatizando la participación de los macrófagos. Al respecto se ha encontrado que los ratones de la cepa BALB/c con el gen mutado para MIF (Factor inhibidor de la migración de macrófagos), resultaron más susceptibles a la cisticercosis murina comparada con la cepa silvestre o nativa BALB/c. En estos estudios se demostró que la alteración de los macrófagos es una condición que claramente favorece la susceptibilidad (Rodríguez-Soza *et al.*, 2003). Las diferencias de susceptibilidad entre las cepas susceptibles y resistentes podrían estar mediadas por macrófagos o por otras células de la respuesta inflamatoria. En este sentido el presente trabajo tiene como finalidad evaluar la cinética del crecimiento del parásito en las cepas susceptible y resistente y correlacionar el crecimiento del parásito con las poblaciones celulares que van apareciendo en el sitio de infección (cavidad peritoneal). Así se pretende determinar si existen diferencias entre la cepa susceptible y resistente que sugieran la participación de ciertos tipos celulares de la respuesta inflamatoria de esta parasitosis.

Considerando que la inmunología de la respuesta innata ha si más ampliamente estudiada y que se ha generado bastante información tanto en las células participantes como en los mecanismos implicados en el control de

infecciones se anexa a continuación una breve descripción de los avances reportados en este tema.

Respuesta inmune innata

En el sitio de interacción entre el hospedero y el parásito se llevan a cabo estrategias de defensa y sobrevivencia que van co-evolucionando en un proceso dinámico (Stefan HE, 2002). En esta lucha el sistema inmune asume la responsabilidad del control de la invasión. Los parásitos y sistema inmune del hospedero cuentan con diversos mecanismos, los patógenos cuentan con una rápida variabilidad mientras que el sistema inmune para competir directamente utilizando una gran gama de receptores específicos.

Por su parte el sistema inmune combate de una manera más eficiente y específica al patógeno, transfiriendo, además, memoria inmunológica para encuentros posteriores con el patógeno a través de la respuesta inmune adaptativa.

El sistema inmune está compuesto por dos partes interrelacionadas, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo.

La primera respuesta que actúa inmediatamente controlando la fase de instalación y replicación del patógeno es la respuesta inmune innata. Esta respuesta es detectable entre 0 y 96 hrs, después del contacto con el patógeno (Janaway, 2201). El sistema inmune innato es filogenéticamente mucho más ancestral que el adaptativo (Stefan, 2002).

La respuesta inmune innata es un mecanismo rápido de defensa y crítico para determinar el tipo de respuesta adquirida que se desarrollará. Esta respuesta inmune está integrada principalmente por la participación de células fagocíticas y es capaz de reconocer y responder inmediatamente a una invasión por microbios. Las células fagocíticas, además, son esenciales para la iniciación de una adecuada respuesta adaptativa, (la generación de una inmunidad específica).

Las principales células fagocíticas en mamíferos son los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos, monocitos y macrófagos) (Gordon, 1999; Rabinovitch, 1995). Estas células se consideran fagocitos profesionales por su capacidad de fagocitar una gran variedad de partículas, siendo las responsables del reconocimiento y control de invasiones microbianas.

Los neutrófilos son células de vida corta y son células efectoras esenciales en el control de infecciones por bacterias extracelulares y hongos, también están implicadas en el control de algunas infecciones ocasionadas por bacterias intracelulares (Cossart *et al.*, 2000; Hampton *et al.*, 1998). Los neutrófilos son los primeros en arribar al sitio de infección, su principal función es contribuir a resolver la infección a través de la destrucción de agentes microbianos.

Los macrófagos provienen de los monocitos de la sangre y son distribuidos al tejido dañado, representando la primera línea de defensa contra la invasión de microbios (Gordon 1999). Los macrófagos son la llave del sistema inmune en el control de la infección, por lo que son importantes en ambas respuestas innata y adaptativa. En el cuadro 1 se resumen las principales funciones y mecanismos de los macrófagos.

Mecanismos y funciones de los macrófagos

MECANISMOS	FUNCIONES
Detección de la invasión del microbio	*Mediante la opsonización de microbios y sus productos
Restricción y eliminación del microbio	*A través de fagocitosis *Formando granulomas en el sitio de infección *Causando muerte celular a células infectadas
Reclutamiento de células inmunológicas	*Mediante la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios
Células accesorias en linfocitos activados	*Procesando y presentando antígenos *A través de la expresión moléculas co-estimuladoras *Por la producción de citocinas
Células efectoras en la inmunidad mediada por células	*Incrementando la fagocitosis, la muerte celular de células dañadas, a sí como la eliminación de células apoptóticas
Participación en la respuesta inmune humoral	*Presentando receptores de anticuerpos y del complemento

La activación de macrófagos es un paso importante para el control de la infección por el sistema inmune y defectos en esta activación da como resultado un incremento de susceptibilidad a patógenos.

Las células NK (Natural Killer), son el otro tipo celular efector más importante de la respuesta innata, son linfocitos granulares de gran tamaño que actúan sin previa activación, pueden reconocer y matar células aberrantes y

rápida mente producir factores solubles (quimiocinas y citocinas) que tienen efectos antimicrobianos.

Las células NK tienen un heterogéneo arsenal de receptores de superficie los cuales median indirectamente distintas funciones, producción de citocinas, reactividad a productos liberados tanto por células infectadas como por otros tipos celulares de la respuesta inflamatoria (Colucci, 2002).

Las dos principales funciones de las células NK son a) destruir células infectadas por virus o bacterias, así como células tumorales a través de perforinas y granzimas presentes en sus gránulos citoplasmáticos y b) producir citocinas y quimiocinas las cuales participan en la inducción de una respuesta inflamatoria, modulan la hematopoyesis, controlan el crecimiento de monocitos y granulocitos, además de tener gran influencia en el tipo de respuesta adaptativa que se va a generar (Moretta, 2002).

Las células NK son responsables de producir IFN- γ durante el estado temprano de la infección antes de que las células T. Además participan en los fenómenos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (DAC) (Janeway, 2001).

El IFN- γ es crítico para inducir al macrófago a incrementar su actividad antimicrobiana, incluyendo la producción de NO y radicales de oxígeno. IL-12 con ayuda de TNF- α induce a las células NK a producir grandes cantidades de IFN- γ .

Después de exponer a las células NK a IFN- α e IFN- β o a IL-12 se incrementa su actividad lítica. Además se ha encontrado que la actividad de las

células NK se incrementa con IL-2, pero su actividad está asociada con la síntesis de NO (Cifone, 2001).

Reconocimiento de Microbios

A pesar de que los microbios pueden proliferar con rapidez, el sistema inmune innato es capaz de reconocer y controlar la infección o de no ser así de iniciar la activación de una respuesta inmune adaptativa, a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), los cuales son capaces de reconocer moléculas conservadas de microbios (Medzhitov and Janeway, 1997). Estas moléculas microbianas incluyen el ácido lipoteico de bacterias gram-positivas y el LPS de bacterias gram-negativas. Los PRRs del hospedero reconocen una gran variedad de microbios con un limitado grupo de moléculas conocidas como patrones moleculares asociadas a patógenos (abreviado usualmente como PAMPs por el nombre en inglés). Los PRRs determinan el mecanismo a seguir, así como la respuesta inflamatoria mediada por el fagocito.

Los PRRs actúan como receptores uniéndose e introduciendo a muchos patógenos intracelulares. *Mycobacterium tuberculosis*, por ejemplo utiliza receptores del complemento (RCs), al receptor de manosa, el CD14 y receptores de unión presentes en macrófagos del hospedero (Elhers and Daffe, 1998).

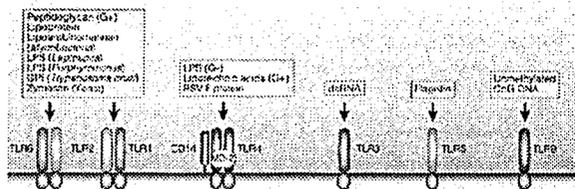
Los diferentes receptores pueden generar diferentes respuestas en las células del hospedero, la sobrevivencia de patógenos intracelulares depende de qué receptor utilizan para entrar a las células del hospedero. Por ejemplo, *Toxoplasma gondii*, es aniquilada por un mecanismo antimicrobiano de estallido respiratorio, después de la entrada a través de receptores Fc, pero sobrevive

entrando a través de receptores RC3, ya que por esta vía no se desencadena el mecanismo de estallido respiratorio (Gordon, 1999).

En contraste, la fagocitosis mediada por RC no desencadena la producción de mediadores proinflamatorios como la producción de citocinas o el estallido respiratorio. Por esta razón los RC son utilizados por los patógenos intracelulares para entrar a las células del hospedero. *Legionella pneumophila* se une al macrófago a través del receptor RC3, colonizando así al fagocito (Horwitz, 1984)

Recientemente se ha identificado otro tipo de receptores, los Toll-like receptors (TLR) que son componentes muy importantes del sistema inmune (Underhill *et al.*, 1999; Wright, 1999).

Los TLR identificados inicialmente en *Drosophila*, son una familia de receptores con homología al receptor de IL-1. Estos se han identificado en todos los tipos celulares y pueden distinguir varios patógenos (Fig. 9); por ejemplo, el TLR2 reconoce moléculas como Peptidoglicano, Lipoproteínas, etc., presentes en hongos y bacterias gram-positivas, mientras que el TLR4 reconoce LPS de bacterias gram-negativas.



Nature Reviews | Immunology

Figura 9. Figura que ilustra los TLR descritos así como sus diferentes ligandos.

Tomado de: *Nature Reviews Immunology* 1; 135-145 (2001).

En algunos casos los receptores tipo Toll requieren de la presencia de otras moléculas membranales para ser activados por determinados ligandos. Miyake et al., identificaron a MD-2 como una proteína que ayuda a la activación del TLR4, importante para la formación del complejo LPS-LBP-MD2-CD14-TLR4, que desencadena la vía interna de señalización finalizando con el incremento de la activación de NF- κ B por LPS (Terry K. et al., 2000).

Muerte del microbio

Una vez que el microbio ha sido fagocitado se desencadena la maduración del fagosoma, generado por un número de mecanismos internos (Cossart et al., 2000; Gordon, 1999). La muerte del microbio es ocasionada por el bajo pH del fagosoma, el control de nutrientes, la fusión con lisosomas y la producción de especies reactivas de oxígeno e intermediarios de nitrógeno.

El estallido respiratorio de fagocitos, que culmina en la producción de intermediarios de oxígeno reactivo es una característica de los mecanismos antimicrobianos (Clark, 1999; Hampton et al., 1998). Cuando se activa el fagocito, la NADPH oxidasa, una proteína asociada a la membrana, genera superóxido (O_2^-) por la transferencia de electrones de NADPH a O_2 . El superóxido que reacciona dentro del lumen fagosomal, produce oxidantes tóxicos incluyendo, radicales hidróxilos, y peróxido hidrógeno, los cuales son altamente reactivos y constituyen unas de las principales moléculas efectoras del fagocito para la destrucción del agente microbiano.

