

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Participación del factor inhibidor de la migración de
macrófagos (MIF) en la respuesta inmune innata en la
infección por *Trypanosoma cruzi*

T E S I S

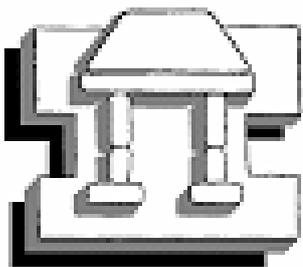
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ALICIA VAZQUEZ MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

2008



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.

DEDICATORIAS.

Para la mujer más bella e importante en mi vida mi **MAMA**, gracias por darme la vida, por tu lucha incansable, no pude haber tenido mejor imagen materna que la tuya **TE AMO**.

Para el amor de mi vida: **Marco**, mil gracias eres más que mi esposo, mi amigo, mi confidente pero sobre todo mi ejemplo de esfuerzo y superación. Gracias por el amor que día a día me entregas, por todo tu apoyo, comprensión y la confianza brindada, sin la cual no hubiese sido posible recorrer este largo camino. **TE ADORO**.

Para mis dos hermosos hijos **Marco Orlando** y **Diana Regina** por recorrer este camino a mi lado. Mi niña gracias por alegrar mis días con tu sonrisa y esa mirada llena de amor. A ti Orlando un reconocimiento especial, por aguantar largas horas en el laboratorio y el amor que me das. Son mi motivo y la luz de mi vida. **¡Los Amo!**

Para mis Queridos hermanos **Ramón, Gerardo y Aurelia**, gracias por esos bellos recuerdos de la infancia, por su apoyo, son mi ejemplo.

Para mis **sobrinos**: Diego, Rodrigo, Alejandro, David, Ángel, Jesús, Magali, Bryan, Axel, Keryen y para ese angelito que viene en camino. **¡Dios los bendiga!**

Para mis mejores **amigos** de la carrera: Alma, Ana María, David, Berenice y Tania, gracias por todos los momentos compartidos buenos y malos no saben cuánto aprendí de ustedes y lo mucho que les agradezco haberme permitido ser parte de su vida “los quiero mucho”.

Para **Sandra**: “cuñada” no hay más que agradecimiento para ti, con nada te recompenso todo el amor y cuidados brindados a mis hijos, simplemente eres incondicional. **Te Quiero Mucho**.

Para **Mary**, gracias por su apoyo.

Para la Señora **Ofelia**, mi más profundo respeto es muy valiente.

Para mis compadres **Yuri y Jocho**, gracias niños por los buenos momentos compartidos, por esas mañanas de café y de plática, por todas las observaciones y el apoyo en mi trabajo de tesis, pero sobretodo por la amistad que hemos hecho.

Para mis **compañeros** de laboratorio 5 y 8: Aaxin, Imelda, Arlett, Irma, Miriam y Laura.

Agradecimientos.

A Dios por todas y cada una de las bendiciones.

A mi familia por todo el apoyo brindado.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, mil gracias por la confianza y el apoyo brindado a lo largo de la realización de este proyecto.

Al Dr. Ignacio Terrazas, por sus observaciones y consejos en la realización de este proyecto.

A mis sinodales por su tiempo y sus acertadas opiniones:

Dra. Leticia Fierros.

Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

Dr. Luis Ignacio Terrazas.

Dr. Santiago Martínez Calvillo.

Prof.: Javier Trujillo.

A todos mis profesores de la carrera “Gracias por todos sus consejos y conocimientos”

Al personal del Bioterio de FES Iztacala.

Este proyecto fue apoyado por: CONACYT # 49812 y PAPIIT-UNAM-

IN208606

En Memoria de:
José
Martínez
Roberto
Guzmán.
nunca los olvidare.....