Otra enzima responsable de la muerte intracelular del microbio, es la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) producida por los fagocitos (Burgner *et al.*, 1999; Silo *et al.*, 1999). La inducción de iNOS lleva a la producción de grandes cantidades de óxido nítrico (NO). iNOS, puede ser inducido por productos bacterianos como el LPS y proteínas inflamatorias incluyendo TNF-alfa, IFN-gama e IL1beta. La importancia de iNOS en el control de muchas infecciones murinas tales como malaria, leishmaniasis y tuberculosis ha sido bien establecida usando ratones deficientes de ésta enzima (Brown and Gordon, 2000).

Producción de mediadores solubles

La señalización y reclutamiento celular en los sitios de infección, se da a través de mediadores solubles como las citocinas y quimiocinas, las cuales son generadas después del reconocimiento y/o fagocitosis del agente invasor. Estos mediadores ayudan directamente a la generación de una respuesta inmune adaptativa.

El desarrollo final de la respuesta inmune es complejo y depende en gran medida de los tipos de mediadores solubles producidos y de la acción de estos en las células del sistema inmune.

La unión del microbio o sus productos a PRRs da como resultado la producción y liberación de mediadores proinflamatorios como el óxido reactivo, además de un gran número de citocinas proinflamatorias, las principales citocinas pro-inflamatorias son; IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFN γ , IFN α/β , TNF α .

Las citocinas son las principales moléculas de la respuesta inmune, formando una compleja red que media y regula ambas respuestas la innata y la adaptativa (Billiau *et al.*, 1998; Biron, 1998; Paludan, 1998; Pretolani, 1999; Thomson, 1998).

IL-12, IL-3, IFN- γ , TNF β y GM-CSF son las principales citocinas liberadas tras la activación de macrófagos, además, dan paso a la generación de una respuesta tipo Th1. Mientras que GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 generan una respuesta tipo Th2 (Goldsby, 2000).

IL-12 es liberada por macrófagos y estimula a células NK y células T a producir IFN- γ . La activación por IFN- γ , estimula a los fagocitos e induce la fusión de lisosoma-fagosoma, el estallido respiratorio y la producción de intermediarios de NO. Los macrófagos pueden también ser activados por IFN- α y β , activando mecanismos antivirales y antimicrobianos.

La respuesta inmune innata ha sido identificada de manera importante en el control de infecciones causadas por diferentes patógenos a través de receptores.

Infecciones bacterianas particularmente las causadas por especies extracelulares del tipo *Staphylococci*, *Streptococci*, *Pneumococci* y *Haemophilus*, son controladas por los macrófagos a través de los mediadores que liberan como las especies oxidante, incluyendo al óxido anión (O₂⁻), el radical (HO₂) y el radical hidroxil (HO) (Rosen, 1993).

Los neutrófilos y macrófagos participan de manera importante en el control de parásitos como *Schistosoma* (Peck *et al.*, 1983) y *Toxoplasma gondii* (Catterall

et al., 1987), a sí como en contra de algunos hongos como *Candida* (Vázquez-Torres and Balish, 1997), *Cryptococcus*, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Blastomyces*, *Paracoccidioides* (Herring and Huffnagle, 2000).

También las células NK participan en el control temprano de diversas infecciones del tipo vaccinia virus, mousepox virus, y citomegalovirus, así como en el control de bacterias intracelulares como *Listeria* y en el control de parásitos como *Toxoplasma gondi*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi* (Cardillo *et al.*, 1996), *E. histolytica* (Seydel *et al.*, 2000), *Cryptosporidium parvum* (McDonald *et al.*, 1992) y *Plasmodium chabaudi* (Mohan *et al.*, 1997) y hongos como *Cryptococcus* (Casadevall and Perfect, 1998), y *Candida* (Greenfield *et al.*, 1993).

Como se ha mencionado, en los últimos años se ha encontrado que la participación de la respuesta inmune innata es relevante en el control de diversas infecciones causadas por diferentes agentes infecciosos (bacterias, hongos, parásitos y virus), lo que ha originado que se estudie con mayor detalle los mecanismos moleculares y celulares de la respuesta innata que permitan el control de la infección.

III. JUSTIFICACION

Existen diferencias de susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*. En sublíneas de la cepa BALB/c, BALB/cAnN es notoriamente más susceptible que la sublínea BALB/cJ.

Estudios preliminares han mostrado la relevancia del componente genético del hospedero en las diferencias de susceptibilidad involucrando a la proteína Qa-2 como una molécula del MHC implicada en la resistencia. También se han encontrado algunos indicadores que sugieren la relevancia de células linfoides T y B del bazo en el control de esta parasitosis. Sin embargo, no se ha realizado ningún estudio sistemático que determine la relevancia de las células que participan en la respuesta inmune del hospedero en el sitio de infección ni tampoco su correlación con la carga parasitaria. El conocer el repertorio de las poblaciones celulares que van apareciendo en el sitio de infección desde tiempos muy tempranos en donde el parásito se instala en el hospedero, hasta tiempos más avanzados donde se comienza a multiplicar, sería de gran utilidad para conocer el tipo de respuesta inmune que podría estar participando en las diferencias de susceptibilidad.

IV. HIPÓTESIS

- Las diferencias de susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina entre las sublíneas de la cepa BALB/c están mediadas por células inmunológicas que determinan una respuesta inmune local diferente entre la sublínea susceptible y la resistente, reflejándose en la carga parasitaria.

V. OBJETIVOS

- Determinar la carga parasitaria en la cepa de ratones susceptible (BALB/cAnN) y en la resistente (BALB/cJ) a diferentes tiempos de infección en hembras y machos.
- Evaluar la composición celular en la cavidad peritoneal de la cepa susceptible y resistente a los diferentes tiempos estudiados de la infección y determinar si existe una población celular diferencial entre ambas cepas que permita proponer las interacciones celulares asociados a diferencias en la susceptibilidad.
- Evaluar la relevancia de la respuesta inmune innata en las diferencias de susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina entre estas sublíneas.

VI. METODOLOGÍA

1.-Evaluación de la cinética poblacional de cisticercos de *T. crassiceps* en el modelo experimental de cisticercosis murina

1.1.-Animales de experimentación

Con la intención de conocer las diferencias en el incremento del número de cisticercos de *Taenia crassiceps* durante la infección experimental murina en sublíneas de ratones BALB/c , se realizó una cinética a lo largo de 82 días de infección, en los cuales se cuantificó la carga parasitaria a los días: 0, 5, 12, 19, 26, 33, 40, 47, 54, 61, 68, 75 y 82 post-infección. Se utilizaron por tiempo 5 ratones BALB/cAnN (susceptible) y BALB/cJ (resistente) de ambos sexos, de 4 a 6 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron con agua y comida *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

1.2.-Infección

La infección de cada ratón se realizó con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* de 2 mm de diámetro, no gemantes, aparentemente cristalinos, obtenidos de ratones hembras BALB/cAnN parasitadas con 90 días de infección (stock). Los ratones de ambas cepas y sexos que formaron parte de la misma cinética, se infectaron con parásitos provenientes de un mismo stock. La infección se llevó a cabo en la cavidad peritoneal del hospedero, con jeringa de insulina y aguja de calibre 27G x 13mm en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos, (PBS 1X).

1.3.-Cuantificación de carga parasitaria

En cada tiempo se sacrificaron 5 ratones de cada cepa y de cada sexo elegidos al azar, se abrió cavidad peritoneal y se realizaron varios lavados con PSB 1X para recuperar todos los cisticercos. Adicionalmente se extrajeron las vísceras y se lavaron para garantizar la obtención de todos los cisticercos. Una vez recuperados se colocaron en una caja petri sobre un fondo oscuro que permitió observarlos con claridad y con una pipeta de bulbo se colectaron los cisticercosis cuantificando así la carga parasitaria.

Dado que este parásito se divide por gemación (Rudoldhi, 1819), y con la intención de conocer la capacidad reproductiva, se cuantificó el número de gemas por cisticerco.

2.- Estudio cinético de las células del hospedero antes y después de la infección experimental murina causada por el metacéstodo de *T. crassiceps*

2.1.- Animales

Para el estudio sistemático de las células relacionadas con la infección en la cavidad peritoneal de los ratones se utilizaron ratones hembras de 4 a 6 semanas de edad, de las cepas BALB/cAnN y BALB/cJ. A los 0, 3, 5, 10, 15, 30 y 45 días post-infección 3 ratones de cada cepa se sangraron a blanco para evitar una contaminación por células de sangre y se sacrificaron al azar por grupo. Los ratones se mantuvieron con agua y comida *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

2.2.- Infección

Los ratones se infectaron de la forma descrita anteriormente (1.1), y bajo condiciones de esterilidad, (en campana de flujo laminar y utilizando soluciones estériles).

2.3- Obtención de células de la cavidad peritoneal

Para obtener la mayor cantidad de células de la cavidad peritoneal de los ratones, se le inyectó 1 ml de PBS 1X frío y se realizó un suave masaje. Posteriormente se recuperó el PBS con las células en suspensión con una jeringa de insulina y se colocaron en un tubo en hielo.

2.4.- Cuantificación de carga parasitaria

La cuantificación de la carga parasitaria se realizó siguiendo el protocolo descrito en la sección 1.3

2.5.- Determinación y cuantificación de las células de la cavidad peritoneal

La suspensión celular recuperada de la cavidad peritoneal se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos. El botón celular fue resuspendido en 3 ml de PBS* (PBS con 0.02% de NaN_3 y 5% de Suero Fetal Bovino (Gibco BRL 160000-044)). Se tomaron 50 μl de las células con las cuales se prepararon frotis para analizarlas bajo el microscopio para lo cual se tiñeron con hematoxilina-eosina, (H-E).

2.5.2.-Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E)

Los frotis se fijaron con metanol durante 15 minutos y se tiñeron con H-E, para la identificación y cuantificación de las diferentes poblaciones celulares contenidas en la suspensión celular mediante microscopía óptica. Las preparaciones se sumergieron durante 10 minutos en hematoxilina, se lavaron al chorro de agua y se les dieron baños de alcohol ácido (1:100). Se lavaron nuevamente al chorro de agua y se pasaron por baños de carbonato de litio (0.01M), se lavaron en agua, se trataron con eosina y se pasaron por alcohol 96%, alcohol absoluto y xilol, después se montaron con cera comercial.

Las soluciones empleadas se describen en el anexo I.

2.5.2.-Citometría de flujo.

El resto de las células se dejaron 2 horas en luz ultravioleta para reducir la autofluorescencia de las células. Esto se llevó a cabo debido a que en estudios previos han mostrado que el parásito en su proceso de instalación y reproducción dentro de la cavidad peritoneal de los ratones es capaz de liberar células y cúmulos celulares los cuales presentan un nivel de autofluorescencia la cual se sobrelapa con la fluorescencia de los anticuerpos marcados con los fluorocromos utilizados: Fluoresceína (FITC), Phycoeritrina (PE) y Quantum Red (Padilla, 2000). Las reacciones de citometría se realizaron con 5×10^5 células. Para bloquear receptores Fc, se adicionó el anticuerpo anti CD16-CD32 (Tabla 1) en $1 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ de PBS* por reacción, se dejó incubar durante 45 minutos a 4°C . Las células se

lavarón 2 veces, adicionando 3 ml de PBS* y centrifugando a 1500 rpm durante 10 minutos.

Para el estudio de las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los ratones se utilizó el siguiente panel de anticuerpos: anti CD19 (células B), anti CD4 y anti CD8 (células T), anti Pan NK (células NK), anti Mac-3 (macrófagos). Adicionalmente se buscaron poblaciones Qa-2+ en células de ratones BALB/cJ para evaluar si la infección incrementa los niveles de expresión de esta proteína. Considerando que se han encontrado células del parásito durante la infección experimental murina (Padilla, 2000).

Para los ensayos de citometría se realizaron tinciones duales utilizando el panel de anticuerpos descritos en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Lista de anticuerpos empleados para la caracterización de las poblaciones celulares de ratones infectados, por citometría de flujo.

Especificidad del anticuerpo	Fluorocromo	Tipo de marcaje
CD19	PE	Sencillo/directo
CD25	Biotinilado	Sencillo/directo
CD3/CD4	Biotinilado/FITC	Doble/indirecto
CD3/CD8	Biotinilado/FITC	Doble/indirecto
Pan-NK/CD69	FITC/Biotinilado	Doble/indirecto

Pan-NK/Qa-2	FITC/Biotinilado	Doble/indirecto
Mac-3/Qa-2	FITC/Biotinilado	Doble/indirecto
Anti-IgG/Parásito	Biotinilado	Sencillo/indirecto
Controles	Florocromo	Marcaje
Isotipo (IgG2a e IgG2b)	FITC	Sencillo/directo
Isotipo (IgGa e IgG2b)	PE	Sencillo/directo

Se adicionaron los anticuerpos (1µg/100µl de PBS*) y se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron dos veces de la forma ya descrita y las reacciones de marcaje directos se fijaron. En el caso de las reacciones con marcaje indirecto (anticuerpos biotinilados), se adicionó la estreptoavidina acoplada a phycoeritrina (PE) (1:10 en PBS*), se incubó durante 30 minutos a 4°C en oscuridad, se lavaron dos veces de la forma ya descrita y se fijaron con 500 µl de una solución de formaldehído al 1% en solución salina isotónica. Se mantuvieron a 4°C en oscuridad para su posterior captura y análisis.

La descripción de los anticuerpos utilizados figuran en el Cuadro 3 del apéndice 1. Cabe remarcar que para todas las reacciones se utilizaron controles de isotipo (IgG2a e IgG2b) marcados con FITC y PE.

Para identificar las células de origen parasitario, se utilizó un anticuerpo anti-IgG/parásito biotinilado, purificado de suero de ratones con 30 días de infección con el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Para la purificación se procedió a la precipitación de las IgGs totales con sulfato de amonio (Coligan, et al., 1991), las

IgGs precipitadas se biotinilaron siguiendo los procedimientos previamente descritos en Coligan, et al., 1991

Los resultados fueron analizados utilizando el método estadístico T de student utilizando el Software GraphPad InStat tm V2.05^a

VII. RESULTADOS

1.-Evaluación de la cinética poblacional de cisticercos de *T. crassiceps*.

El estudio de la cinética de crecimiento del parásito en las dos sublíneas de ratones de ambos sexos confirmó que la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*, en términos de cantidad de parásitos, se ve afectada por el fondo genético y el sexo del hospedero (Figura 10). Al observar el número de gemas producidas por los cisticercos, se encontró que la reproducción del parásito también se ve afectada en los mismos términos. En los cisticercos encontrados en las hembras BALB/cAnN, aparecen gemas desde el día 5 de infección y aumentan de forma exponencial durante el tiempo de infección, mientras que en machos BALB/cAnN aparecen desde el día 12 y van incrementando pero en menor número que en las hembras. En la cepa BALB/cJ tanto en hembras como en machos no se encontraron gemas en los cisticercos recuperados (Fig. 11).

En las hembras BALB/cAnN se encontró, además, que las gemas al principio de la infección eran pequeñas y cristalinas, mientras que en el último tiempo de infección estudiado, las gemas encontradas eran muchas, opacas y muy grandes y se acompañaban de un líquido peritoneal turbio, que observado al microscopio contenía gran cantidad de detritus celulares. También se encontró una disminución del número de cisticercos pequeños a tiempos prolongados de la infección (68 días). Esto podría resultar como consecuencia de que para estos tiempos de infección (68 días) no son apropiadas las condiciones de la cavidad peritoneal para su reproducción y disminuya su capacidad de reproducirse por gemación. Esta posibilidad parece factible considerando que en tiempos tardíos

de la infección se observa un incremento del número de gemas no vesiculares, que aparentemente no son viables y no se desprenden del cisticercos original.

Resulta de interés señalar que en hembras susceptibles BALB/cAnN se detecta un mayor número de cisticercos desde los primeros tiempos después de la infección, que aumentan siguiendo un crecimiento exponencial (Figura 10), como consecuencia de la reproducción por gemación (Figura 11). En los machos de la misma cepa se observa un comportamiento similar aunque desplazado en el tiempo, que tiende a igualar la carga parasitaria de las hembras.

En los ratones BALB/cJ la infección se resuelve en pocos días. En las hembras, el parásito logra mantenerse hasta antes del día 19, mientras que en los machos al día 12 prácticamente no se encuentran parásitos y aparentemente son rechazados y no logran ni establecerse, ni reproducirse (Figuras 10 y 11)

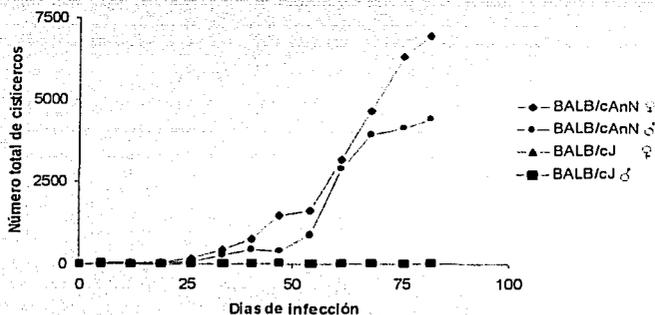


Fig. 10. Número total de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal de ratones ($n=5$) BALB/cAnN y BALB/cJ de ambos sexos, durante diferentes días post-infección, el incremento de la carga parasitaria en hembras de la cepa BALB/cAnN es exponencial, en los machos crecen en menor número pero en BALB/cJ el parásito no logra establecerse en ninguno de los sexos.

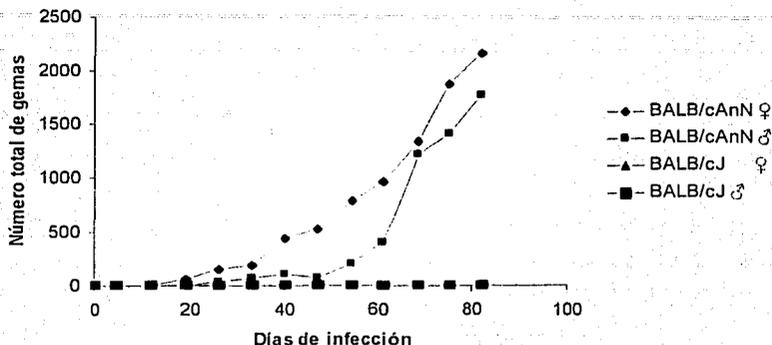


Fig. 11. Número total de gemas encontradas en los cisticercos de la cavidad peritoneal de ratones (n=5) BALB/cAnN y BALB/cJ de ambos sexos, durante diferentes días post-infección, los cisticercos en ratones de la cepa BALB/cAnN comienzan a gemar desde tiempos tempranos y en mayor número en hembras, en el caso de los machos tardan más en gemar y lo hacen en menor número, mientras que en BALB/cJ los escasos cisticercos recuperados no eran gemantes.

2.-Estudio de la cinética de las células inmunológicas de la cavidad peritoneal de ratones infectados con el cisticercos de *T. crassiceps*.

Con el fin de conocer las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los ratones BALB/cAnN y BALB/cJ infectados se realizó la determinación en el tiempo de las diferentes poblaciones celulares en la cavidad peritoneal.

2.1.-Cuantificación de la carga parasitaria

En cada tiempo estudiado se cuantificó la carga parasitaria. Como se observa en la Figura 12, se confirmó la susceptibilidad en la cepa BALB/cAnN, y la resistencia de BALB/cJ.

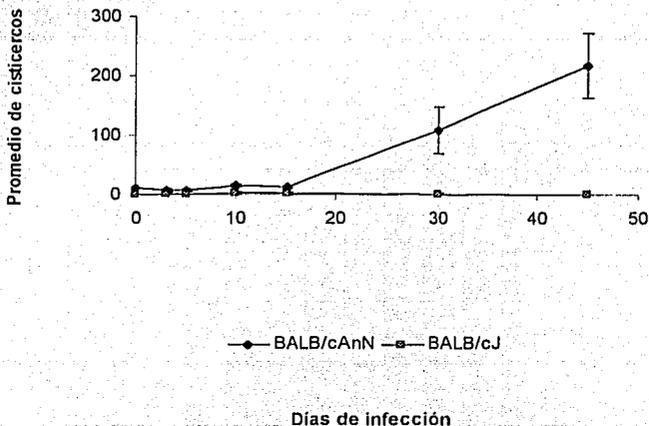
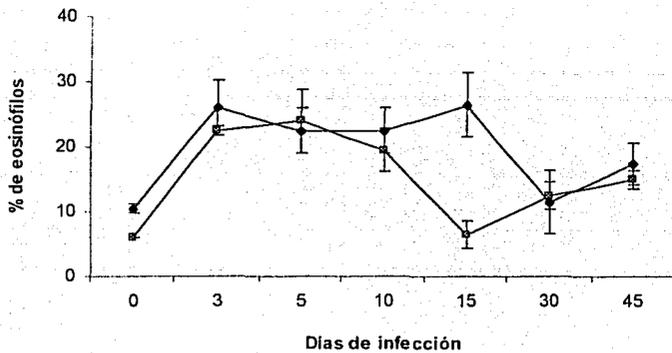
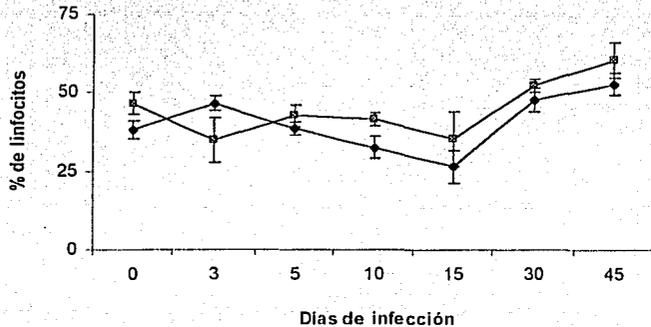


Fig. 12. Promedio del número de parásitos encontrados en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN y BALB/cJ (n=3), durante los diferentes tiempos de infección estudiados, los cisticercos en la cepa BALB/cAnN crecen de forma exponencial, mientras que en BALB/cJ después del día 25 de infección no se encuentran parásitos. Las barras representan la S.D.