ÍNDICE

I RESUMEN	1
II INTRODUCCIÓN	2
II.1 Respuesta inmune innata	2
II.2 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	3
II.3 Papel de MIF en la respuesta inmune innata	4
II.4 Participación de MIF en enfermedades parasitarias	4
II.5 Enfermedad de Chagas	7
II.6 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
II.7 Inmunobiología de la enfermedad de Chagas	10
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVO GENERAL	14
IV.1 OBJETIVOS PARTICULARES	14
V. HIPOTESIS	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
VI.1 Genotipo de los animales experimentales por técnica de PCR	16
VI. 1.1 Extracción de DNA	16
VI. 1.2 Amplificación de gen	16
VI.1.3 Electroforesis	17
VI.2 Infección <i>in vivo</i> y mantenimiento del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> , (cepas Querétaro y Ninoa)	18
VI. 3 Evaluación del número de parásitos en sangre	18
VI.4 Determinación visual de sobrevida	19
VI.5 Cultivo de parásitos	19
VI.6 Obtención de antígeno total de <i>T. cruzi</i>	19
VI.6.1 Cuantificación de proteínas totales del Antígeno de <i>T. cruzi</i>	20
VI.7 Determinación de los niveles de citocinas en suero empleando la técnica de Elisa (sándwich)	22
VII.7.1 Obtención del suero	22
VI.7.2 Sensibilización de la placa	22
VI.7.3 Muestras y curva	22
VI.7.4 Revelado	22
VI.8 Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal	23
VI.9 Cultivo e infección <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales de ratones sanos	23
VI. 10 Tinción de células (macrófagos) peritoneales	24
VI.11 Determinación <i>in vitro</i> de citocinas (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6) en sobrenadante de cultivo de macrófagos por medio de la técnica de ELISA sándwich	24
VI.12 Determinación de óxido nítrico (NO) en sobrenadante de	24

cultivo de macrófagos	
VII. RESULTADOS	26
VIII. DISCUSIÓN	40
IX. CONCLUSIONES	49
X. REFERENCIAS	50
XI. APÉNDICES	55

II. Introducción

La principal función fisiológica del sistema inmune es proteger al hospedero contra sustancias extrañas, incluidos microorganismos patógenos y macromoléculas tales como proteínas y polisacáridos, con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas de dicha reacción. Tradicionalmente ha sido dividido en inmunidad innata e inmunidad adquirida. Las principales diferencias entre ambas son los mecanismos y los tipos de receptores empleados para el reconocimiento antigénico. En la inmunidad innata, los receptores reconocen estructuras altamente conservadas presentes en un gran grupo de microorganismos. Estas estructuras son designadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los receptores involucrados en identificarlos son llamados receptores para el reconocimiento del patrón (PRR). Mientras que en la inmunidad adquirida, los receptores reconocen a los microorganismos infecciosos e identifican antígenos propios y del medio. La delimitación entre la inmunidad innata y la adquirida no es posible, ya que las señales producidas por la inmunidad innata, controlan aspectos de la inmunidad adquirida y de igual manera la respuesta adaptativa puede dirigir a la respuesta innata.

II.1 Respuesta inmune innata

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa frente a las infecciones, por lo que su función consiste en evitar la entrada de microorganismos, así como la destrucción de los mismos sin hacer distinción específica de los diferentes agentes infecciosos. Los mecanismos de la inmunidad innata existen antes de la exposición a los microorganismos. En este tipo de inmunidad intervienen las barreras físicas y químicas, tales como: el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en su superficie. Las proteínas plasmáticas, incluyen miembros del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de inflamación. Las células que participan en este tipo de inmunidad son células fagocíticas como macrófagos y neutrófilos, células citotóxicas naturales (NK) éstas células son las principales productoras de citocinas proinflamatorias tales como IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-8, e IL-6.

Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras del crecimiento y diferenciación celular, inflamación y reparación. Son el principal medio de comunicación intercelular ante la invasión de patógenos iniciando de esta manera la respuesta inflamatoria y definiendo la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica.

II.2 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina proinflamatoria descrita en la década de los años 60, inicialmente fue descrita como un producto secretado por los linfocitos T activados, relacionándose con la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada y como su nombre lo indica por inhibir la migración azarosa de los macrófagos. Sin embargo, por más de 25 años fue poco el estudio de esta citocina acerca de sus implicaciones en la respuesta inmune. Recientemente se ha intensificado el estudio en torno a esta citocina a través de la producción de anticuerpos neutralizantes, clonación de cDNA en humanos y ratones, así como la generación de la proteína recombinante de MIF, permitiendo un análisis exacto acerca de sus características biológicas, bioquímicas y biofísicas. El peso molecular de MIF es de 12.5 KDa, compuesta por 115 aminoácidos y tres subunidades idénticas. Entre los avances más recientes se encuentra la descripción de su estructura tridimensional y que es producida por células del sistema inmune como linfocitos T, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, neutrofilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos así como en células no inmunes como la pituitaria, miocitos cardiacos, hepatocitos, fibroblastos, células de riñón y páncreas.

Hasta hace poco no se había identificado un receptor específico para MIF y sólo se sabía que se unía a CD74 y que esta unión favorecía la activación de la vía de señalización de las MAPquinasas, proliferación celular y la producción de prostaglandina E2. Recientemente se ha identificado que CXCR2 y CXCR4 son receptores funcionales para MIF y que CXCR2 al unirse a CD74 forman un complejo de receptores que regulan las funciones de MIF. Por otra parte, mediante la generación de ratones deficientes para MIF se pudo establecer la regulación positiva que ejerce esta molécula sobre un receptor importante en la inmunidad innata, el receptor tipo toll 4 (TLR4), involucrado en el reconocimiento de LPS, encontrando que estos ratones eran altamente resistentes al choque séptico por bacterias gram negativas. Por otro lado, se ha estudiado el efecto de MIF sobre la vascularización *in vitro*, la división celular y el retraso de apoptosis en ciertas células, hechos que despertaron mucho interés, ya que se sugiere un importante papel de MIF en cáncer.

II.3 Papel de MIF en la respuesta inmune innata

Recientemente se ha descrito el destacado papel MIF en la regulación de la respuesta inmune innata activando distintos tipos de células centrales en esta primera línea de defensa, como macrófagos (Mo) y neutrófilos. El descubrimiento de que MIF está preformado en las células que lo secretan y que puede ser liberado de manera casi inmediata ante el estímulo por LPS, glucocorticoides, toxinas de bacterias gram-positivas y por citocinas proinflamatorias como TNF- α e IFN- γ , no deja lugar a dudas de su importancia en la respuesta inmune innata (R. I. innata) . Además, induce la producción de citocinas como TNF- α e IL-12, que son esenciales en la resistencia contra microorganismos patógenos. Por otro lado, se ha observado su participación de forma protectora en diferentes enfermedades de tipo infeccioso como malaria, tifoidea, leishmaniasis y cisticercosis experimental y de forma patogénica en enfermedades donde la respuesta inflamatoria es exacerbada como gastritis, colitis, asma y glomerulonefritis. Además, se ha descrito su participación en algunas enfermedades de tipo autoinmune como artritis y miocarditis .

II.4 Participación de MIF en enfermedades parasitarias

Hasta ahora son claras las evidencias de que MIF participa de manera importante en distintas enfermedades autoinmunes, sin embargo cómo y a que nivel participa en la respuesta inmune ante infecciones parasitarias aún es poco claro. En 1991, David y su grupo reportaron por primera vez la participación de MIF en el control de la infección causada por el parásito intracelular *Leishmania donovani*, mediante la utilización de MIF recombinante humano. En un experimento *in vitro*, demostraron que MIF participa en la activación de los macrófagos incrementando su capacidad fagocítica, disminuyendo e incluso eliminando al parásito, así establecieron que MIF actúa como un potente activador de los macrófagos y como un factor importante en la defensa del hospedero . Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales MIF ejerce estos efectos no se dilucidaron. En el 2000 Martiney y colaboradores reportaron la asociación entre niveles altos de MIF en suero de ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* y la severidad de la enfermedad, demostrando que *P. chabaudi* induce la producción de MIF en los macrófagos . Posteriormente en el 2004 Sansanee y colaboradores reportan que pacientes infectados (niños de Tanzania) con el parásito *P. falciparum* tenían niveles incrementados de MIF y niveles disminuidos de TGF- β e IL-12 en suero, asociando la severidad de la enfermedad con los niveles disminuidos de estas citocinas . Con base en estos estudios hoy se sabe que