2.2.-Determinación de las poblaciones celulares por preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina

En una primera evaluación se determinaron los porcentajes de las diferentes poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los ratones en preparaciones teñidas con H-E. Comparando la composición porcentual de las

poblaciones celulares en animales susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (BALB/cJ) se observó que los linfocitos (Fig. 13) permanecen constantes durante los primeros quince días de infección y tienden a elevarse en ambas cepas a partir del día 30. Mientras tanto, los eosinófilos (Fig. 14) se incrementan con la infección, sin embargo, en BALB/cJ disminuyen al día 15, mientras que en BALB/cAnN permanecen elevados hasta este tiempo.



● BALB/cAnN ■ BALB/cJ

Cinética del porcentaje de linfocitos (Fig. 13) y Eosinófilos (Fig. 14), determinadas en preparaciones teñidas con H-E, presentes en la cavidad peritoneal del ratones infectados. Las células fueron obtenidas de hembras (n=3) BALB/cAnN y BALB/cJ durante diferentes días pos-infección. No se encontraron diferencias significativas entre cepas ni entre linfocitos y eosinófilos $P < 0.05$ (Figuras 13 y 14 respectivamente).

En la población de macrófagos (Fig. 15) se encontró un ligero aumento temprano en ambas cepas que tiende a disminuir en BALB/cJ conforme avanza la infección, mientras que en BALB/cAnN hay un incremento del 35% al día 15 y disminuye conforme avanza el tiempo de infección.

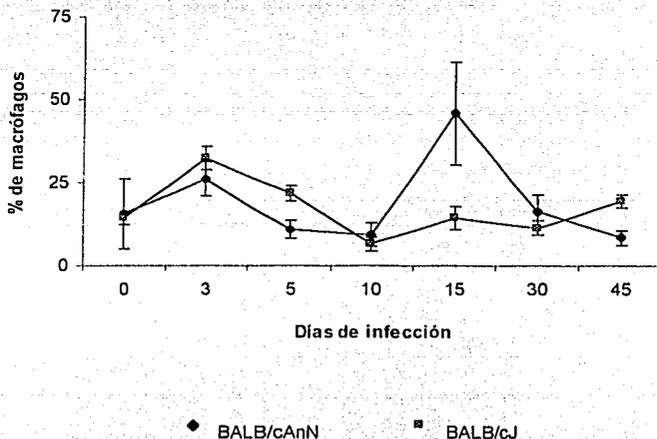


Fig. 15. Cinética del porcentaje de macrófagos, identificados por tinciones H-E a diferentes tiempos post-infección. No hay diferencias en tiempos tempranos en el porcentaje de macrófagos entre ratones hembras de la cepa resistente (BALB/cJ) y la susceptible (BALB/cAnN).

Como se observa en la Figura 16, clasificando como macrófagos activados aquellos de tamaño incrementado y citoplasma vesicular y granuloso, se encontró en la cepa resistente un incremento del 40% al día 3 de infección que tiende a desaparecer, en contraste con la cepa susceptible en la que se observa un aumento del 30% hasta los 15 días de infección (Fig. 17).

5 días de
fección

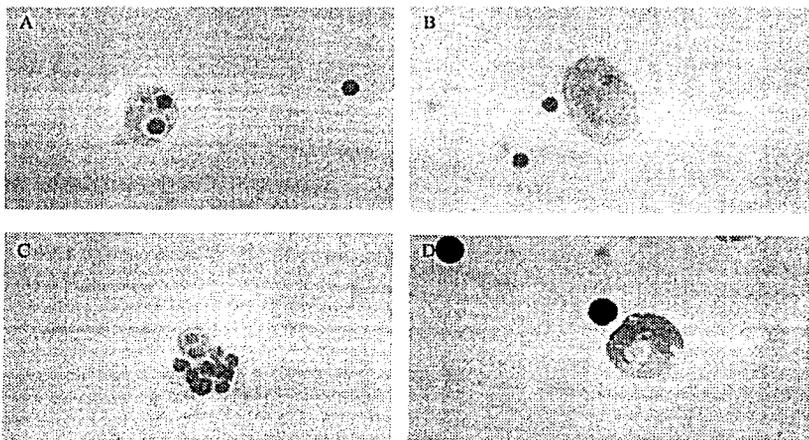


Fig. 16. Frotis de células de la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN (A, C) y BALB/cJ (B,D), teñidas con Hematoxilina-Eosina y observadas al microscopio (100x). Los macrófagos al día 3 de infección (A, B), en BALB/cJ tienen apariencia d activación, mientras que al día 15 son los macrófagos de la cepa BALB/cAnN los qu predominan con apariencia de activación.

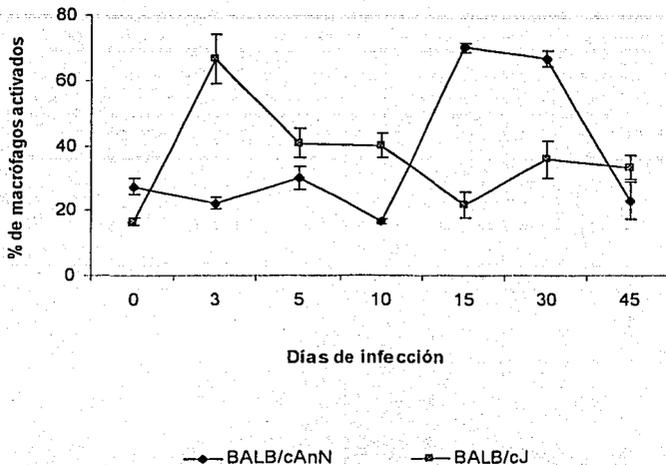
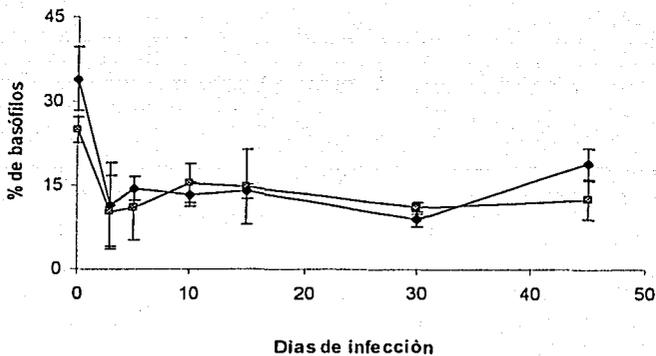
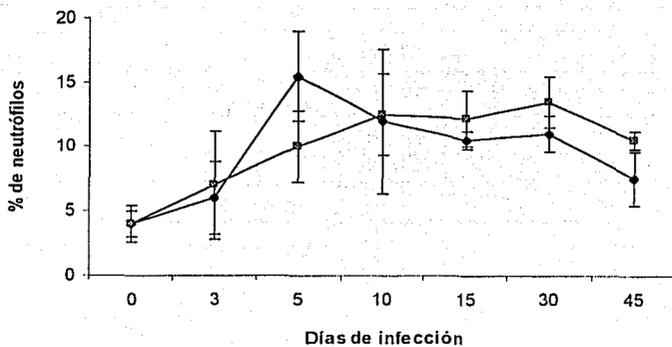


Fig. 17. Cinética del porcentaje de macrófagos con apariencia de activación, identificados por tinciones H-E a diferentes tiempos post-infección. En BALB/cJ, se observa un incremento significativo de células con apariencia de macrófagos activados al día 3 post-infección.

Al respecto de los neutrófilos (Fig. 18) y monocitos (Fig. 20) se observan en ambas poblaciones un incremento tanto en la cepa susceptible como en la resistente conforme transcurre la infección. Por el contrario los basófilos (Figura 19) tienden a disminuir.



● BALB/cAnN □ BALB/cJ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cinética del porcentaje de Neutrófilos (Fig. 18) y Basófilos (Fig. 19) en tinciones H-E. No se observan diferencias significativas de Neutrófilos ni de Basófilos entre las cepas BALB/cJ resistente y BALB/cAnN susceptible.

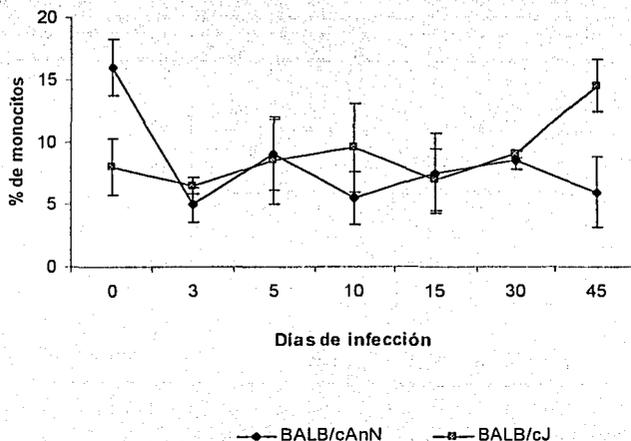
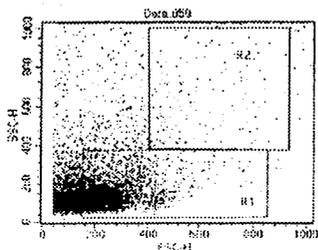


Fig. 20 Cinética del porcentaje de Monocitos en tinciones H-E. La cinética de Monocitos de la cepa resistente y susceptible son similares entre las cepas BALB/cAnN y BALB/cJ.

2.3.- Determinación de las poblaciones celulares por citometría de flujo.

Considerando las limitaciones de la caracterización celular por laminillas se decidió utilizar citometría de flujo para distinguir las subpoblaciones de linfocitos: células B, células T y NK. El análisis por citometría de flujo permite analizar a las células de una población heterogénea de acuerdo a su tamaño y la complejidad molecular que presentan. Mediante gráficas de puntos, estos parámetros permiten distinguir tres regiones. Una de menor tamaño y menor granularidad,

que corresponde a linfocitos (Región 1); una de mayor tamaño y mayor granularidad correspondiente a macrófagos, células T activadas y células plasmáticas (Región 2) y otra de menor tamaño y mayor granularidad que corresponde a granulocitos (Figura 21).



- R1.- Linfocitos
- R2.-Macrófagos
Linfocitos activados
- R3.-Granulocitos

Fig. 21. Eventos celulares analizados por citometría de flujo, mostrándolos en tamaño contra complejidad molecular. Las regiones determinadas para las diferentes poblaciones celulares según su tamaño y complejidad molecular.