existe una asociación directa entre la anemia severa por malaria y la variación genética del gen para MIF (polimorfismo del gen MIF-173 varía en una transición de C-G en la posición 173). La variante del genotipo MIF-173 CC fue asociada con una mayor probabilidad de padecer anemia severa por malaria comparada con MIF-173 GG .

Por otro lado, Satoskar y colaboradores, utilizando ratones deficientes para el gen MIF (MIF^{-/-}), demostraron que la ausencia de esta molécula impide el desarrollo de la inmunidad protectora contra el parásito intracelular *Leishmania major*, ya que los ratones deficientes para MIF fueron significativamente más susceptibles a la infección comparados con el grupo control (MIF^{+/+}). Los ratones MIF^{-/-} desarrollaron una mayor carga parasitaria y mayor daño en el tejido en asociación directa con los niveles incrementados de IL-6 y niveles significativamente menores de óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos de los ratones MIF^{-/-} activados *in vitro* con IFN- γ . Demostrando así que MIF participa de manera muy importante en el desarrollo de la inmunidad protectora contra el parásito *Leishmania major* a través de una regulación de la actividad leishmanicida de los macrófagos . Por otro lado, Reyes *et al* en el 2006 demostraron que MIF tiene un papel crítico en la restricción y regulación inicial de la parasitemia en contra de la infección por *T. cruzi*, debido a que MIF regula la producción temprana de otras citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12, IL-18, IL-1 β e IFN- γ en suero. Asimismo los niveles de IL-12, IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas con antígeno de *T. cruzi*, se encontraron disminuidos durante la fase temprana de la infección, correlacionándose con un incremento significativo de nidos de amastigotes en músculo esquelético y corazón de ratones MIF^{-/-}. Cabe hacer notar que los niveles de IL-10 no se alteraron, ni tampoco la producción de IgG1. Estos datos sugirieron que MIF participaba **a través de un mecanismo aún desconocido** en la respuesta inmune innata, mas que en la respuesta inmune adaptativa en la infección por *T. cruzi* .

Investigaciones con parásitos extracelulares han demostrado que MIF también podría estar participando de manera importante en el control de estas infecciones parasitarias extracelulares, sin embargo no hay muchos estudios al respecto. En 1973 Boros y colaboradores describieron que granulomas hepáticos formados en la infección por *Schistosoma mansoni*, y mantenidos *in vitro* secretaban altos niveles de MIF . Recientemente, se estableció que MIF modula la respuesta inmune en la schistosomiasis. Experimentos en ratones infectados con *S. japonicum*, tratados a las 4-6 semanas post-infección con anticuerpos anti-MIF tuvieron un incremento significativo en el número de parásitos adultos, asociado con niveles disminuidos de TNF- α y niveles incrementados de IL-10 en esplenocitos y granulomas hepáticos. El tratamiento con anticuerpos anti-MIF

después de 6 semanas post-infección no tuvo ningún efecto en el transcurso de la infección, sugiriendo que la acción reguladora de MIF es importante en la respuesta inmune innata y adaptativa en esta infección .

En el 2003 Rodríguez y colaboradores, analizaron el curso de la infección por *Taenia crassiceps* en ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+}, demostrando que la ausencia de MIF favorece significativamente el establecimiento de este parásito extracelular y una mayor carga parasitaria asociada a niveles disminuidos en suero de IgG2a específica y a una producción disminuida de IL-12, TNF- α y óxido nítrico en los macrófagos peritoneales de estos ratones .

En conclusión, tanto en la infección por *Leishmania*, *T. cruzi* o por *Taenia crassiceps* MIF tiene un papel crítico como mediador de la protección contra estas infecciones parasitarias a través de la activación específica de los macrófagos más que por una desregulación de una respuesta Th1 o Th2. Aun cuando, la participación de MIF en la respuesta inmune a estas infecciones parasitarias no está bien definida, no cabe duda que MIF participa regulando la expresión de moléculas importantes para su control. Quedando por definir el mecanismo exacto por el cual esta citocina actúa para contener el crecimiento parasitario.

II.5 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis americana constituye un grave problema médico social de este continente, pues afecta cerca de 18-20 millones de personas y 90 millones más están en riesgo por habitar zonas en donde se distribuye el transmisor. Esta infección es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (figura 1).



Fig. 1 Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas

II.6 Ciclo de vida

T. cruzi tiene un ciclo de vida digénico se desarrolla en 2 tipos de hospederos: un vector artrópodo perteneciente a los géneros *Pastrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius* conocidos popularmente como chinche besucona (figura 2), y un hospedero vertebrado que comprende más de cien especies de mamíferos, incluyendo el hombre, animales domésticos y reservorios silvestres pertenecientes a los ordenes Marsupialia, Edentata, Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactila, Chiroptera y Primata .



Fig. 2 Triatoma infestans

En la figura 3. Podemos apreciar que el ciclo da inicio cuando un triatomino libre de infección toma, a través de su aparato bucal (proboscis) sangre humana o de animales infectados que contiene los trypomastigotes sanguíneos. (1) Los tripomastigotes se diferencian en epimastigotes en la parte anterior del tubo digestivo del triatomino, (2) estos se multiplican y se mantienen en el intestino medio durante toda la vida del insecto. (3) En la porción terminal del aparato digestivo del triatomino, se transforman en tripomastigotes metacíclicos y son eliminados con las heces. (4) Cuando el insecto infectado pica o succiona sangre del huésped mamífero, defeca y deposita sobre la piel las heces que contienen trypomastigotes metacíclicos (forma infectiva para el mamífero). (5) Los tripomastigotes se introducen en el hospedero mediante la ruptura del epitelio ocasionada generalmente por la picadura del artrópodo. (6) Dentro del hospedero, el parásito se internaliza en las células del sistema inmune innato (monocitos) y se multiplica intracelularmente como amastigote (sin flagelo), (7) el parásito es liberado al torrente sanguíneo por lisis de la célula hospedera. (8) En el torrente de los reservorios mamíferos u hospederos como el hombre lleva a cabo modificaciones morfológicas, originando formas intermedias (promastigote y epimastigote) para finalmente (9) formar la fase de tripomastigote sanguíneo mediante la cual llega a diferentes órganos invadiendo los tejidos de órganos, sistemas y aparatos importantes como el corazón y plexos nerviosos del tubo digestivo. Este último estadio es tomado por el vector hematófago, a través de su proboscis cerrando así el ciclo.