Utilizando el marcador CD19 se evaluó la presencia de células B. Este marcador se expresa en esta población linfoidea hasta antes de transformarse a células plasmáticas. En el análisis se encontró un descenso en el porcentaje de células CD19+ (Fig. 22) en la cepa BALB/cAnN a partir del día 15 de infección. Estudios realizados en nuestro grupo de trabajo han demostrado que el parásito

induce apoptosis en células B (López-Briones, 2003), lo que podría justificar este hallazgo. Mientras en BALB/cJ tiende a observarse un incremento tardío de CD19+ posiblemente como consecuencia de la desaparición del parásito en el hospedero.

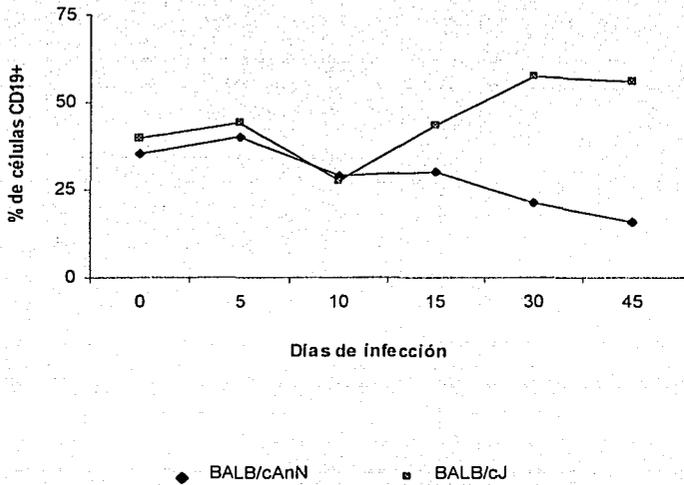


Fig. 22. Células analizadas por citometría de flujo (región 1), presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados. Las células fueron obtenidas de ratones hembras (n=3) BALB/cAnN y BALB/cJ durante diferentes días post-infección.

En estudios previos se ha reportado la presencia de células del parásito en la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN durante la infección (Padilla, 2000)., Con el fin de identificarlas, se utilizó IgG anti-parásito biotinilado y se utilizó para

medir estas poblaciones celulares del parásito por citometría de flujo (Fig. 23). Los resultados indican que en la cepa susceptible BALB/cAnN se observa al día 10 un incremento del 20% en las células del parásito reconocidas por el IgG anti-parásito, después de este día el porcentaje de células positivas desciende drásticamente en ambas cepas. Es probable que esto se deba a que el parásito para este tiempo de infección ya se reconstituyó por completo y no queden más células aisladas.

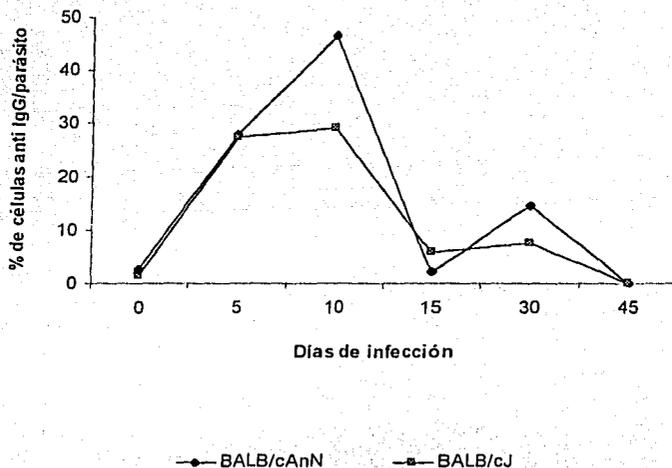
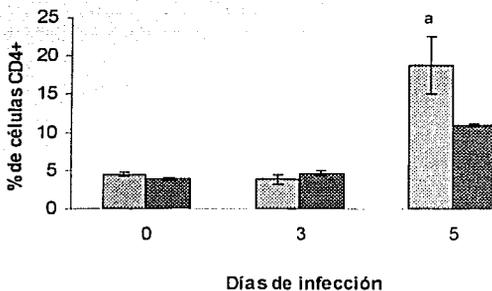


Fig. 23. Cinética del porcentaje de células reconocidas por IgGs anti-parásito presentes en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN y BALB/cJ. Claramente se observa la presencia de células que son reconocidas por anticuerpos dirigidos contra el parásito, lo cual argumenta a favor de que se trata de las células de origen parasitario.

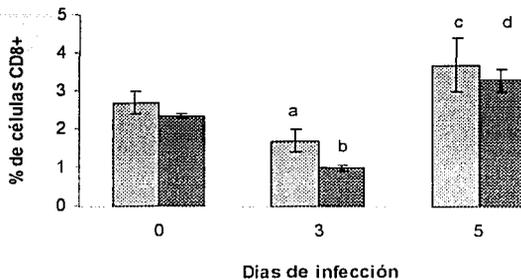
Al respecto de las poblaciones de células T (CD3+CD4+, CD3+CD8+) y NK, se evaluó simultáneamente su estado de activación utilizando para esto, los marcadores CD69 y CD25 (receptor para IL-2), así como la expresión de la proteína Qa-2 en células NK y macrófagos de la cepa BALB/cJ.

El estudio se realizó durante los primeros 5 días de infección, en el supuesto de que los primeros días de infección son los críticos para determinar la instalación del parásito en el hospedero.

En BALB/cAnN se observó un aumento significativo de las células CD4+ y CD8+ al día 5 de infección (Figuras 24, 25). En BALB/cJ el incremento de células CD4+ no es significativo, pero sí lo es de células CD8+ al día 5.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

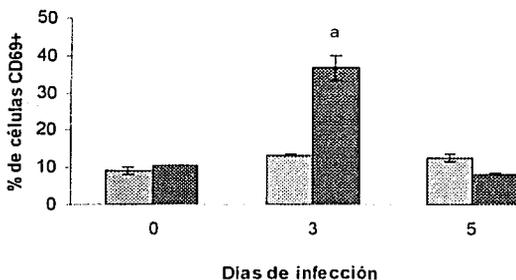
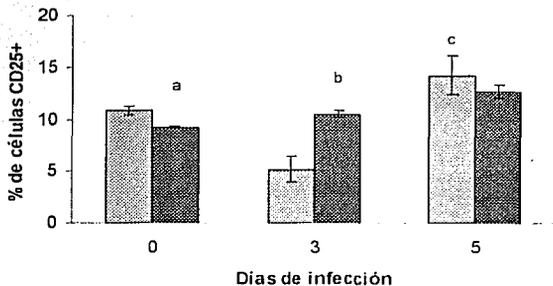


▣ BALB/cAnN ▣ BALB/cJ

Promedio \pm D.S. del porcentaje de células CD4+ (Fig. 24) y CD8+ (Fig. 25) detectadas por citometría de flujo en la cavidad peritoneal de tres ratones hembras antes y 3 y 5 días después de la infección con cisticercos de *Taenia crassiceps*. En las células CD3+CD4+ (Fig. 24), las diferencias significativas encontradas fueron de a con respecto a b, ($P < 0.05$), en la cepa BALB/cAnN. En las células CD3+CD8+ (Fig 25), las diferencias significativas encontradas fueron de a y b con c; y de b con d ($P < 0.005$), en BALB/cJ.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También aumenta significativamente el porcentaje de células CD25+ al día 5, en la cepa BALB/cAnN (Fig. 26). La población CD69 (marcador temprano de activación) se incrementa significativamente en la cepa resistente al día 3 de infección (Fig. 27).

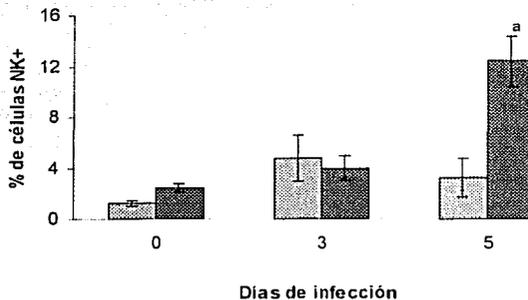


□ BALB/cAnN

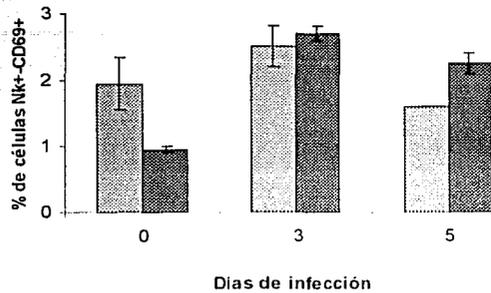
■ BALB/cJ

Promedio \pm D.S. del porcentaje de células CD25+ (Fig. 26) y CD69 (Fig. 27) detectadas por citometría de flujo a tiempos tempranos post-infección en la cavidad peritoneal de 3 ratones hembras. En las células CD25+ se encontraron diferencias significativas de a con respecto a b, de b con respecto a c, en BALB/cAnN. En las células CD69, las diferencias significativas encontradas fueron de a con respecto a los demás puntos ($P < 0.05$).

En BALB/cJ se observa además, un incremento significativo en el porcentaje de células Pan-NK+, del 8% al día 5 de infección (Fig. 28). Al medir células Pan-NK+/CD69+, no se encontraron diferencias significativas. (Fig. 29)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

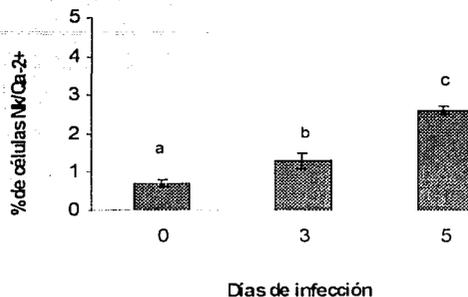


□ BALB/cAnN ■ BALB/cJ

Promedio \pm D.S. del porcentaje de células Pan-NK+ (Fig. 28) y Pan-NK+/CD69+ (Fig. 29) detectadas por citometría de flujo a tiempos tempranos post-infección en la cavidad peritoneal de 3 ratones hembras. En el análisis de las células Pan-NK+ se encontraron diferencias significativas de a con respecto al resto de los puntos ($P < 0.05$) en la cepa BALB/cJ. En las células NK+/CD69, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células Pan-NK+/Qa-2+ en BALB/cJ, presentándose un incremento desde el día 3 de infección (Fig. 30).