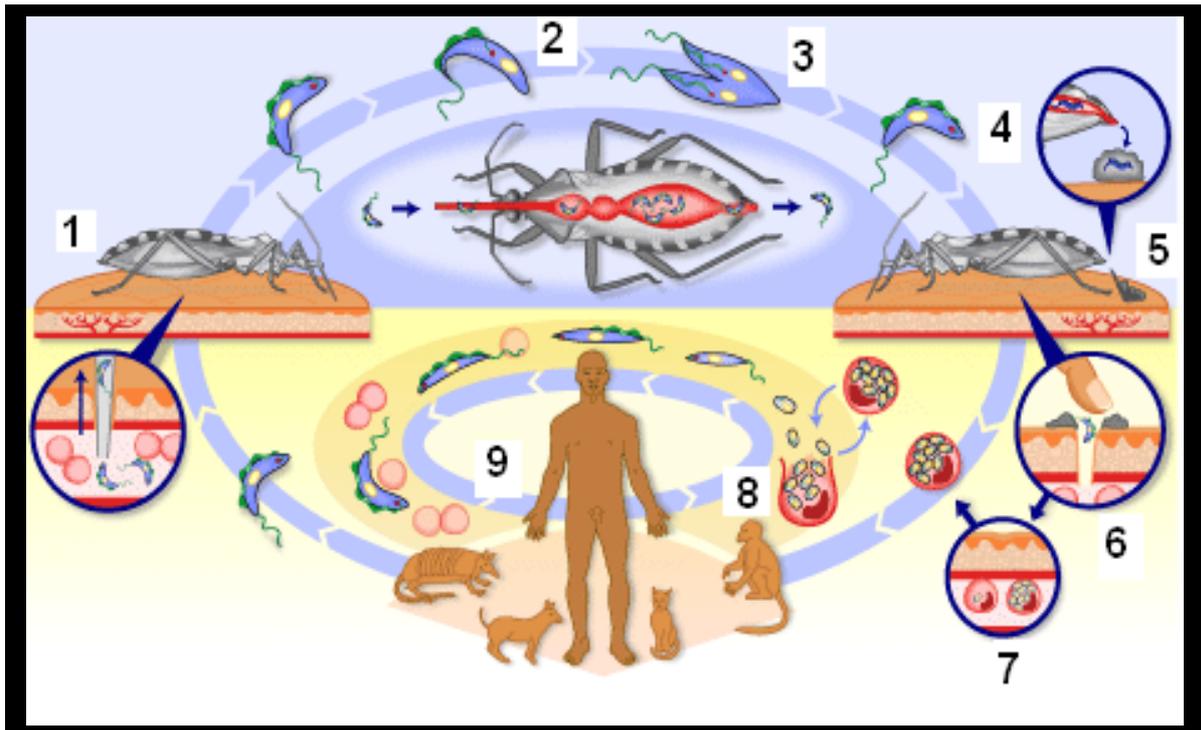


Fig. 3 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

La transmisión de la enfermedad de Chagas se puede dar de 4 formas: accidentalmente por transfusión de sangre infectada, transplante de órganos, de forma congénita y cuando el parásito es excretado con la materia fecal del artrópodo transmisor y puede penetrar al torrente sanguíneo de algún hospedero. El individuo infectado desarrolla una enfermedad progresiva, dando inicio con una etapa aguda caracterizada por fiebre, parasitemia detectable, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, vómitos, diarrea y especialmente, los signos de puerta de entrada, como el ojo de Romaña (figura 4). En un bajo número de casos (1-5%) se observa la aparición de una miocarditis, generalmente reversible, caracterizada por taquicardia, cardiomegalia y disfunción cardíaca, a veces acompañada por alteraciones electrocardiográficas. La etapa intermedia caracterizada por ser asintomática y sin presencia del parásito en sangre y finalmente, la etapa crónica donde la mayor parte de la población crónicamente infectada no presenta evidencias discernibles

de la enfermedad; en esta fase sólo un porcentaje de hasta el 30%, desarrolla después de 10 - 20 ó más años, síntomas y/o signos de daño visceral. Esto es lo que se denomina enfermedad de Chagas crónica.