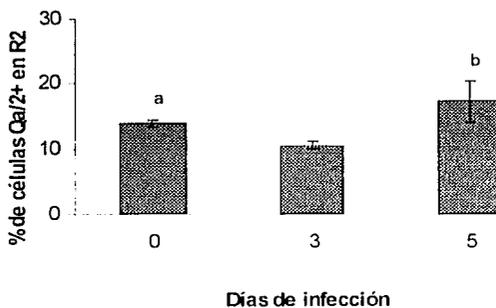
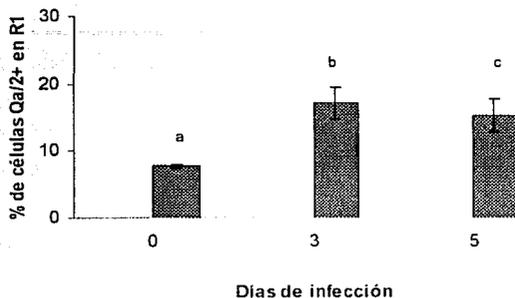
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



■ BALB/cJ

Fig. 30. Promedio \pm D.S. del porcentaje de células Pan-Nk+/Qa-2+ detectadas por citometría de flujo a tiempos tempranos post-infección en la cavidad peritoneal de 3 ratones hembras. En las células NK+/Qa-2+ se encontraron diferencias significativas de a con respecto a b, y de b con respecto a c ($P < 0.05$).

Se evaluó el porcentaje de células positivas Qa-2+ en las regiones uno y dos descritas con anterioridad. Encontramos que en la Región 1 (Fig. 31), hubo un incremento significativo de células Qa-2+ al día 3 de infección, mientras que en la región 2, solo se detectó un incremento significativo hasta el día 5 (Fig. 32).



■ BALB/cJ

Promedio \pm D.S. del porcentaje de células Qa-2 en R1 (Fig. 31) y Qa-2 (Fig. 32) en R2 detectadas por citometría de flujo a tiempos tempranos post-infección en la cavidad peritoneal de 3 ratones hembras. En las células Qa-2+ de la región 1 se encontraron diferencias significativas de a y c con respecto a b ($P < 0.05$). En las células Qa-2+ en la región 2, las diferencias significativas encontradas fueron de a con respecto a b ($P < 0.05$).

El porcentaje de células Mac-3+ aumentó con la infección solo en la cepa resistente (Fig. 33). Ese aumento es atribuible a una población Mac-3+/Qa-2- (Fig. 34) a los 3 días y Mac-3 Qa2+ (Fig. 35) a los 5 días.

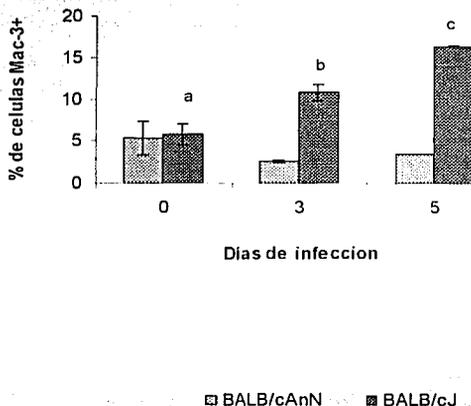
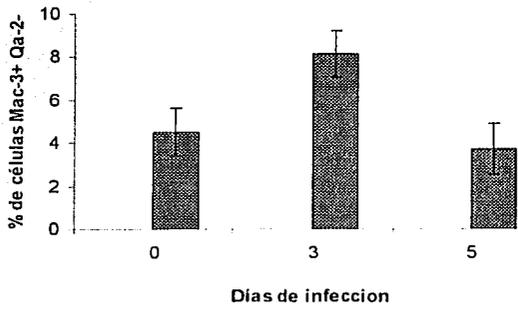
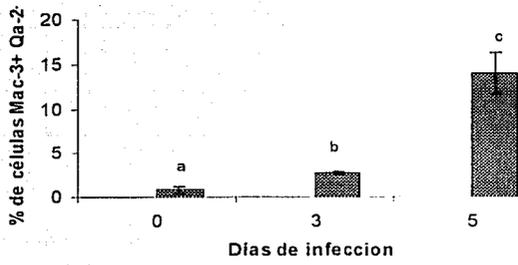


Fig. 33. Promedio \pm D.S. del porcentaje de células Mac-3+ en R2 detectadas por citometría de flujo a tiempos tempranos post-infección en la cavidad peritoneal de 3 ratones hembras. Se encontraron diferencias significativas de a, con respecto a b y b con respecto a c ($P < 0.05$) en BALB/cJ. No se encontraron diferencias significativas en BALB/cAnN.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



■ BALB/cJ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Promedio \pm D.S. del porcentaje de células Mac-3/Qa-2+ (Fig. 34) y Mac-3+/Qa-2- (Fig.35) detectadas por citometría de flujo a tiempos tempranos post-infección en la cavidad peritoneal de 3 hembras. En las células Mac-3/Qa-2+ se encontraron diferencias significativas de a con respecto a c, y de b con respecto a c ($P < 0.05$). En las células Mac-3/Qa-2-, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Finalmente expresando el porcentaje de macrófagos en función de Qa-2+ ó Qa-2-, se observa que en BALB/cJ la población de macrófagos Qa2+ aumentó del 13.8% al 85% al día 5 de infección.

DISCUSIÓN

1.-Evaluación de la cinética poblacional de cisticercos de *T. crassiceps*.

En este trabajo de tesis se realizó un estudio cinético para evaluar el establecimiento y la capacidad reproductiva de los cisticercos de *T. crassiceps* en ratones de la cepa BALB/cAnN y BALB/cJ de ambos sexos. Estas cepas fueron elegidas considerando resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio en los que se observó que a los 30 días de infección se obtenían mayor cantidad de parásitos en BALB/cAnN que en BALB/cJ. Considerando este criterio se denominaron como susceptibles y resistentes a la cisticercosis experimental murina, respectivamente (Sciutto, 1991). Estas cepas son de especial interés considerando su alta similitud genotípica (Roderick et al., 1985). Una de las diferencias fenotípicas reportadas entre estas sublíneas es la expresión en BALB/cJ del antígeno Qa-2 (Potter, 1985). A través de estudios de ligamiento genético entre BALB/cAnN y BALB/cJ se relacionó la expresión de dicha proteína con la resistencia a la cisticercosis experimental murina (Fragoso et al., 1996). La importancia de la expresión de la proteína en la resistencia a la cisticercosis se confirmó transfiriendo uno de los genes que codifica para esta proteína. Se generó un ratón transgénico de fondo susceptible que expresaba la proteína Qa-2 (Fragoso et al., 1998) observando que la expresión de esta proteína confería una parcial resistencia a la cisticercosis experimental murina. La proteína Qa-2, está considerada como una proteína de clase I del MHC no clásica.

Qa-2 se ha encontrado expresado especialmente en células epiteliales tímicas (Perarnaut et al., 1999; Ungchusri et al., 2001), en linfocitos T y menos importantemente en linfocitos B (Ungchusri et al., 2001). Se conoce su capacidad

de asociarse a diversos péptidos probablemente por la vía TAP (Tabaczewski et al., 1997; He et al., 2001) y su intervención en la respuesta inmune adaptativa en las células CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$ en linfocitos intraepiteliales (Das et al., 2000). Se ha reportado su posible participación en la respuesta innata, siendo capaz de inhibir la actividad citolítica de las células NK (Chiang et al., 2002). Si bien se conocen algunas de sus características, hasta la fecha se desconoce su función inmunológica.

En este estudio se utilizaron ratones de los dos sexos considerando que resultados previos indicaban que las hembras son más susceptibles que los machos (Larralde et al., 1989). Existen evidencias que permiten sostener que factores asociados al sexo podrían interaccionar con la respuesta inmune para determinar las diferencias de susceptibilidad entre hembras y machos (Huerta et al., 1992). Esta influencia hormonal parece estar dada a nivel del timo y en células T periféricas (Bojallil, 1993). Se ha encontrado que la hormona 17 β estradiol participa de manera importante ya que influye directamente en una mayor susceptibilidad en los dos sexos y altera la respuesta de hipersensibilidad tardía a antígenos específicos del parásito (Terrazas et al., 1994). Además, el crecimiento parasitario aparentemente se ve favorecido por un ambiente sexual femenino. En los machos, se ha observado un fenómeno de feminización durante la infección crónica, caracterizado por el incremento de los niveles de estradiol en el suero, 100 veces más que lo normal, al mismo tiempo el decremento de testosterona y dihidrotes-tosterona de 85 y 95% respectivamente. Así, estos cambios ocurridos en ratones machos durante la infección crónica en los niveles hormonales ocurren

simultáneamente con el incremento de una respuesta inmune inflamatoria (Morales-Montor, 2001). En ratones castrados y tratados con testosterona y dihidrotestosterona antes de la infección, disminuye el número de parásitos entre el 50 y 70%, respectivamente. Se ha especulado que los andrógenos participan en el control del crecimiento de los parásitos a través de la estimulación de una inmunidad específica celular (Morales-Montor, 2002). Además se ha encontrado que tanto IL-6 como MIF están relacionados en la susceptibilidad asociada al sexo en la cisticercosis por *T. crassiceps* (Morales-Montor, 2002).

En el presente trabajo de investigación se determinó, además, la cantidad de gemas por cisticerco, considerando que esta es la forma reconocida de reproducción del parásito en la cavidad peritoneal. En este estudio se encontró que el parásito en hembras de la cepa BALB/cAnN es capaz de instalarse y reproducirse desde los primeros días de infección y esto se ve reflejado en el incremento exponencial del número total de parásitos, mientras que en los machos se observa el mismo comportamiento solo que desplazado en el tiempo; el número total de cisticercos y el número de gemas incrementa pero de forma más lenta. En BALB/cJ el parásito logra mantenerse hasta el día 19 en hembras, no encontrándose gemas en los cisticercos recuperados lo que permite declarar que el parásito no logra reproducirse, y en los machos al día 12 prácticamente no se encontraron más parásitos. Así, la cepa BALB/cJ resuelve la infección durante los primeros días.

2.-Determinación de las poblaciones celulares de la cavidad peritoneal de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*.

En principio se consideró que la diferencia de susceptibilidad entre ambas cepas podría estar determinada por diferencias inmunológicas entre ellas. Bajo esta hipótesis se exploró en estudios previos la respuesta inmune adaptativa asociada a la infección (López-Briones, 2003). Los resultados indicaron que células de médula ósea estaban involucradas en mediar la resistencia a la parasitosis. Se observó una depleción temprana de linfocitos CD4 y CD8 en la cepa susceptible, en especial de la población TCR $\alpha\beta$ y en particular de la subpoblación de linfocitos V β 2 (Lopez-Briones et al., 2003). Si bien estas diferencias podrían ser causa o consecuencia de las diferencias de susceptibilidad, no justifican claramente las diferencias de susceptibilidad observadas entre las cepas.

Considerando estas observaciones y que los eventos principales en esta relación hospedero-parásito ocurren en la cavidad peritoneal de los ratones, se decidió evaluar las células locales asociadas a la respuesta innata.