Fig. 4 Signo de Romaña

II.7 Inmunobiología de la enfermedad de Chagas

La etapa aguda está determinada por la presencia del parásito *T. cruzi* en el torrente sanguíneo del hospedero. En esta etapa el parásito tiene la capacidad de internalizarse en las diferentes células de los diferentes sistemas u órganos, siendo de las primeras las células de la respuesta inmune innata como los macrófagos (Mo), en los cuales los parásitos se internalizan por medio de un evento fagocítico. Este proceso es dependiente de calcio e involucra el reclutamiento de lisosomas los cuales se fusionan con la membrana plasmática al sitio de entrada del parásito, contribuyendo a la formación de la vacuola parasitófora. La acción de la transialidasa neuraminidasa, complejo enzimático propio del parásito por medio del cual ocurre la transferencia de uniones alfa del ácido siálico de la célula a la membrana del parásito, facilita la lisis de la membrana celular y previene la acción lítica de la toxina TC-TOX sobre el parásito, esta toxina es más activa a pH ácidos y forma poros sobre la vacuola parasitófora favoreciendo la liberación del parásito al citoplasma de la célula hospedera donde lleva a cabo su replicación. La interacción entre los receptores expresados en la célula hospedera y el parásito es importante ya que estos se encargan de reconocer los principales antígenos de *T. cruzi* como es el Glicosilfosfatidinositol (GPI) y el Glicoinositolfosfolipido (GIPL) los cuales son reconocidos por los receptores tipo Toll (TLR 2, TLR4 y TLR9), que a través de vías dependientes de la molécula de señalización MyD 88, el hospedero comienza a desarrollar una respuesta proinflamatoria. Esta respuesta está asociada con la protección y se caracteriza por la producción de citocinas importantes como IL-12 que genera la producción de IFN- γ por células NK en la respuesta inmune innata, participando también en la producción de TNF- α . Estas citocinas a su vez

pueden activar los mecanismos microbicidas de los macrófagos como la producción de óxido nítrico, la principal molécula efectora que controla la replicación de parásitos intracelulares. En investigaciones previas utilizando diferentes cepas del parásito *T. cruzi* y hospederos se ha confirmado el importante papel que tiene la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, IFN- γ y TNF- α) durante la fase temprana de la infección para el control y replicación del parásito (tabla 1).

Hospedero	Cepa <i>T.cruzi</i>	Tratamiento	citocinas	Referencia
Ratón ♀ Balb/c	Ninoa	Reinfección 24 hrs post-infección 48 hrs post-infección 5dpi	suero TNF- α 3228 pg/ml IFN- γ 6949 pg/ml IL-10 305 pg/ml TNF- α 3666 pg/ml IFN- γ 6452 pg/ml IL-10 366 pg/ml TNF- α 6288 pg/ml IFN- γ 8913 pg/ml IL-10 396 pg/ml	Gómez García., <i>et al.</i> 2004.
<i>Calomys callosus</i>	Colombiana	antiTNF- α y anti IFN- γ	macrófagos (citoplasma) y tejido necrotico (miocardio y músculo esquelético) ↑ TNF- α , IFN- γ , TGF- β 15-45 dpi	Isis, F Magalhães <i>,et al.</i> 2005.
Ratón ♂ Balb/c	Querétaro	Suero 3dpi 11dpi	IL-12, 1200 pg/ml IFN- γ , 2800 pg/ml TNF- α 100 pg/ml Células de Bazo estimulados <i>in vitro</i> con Ag. <i>T. cruzi</i> IL-12 3000 pg/ml IFN- γ 18000 pg/ml TNF- α 589 pg/ml	Reyes, J.L., <i>et al.</i> 2006.

Tabla 1. Producción de citocinas en la infección por diferentes cepas de *T. cruzi* (dpi) días post-infección; (Ag) Antígeno.

Por otra parte, se ha sugerido que *T. cruzi* aprovecha y manipula las vías de señalización del hospedero de tal forma que le sea de beneficio para su supervivencia y replicación dentro de la célula blanco (Mo) .

Estudios acerca del comportamiento biológico de las diferentes cepas o aislados del parásito *T. cruzi* procedentes de reservorios humanos y vectores de distintas regiones geográficas muestran un comportamiento diferente de infección con animales de laboratorio (parásitemia, tropismo del tejido y tasas de mortalidad). Este fenómeno es influenciado por el medio ambiente, factores inmunológicos y a la posible selección de cepas y clonas después de la interacción con los vectores y con el hospedero vertebrado, la combinación de estos factores podría explicar la variabilidad biológica del parásito así como su virulencia y patogenicidad . Por otra parte, análisis en la diversidad de las secuencias y los diferentes niveles de expresión de la proteína TC52 liberada por *T. cruzi* se ha propuesto que podría estar involucrada en la variabilidad biológica de este parásito especialmente en la virulencia y propiedades inmunosupresoras de la diferentes cepas de *T. cruzi* .