2.2.-Determinación de las poblaciones celulares por preparaciones teñidas con Hematoxilina-Eosina

Se encontró que la población linfoide se comporta de forma similar en ambas cepas incrementándose al día 30 de infección, el porcentaje de eosinófilos que disminuyen en BALB/cJ al día 15, mientras que en BALB/cAnN se mantienen elevados. La disminución de eosinófilos en la cepa resistente (BALB/cJ) podría

ser un reflejo del éxito en la resolución de la infección, mientras que en la cepa susceptible (BALB/cAnN) los eosinófilos se mantienen altos paralelamente con la constante presencia del parásito. Respecto a la población de macrófagos observados por microscopía, se encontró que en la cepa susceptible hay un incremento del 30% de macrófagos al día 15, que coincide con el porcentaje encontrado en macrófagos con apariencia de células activadas aparentemente activados. Mientras tanto, en la cepa resistente hay un incremento desde el día 3 de infección del 40% de macrófagos aparentemente activados. Este incremento en la cepa resistente en los primeros días pudiera ser responsable de controlar la instalación y reestructuración del parásito, en especial considerando el claro incremento temprano de macrófagos con apariencia de un estado de activación. En contraste, en la cepa susceptible el incremento de macrófagos activados se presenta más tardíamente (día 15 de infección), lo que podría ser muy tarde para lograr controlar el establecimiento de la parasitosis. Respecto a las poblaciones de neutrófilos y monocitos, estos tipos celulares se mantienen elevados en ambas cepas, a diferencia de los basófilos que tienden a disminuir.

2.3.- Determinación de las poblaciones celulares por citometría de flujo.

Debido a las limitantes para identificar subpoblaciones linfoides utilizando microscopía óptica, se realizó el análisis de las poblaciones celulares por citometría de flujo. Después de obtener las células de la cavidad peritoneal de ratones infectados, se les adicionaron marcadores específicos para cada tipo celular. La cepa BALB/cAnN presenta un incremento significativo de células

CD4+, CD8+ y CD25+ al día 5 de infección, mientras que en BALB/cJ solo la población CD8+ incrementa significativamente en este tiempo. Respecto a diferencias en la población de células NK se encontró un incremento significativo entre ambas cepas. En la cepa BALB/cJ se registró un incremento del 8.4% al día 5 de infección mientras que en BALB/cAnN se encontró un decremento del 1.51%. Interesantemente, se encontró una población doble positiva Pan-NK+/Qa-2+, en BALB/cJ que se incrementa conforme avanza el tiempo de infección. Este hallazgo es importante porque podría estar relacionado con la capacidad de la cepa BALB/cJ de controlar el establecimiento y reestructuración del parásito. La mayor expresión de Qa-2 en NK podría reflejar un estado de activación de las células NK participantes como se ha reportado para linfocitos T activados. Este aumento temprano de células NK, posiblemente activadas, señala la posible relevancia de mecanismos efectores de la respuesta innata mediando la resistencia de BALB/cJ a la parasitosis. El incremento de Qa-2+ en tiempos tempranos no solo se limitó a células NK sino también se observó en otras poblaciones de la región 1 (linfocitos) y región 2 (macrófagos y células activadas). Qa-2 se ha encontrado expresada en células T (Vernachio, 1989), células T activadas (Ungchusri et al., 2001) células B (Vernachio, 1989), células NK (Chiang et al., 2002). Si bien el incremento de Qa-2 en macrófagos no se ha documentado asociado a su activación, si se ha documentado en células T, lo que hace posible que el aumento encontrado en cisticercosis podría reflejar un mayor estado de activación de esta población. Un triple marcaje (Mac-3/MHC II/Qa-2) podría permitir evaluar si efectivamente Qa-2 se incrementa en macrófagos activados los cuales incrementan la expresión de moléculas de clase II (Janeway, 2001).

A pesar de que previamente se ha documentado el incremento de Qa-2 en células T activadas, aún no se ha encontrado una función que la asocie con sus funciones efectoras. Menos aún se ha ahondado en las implicaciones que tiene el incremento de Qa-2 en las células de la respuesta innata (NK y macrófagos). Sin embargo, considerando que recientemente se han implicado a los fenómenos de activación de macrófagos durante la respuesta innata inducida por bacterias, virus y parásitos, pudiera ser factible que Qa-2 se expresara como una molécula participante de la activación de macrófagos de un modo similar como ocurre con el complejo para el reconocimiento del LPS a través del TLR4. Qa-2 al igual que CD14 se une a la membrana celular a través de un enlace fosfatidil inositol por lo que su probable función como molécula activadora vía TLR, pudiera ser lo que favorecería la activación no solo de macrófagos sino también de células NK.

Considerando que para tiempos tempranos de infección el parásito está disgregado en un conjunto de fragmentos y células, los macrófagos podrían dañar estos elementos no permitiendo la reconstitución e instalación del cisticerco. En contraste, en la cepa susceptible el incremento significativo de células Mac-3+ se observó hasta los 15 días posteriores a la infección, tiempo para el cual el fenómeno de instalación del parásito ya ha ocurrido e incluso ya ha comenzado el proceso de gemación, lo cual se ve reflejado en el número de cisticercos y cisticercos gemantes recuperados a los 15 días de infección en BALB/cAnN.

Estos resultados permiten proponer que mecanismos de inmunidad innata podrían estar involucrados en interrumpir la instalación del parásito en la cepa BALB/cJ. En estudios recientes inyectando cisticercos intactos utilizando una aguja de 21 x 32 mm calibre versus cisticercos inoculados con una aguja 27G x 13

mm calibre que rompe los parásitos inoculados, lo que requiere un proceso de reestructuración del parásito para su instalación. Los resultados claramente indican que inoculando cisticercos completos en la cavidad peritoneal de ratones, las diferencias de susceptibilidad se pierden entre cepas haciéndose bajo este criterio igualmente susceptibles. Mientras tanto, se continúan manifestando claramente las diferencias asociadas a sexo, al menos en BALB/cAnN.

Estos resultados permiten sostener que las diferencias de susceptibilidad entre cepas están determinados por fenómenos tempranos, relacionados con la reestructuración del parásito, en los que podría estar participando efectivamente la activación temprana de macrófagos mediando mecanismos de inmunidad innata. Estos mecanismos sólo parecen ser eficientes si el parásito requiere reestructurarse y no así si el parásito se inocula sin fragmentarse. Este aspecto resulta especialmente interesante considerando el auge adquirido por la inmunidad innata en el control de infecciones y la aún escasa información al respecto en el control de infecciones parasitarias. Mientras tanto, las diferencias relacionadas con factores sexuales parecen intervenir principalmente en el fenómeno de reproducción aunque no puede evaluarse en base a estas observaciones la relevancia de fenómenos tempranos.

En resumen, en esta tesis se incluyen claras evidencias que confirman las diferencias de susceptibilidad entre las cepas BALB/cJ y BALB/cAnN que se asocia a una respuesta inmune local diferencial. Se ilustra también que las diferencias radican en los fenómenos tempranos de reestructuración del parásito y señalan la posible relevancia de una respuesta inmune innata en el control de la

cisticercosis experimental murina. Estas observaciones establecen nuevas líneas de investigación a estudiar, tendientes a confirmar e identificar los mecanismos de inmunidad innata involucrados en el control de esta parasitosis así como un posible papel de la molécula Qa2 en estos mecanismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aluja A.S., Vargas G., 1988. The histopatology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol.* 28 65-77
2. Billiau, A., H. Heremans, K. Vermeire, and P. Matthys. 1998. Immunomodulatory properties of interferon-gamma. An update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 856:22-32
3. Biron, C.A. 1998. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptative immune responses to viral infections. *Semin. Immunol.* 10:383-390
4. Bojalil R., Terrazas L. I., Govezensky T., Sciutto E., and C. Larralde. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 79:384.
5. Brown and Gordon, 2002. *Immunology of infections Diseases.* p. 73-92 (ed) S.H. E. Kaufman, A. Sher, and Ahmed. ASM Press, Washington, D.C.
6. Burgner, D. K., Rockertt, and Kwiatkowski. 1999. Nitric oxide and infectious diseases. *Arch. Dis. Child.* 81:185-188
7. Cardillo, F., J. C. Voltarelli, S. G. Reed, and J.S. Silva. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infetion in mice by gamma interferon and interleujin 10: role of NK cells. *Infect. Immune.*64:128-134
8. Casadevall, A., and J. R. Perfect. 1998. *Cryptococcus neoformans*, p.177-222. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

9. Catterall J. R., C. M. Black, J. P. Leventhal, N. W. Rizk, J. S. Wachtel, and J. S. Remington. 1987. Nonoxidative microbial activity in normal human alveolar peritoneal macrophages. *Infect. Immune.* 55:1635-1640
10. Cifone MG, Ulises S, Santoni A. 2001. Natural killer cells and nitric oxide. *Int immunopharmacol* Aug;1(8):1513-24.
11. Clark, R. A. 1999. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 179: (Suppl. 2): S309-S317.
12. Coligan E.J., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E. M., Strober W. 1991 *Current protocols in immunology.* Vol 1 pp: 2.7.1 - 10.10.10
13. Colucci F, Di Santo JP y PJ Leibson. 2002. Natural Killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons?. *Nature Immunol* 3:807-13.
14. Cossart, P., P. Boquet, S. Normark and R. Rappuoli. (ed) 2000. *Cellular Microbiology.* ASM Press, Washington, D.C. et al., 2000;
15. Culbreth K.L., Esch G.W., Kuhn R.E., 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of ¹⁴C-leucine. *Exp. Parasitol.* Oct; 32 (2): 272-81
16. Chiang E, Henson M, Stroynowski I. 2002. The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cells from NK cell- and lymphokine-activated killer cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 168:2200-2211
17. Das G., Gould D.S., Augustine M.M., Fragoso G., Scitudo E., Stroynowski I., Van Kaer L., Schust D.J., Ploegh H., Janeway C.A., Jr. 2000. Qa-2-

- dependent selection of CD8 $\alpha\alpha$ T cell receptor $\alpha\beta$ cells in murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Exp Med* 192:1521-1528
18. Elhers, M. R., and M. Daffe. 1998. Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and host cells: are mycobacterial. *J. Bacteriol.* 181: 4443-4451
 19. Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Govezensky T., Sciutto E. 1996. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* 112:119-124
 20. Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Hernández M., Sciutto E. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 66:760-764
 21. Freeman R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool* 40: 969-990
 22. Goldsby RA, Kind TJ, Osborne BA. 2000. KUBI, Immunology. Ed. WH Freeman and Company New York 4^a ed.
 23. Gordon S. (ed) 1999. Phagocytosis Microbial invasion, vol 6. JAI Press Inc. Stamford, Conn.
 24. Gordon S. (ed) 1999. Phagocytosis the Host, vol. 5. Rabinovitch, 1995 JAI Press Inc. Stamford, Conn.
 25. Gordon S. 1999. Macrophages and the immune response. pp 533-545 *Fundamental Immunology*, Cuarta edición, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
 26. Greenfield, R. A., V. L. Abrams, D. L. Crawford, and T. L. Kuhls. 1993. Effect of abrogation of natural killer cell activity on the course of candidiasis

- induced by intraperitoneal administration and gastrointestinal candidiasis in mice with severe combined immunodeficiency. *Infect. Immun.* 61:2520-2525
27. Hampton M.B., A.J. Kettle, and C.C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007-3017
28. He X., Tabaczewski P., Ho J., Stroynowski I., Garcia K.C. 2001. Promiscuous antigen presentation by the nonclassical MHC Ib Qa-2 is enabled by a shallow, hydrophobic groove and self-stabilized peptide conformation. *Structure (Camb)*. Dec;9(12):1213-24.
29. Herring and Huffnagle, 2002. *Immunology of infectious Diseases*. p.127138 (ed) S.H. E. Kaufman, A. Sher, and Ahmed. ASM Press, Washington, D.C.
30. Horwitz, M. A. 1984. Phagocytosis of the Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* 36: 27-33
31. Huerta L., Terrazas L.I., Sciutto E., Larralde C. 2001. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol.* 1992 Jun;78(3):471-6.
32. Janeway A., Travers, P., Walport M., Shlomchik M. 2001. *Immunobiology*. Ed Garland ed 5^a
33. Larralde C, Sciutto E, Huerta L, Terrazas I, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Lomeli C, Tapia G, Montoya RM, et al. Related Articles, Links. Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leiden.* 1989;57(2):131-4.

34. Larralde C., Morales J., Terrazas I., Govezensky T., Romano M.C. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. J Steroid Biochem Mol Biol 52:575-580.
35. Larralde C., Padilla A., Hernández M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia-Conver R., Salvatierra B., Sepulveda J. 1992. Seroepidemiology of cisticercosis in Mexico. Salud pública Mex., 34:197-210
36. López-Briones S., Lamoyi E., Fragoso G., Soloski M.J., Sciutto E. 2003. *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. Parasitol Jun;90(3):236-42. Epub 2003 Mar 12.
37. López-Briones S., Soloski M.J., Bojalil R., Fragoso G., Sciutto E. 2001. CD4+ $\alpha\beta$ T cells are critically involved in the control of experimental murine cysticercosis in C57BL/6J mice. Parasitol Res 87:826-832
38. McDonald V., R. Deer, S. Uni, M. Iseki, and G. J. Bancroft. 1992. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompromised (nude and SCID) mice. Infect.immune. 60:3325-3331
39. Medzhitov R., and Janeway, Jr. 1997 Innate immunity: impact on the adaptative immune response. Curr. Opin. Immunol. 9:4-9
40. Mohan, K., P. Moulin, and M. M. Stevenson. 1997. Natural Killer cell cytokine production not cytotoxicity, contributes to resistance against blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection. J. Immunol. 159:4990-4998

41. Morales-Montor J., Baig S., Mithell R., Deway k., Hallal-Calleros C., Damian RT. 2001. Immunoendocrine interactions during chonic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6. J Immunol. Oct 15; 167 (8): 4527-33
42. Morales-Montor J., Baig S., Hallal-Calleros C., Damian Rt. 2002. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. Exp. Parasitol Apr; 100(4): 209-16
43. Morales-Montor J., Baigs S., Kabbani A., Damian RT. 2002. Do interleukin-6 and macrophage-migration inhibitory factor play a role during sex-associated susceptibility in murine cysticercosis?. Parasitol Res. Oct; 88 (10):901-4
44. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biasson R and L. Moretta. 2002. What is a natural killer cell?. Nature Immunology 3:6-8.
45. Padilla A, 2000 La interface celular del cisticerco de *Taenia crassiceps* con su huesped murino. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. México, D., F.
46. Paludan, S. R. 1998. Interleukin-4 and interferon-gamma. The quintessence of a natural antagonistic relationship. Scand. J. Immunol. 48:459-468
47. Peck, C. A., M. D. Carpenter, and A. A. Mahmoud. 1983. Species-related innate resistance to *Schistosoma mansoni*. Role of mononuclear phagocytes in schistosomula killing in vitro. J. Clin. Investig. 71:66-72
48. Pérarnau B., Saron M.F., Reina San Martín B, Bervas N, Ong H., Soloski M.J., Smith A.G., Ure J.M., Gairin J.E., Lemonnier F.A. 1999. Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb Knockout mice: periphelial Cd8+ T cell repertoire

- and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. Eur J Immunol 29:1243-1252
49. Potter M. 1985. History of the BALB/c family. Current Topics in Microbiology and Immunology 122, 1-5
50. Pretolani, M. 1999. Interleukin-10: an anti-inflammatory cytokine with therapeutic potential. Clin. Exp. Allergy. 29:1164-1171
51. Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White AC Jr. , 1997 Granuloma cytokines in murine cysticercosis Infect Immun Jul;65(7):2925-31
52. Roderick T.H., Langley S.H., Leiter E.H. 1985. Some unusual genetic characteristics of BALB/c and evidence for genetic variation among BALB/c substrains. Curr Top Microbiol Immunol 122:9-18
53. Rodríguez-Sosa M., David J.R, Bojalil R, Satoskar A.R., Terrazas L.I. 2002. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. J Immunol. Apr 1;168(7):3135-9.
54. Rodríguez-Soza M., Rosas L. E., David J.R., Bojalil R., Satoskar A.R., and Terrazas L. 2003. Macrophage Migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. Infection and Immunity, Mar p.1247-1254
55. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Related Articles, Links. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 1994 Aug;80(4):563-8.

56. Rosen, F.S. 1993. The primary specific immunodeficiencies, p.1271-1291. In P. J. Lachman (ed), Clinical Aspects of immunology, 3rd ed., Blackwell Publishing Co., Boston.
57. Sciutto E., Fragoso G., Baca M., V. De la Cruz L., Lemus, and Lamoyi E. 1995. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. Infect. Immun. 63:2277-2281
58. Sciutto E., Fragoso G., Diaz M., Valdez F., Montoya R. M., Govezenky T., Lomeli C., and Larralde C. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cisticercosis: H2 complex and sex influence on susceptibility. Parasitology Research 77. 243-6
59. Seydel K.B., S. J. Smith, and S. L. Stanley, Jr. 2000. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. Infect. Immun. 68:400-402
60. Shilo, M. U., J. D. Mac Micking, S. Nicholson, J. E. Brause, S. Potter, M. Marino, F. Fang, M. Dinauer, and C. Nathan. 1999. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthetase. Immunity 10:29-38
61. Sotelo J, Del Brutto OH, Roman GC. 1996 Cysticercosis. Curr Clin Top Infect Dis.,16:240-59.
62. Stefan H. E., Kaufmann, Alan Sher, Rafi Ahmed. 2002. Immunology of infections Diseases. p. 5-160 (ed) S.H. E. Kaufman, A. Sher, and Ahmed. ASM Press, Washington, D.C.

63. Tabaczewski P, Chiang E, Henson M, Stroynowski I. 1997. Alternative peptide binding motifs of Qa-2 class Ib molecules define rules for binding of self and nonself peptides. *J Immunol.* Sep 15;159(6):2771-81.
64. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84:74-81
65. Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 85:135-141
66. Terry K., Douglas T., Golenbock, Matthew J., Fenton. 2000. Structure and function of Toll-like receptor proteins. *Life Sciences* 68 (2000) 241-258
67. Thomson, A. 1998. *The cytokine Handbook*, 3rd ed. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
68. Toenjes S. A., Spolski R. J., Mooney K. A., and R. E. Kuhn. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology*. 118:623.
69. Unanue R. E. 2002. *Immunology of infections Diseases*. p. 93-103 (ed) S.H. E. Kaufman, A. Sher, and Ahmed. ASM Press, Washington, D.C.
70. Underhill D. M., A. Ozinsky, A. M. Hajjar, A. Stevens, C. B. Wilson, M. Bassetti, and A. Aderem. 1999. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophages phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401:811-815
71. Ungchusri T, Chiang EY, Brown G, Chen M, Tabaczewski P, Timares L, Stroynowski I. 2001 Widespread expression of the nonclassical class I Qa-2

- antigens in hemopoietic and nonhemopoietic cells. *Immunogenetics*. Aug;53(6):455-67.
72. Vazquez-Torres A, and E. Balish. 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:170-192
73. Vega RR, 2002. Variabilidad genetica entre cisticercos de *Taenia solium* de México y Madagascar por medio de random amplified polymorphic DNA. TESIS. U.N.A.M.
74. Vernachio J, Li M, Donnenberg AD, Soloski MJ. 1989 Qa-2 expression in the adult murine thymus. A unique marker for a mature thymic subset. *J Immunol.* Jan 1;142(1):48-56.
75. Villa OF, Kuhn RE. 1996. Related Articles, Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology.* Jun;112 (Pt 6):561-70.
76. White AC Jr. 2000 Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med.*;51:187-206.
77. Wright, S.D. 1999. Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J. Exp. Med.* 189:605-609

APENDICE I.

Soluciones

PBS 10X

Reactivo	gramos/litro de H ₂ O
NaCl	74
Na ₂ HPO ₄	10.22
NaH ₂ PO ₄	3.86

TINCION H-E

Hematoxilina

Reactivo	g o ml por litro de solución
Sulfato de amonio y Potasio	50g
Cristales de Hematoxilina	6g
Oxido rojo de mercurio	2.5g
Alcohol absoluto	50ml
Acido acético	20ml

Preparación

Sulfato de amonio y potasio se disuelve en agua caliente, se adiciona el alcohol y la hematoxilina y poco a poco el óxido rojo de mercurio, una vez que se enfría se le adicionan 20 ml de ácido acético.

Guardar en frasco color ámbar.

Eosina

Reactivo	g o ml/litro de solución
Eosina amarillenta	4g
Alcohol 96%	1 lt
Acido acético	10ml

Solución de FACS

PBS*

0.02% NaN₃

5% SFB (suero fetal bovino) (Gibco BRL 160000-044)

PBS (1X) 1 lt

Anticuerpos

MARCADOR	CLONA	FLORÓCROMO	CÉLULAS BLANCO
^a CD3e	145-2C11	Biotinilado FITC	Células T
^a CD4	GK 1.5	FITC	Cél. T (CD4+ CD8-)
^a CD8	53-6.7	FITC	Cél. T (CD4- CD8+)
^a CD19	1D3	PE	Células B
^a CD25	7D4	Biotinilado	Células T activas
^a CD69	1H1.2F3	Biotinilado	Macrófagos de médula ósea, NK, Neutrófilos, células T y células B
^a Qa-2	1-1-2	Biotinilado	Células T, B, Macrófagos, NK
^a Pan- NK	DX5	FITC	Células NKC
^a Mac-3	M3/84	FITC	Macrófagos
^b Estreptoavidina		PE	Biotina
Anti IgG-Parásito	policlonal	Biotinilado	Células del parásito 7d4
^a I. FITC	R35-95	FITC	Control de isotipo
^a I. PE	R3-34	PE	Control de isotipo

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para la identificación de los diferentes marcadores específicos para cada población celular estudiada. (^aPharmingen. ^BSigma)

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**