Dependiendo de la cepa, los parásitos tardan algunos días o semanas para poder ser observados circulantes en sangre después de dividirse intracelularmente y liberarse por medio de lisis de la célula hospedera; una vez liberado en el torrente sanguíneo, el parásito es capaz de migrar a la mayoría de los órganos, aunque es eliminado en la mayoría de los ellos, a excepción del corazón, sistema nervioso central (SNC) y músculo esquelético fenómeno conocido como “tropismo celular”. El tropismo celular recientemente se relacionó con la incapacidad de las células del hospedero para translocar de manera optima el factor de transcripción NF- κ B en los órganos, lo cual hace más difícil eliminar al parásito, aunque esto no ha sido plenamente demostrado . Esta hipótesis parece ser muy viable ya que NF- κ B es responsable de la transcripción de aproximadamente 60 genes entre los que se encuentran citocinas implicadas en la resistencia al parásito .

I. RESUMEN

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una molécula de la respuesta inmune (RI) ampliamente reconocida por su participación en diversas patologías inmuno-inflamatorias. En contraste, existen pocos estudios sobre la participación de MIF en el desarrollo y curso de infecciones parasitarias; al respecto, nosotros recientemente hemos demostrado que MIF es necesario para controlar la infección por *Trypanosoma cruzi* *T. cruzi* regulando la producción de algunas moléculas importantes para el control de esta infección (IL-12, TNF- α y óxido nítrico). Con el fin de profundizar en los mecanismos efectores de MIF en el control de la infección por *T. cruzi* determinamos la participación de MIF en tiempos tempranos post-infección de dos cepas de *T. cruzi* con distinta virulencia (Querétaro, virulencia media; Ninoa, virulencia baja).

Ratones hembras BALB/c deficientes para MIF (MIF^{-/-}) y ratones silvestres (MIF^{+/+}) se infectaron vía intraperitoneal (i. p) con 5×10^3 trypomastigotes de *T. cruzi*. Se siguió el curso de la infección para obtener el índice de mortalidad, se determinó el número de parásitos en sangre en una cinética de tiempo. Se obtuvo suero a las 0, 12, 24, 48 y 72 hr post-infección para determinar citocinas (IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10) por ELISA-sándwich. Independientemente de la cepa, se observó que los MIF^{-/-} tuvieron entre dos y cuatro veces más parásitos/ml de sangre que los MIF^{+/+}, esto se asoció con una temprana y mayor mortalidad (MIF^{-/-} 25 días para Querétaro, y 40 días para Ninoa vs MIF^{+/+} 40 días para Querétaro, no hubo mortalidad para Ninoa). Los niveles post-infección de IL-1 β , TNF- α , e IFN- γ estuvieron significativamente disminuidos (* $p < 0.05$) en los ratones MIF^{-/-} comparados con MIF^{+/+}.

Además, se infectaron *in vitro* macrófagos de ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-}. Los macrófagos de MIF^{-/-} se infectaron 3 veces más que los macrófagos MIF^{+/+}. El mayor número de parásitos observados en los macrófagos de ratones MIF^{-/-} estuvo en asociación directa con una carencia temprana de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, IL-1 β , TNF- α) y óxido nítrico. En conjunto, estos datos sugieren que MIF participa como una molécula importante de la respuesta inmune innata que controla la infección por *T. cruzi*.

Planteamiento del problema

Las infecciones parasitarias son un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo. Particularmente, la enfermedad de Chagas constituye un grave problema médico y social en el continente americano afectando entre 18 y 20 millones de personas. Sin lugar a dudas, el entendimiento de la respuesta inmune que subyace a esta infección, abrirá una gama de posibilidades para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Antecedentes

Hasta ahora son claras las evidencias de que MIF participa de manera importante en distintas enfermedades autoinmunes, sin embargo cómo y a que nivel participa en la respuesta inmune ante infecciones parasitarias aún es poco claro. En 1991, David y su grupo reportaron por primera vez la participación de MIF en el control de la infección causada por el parásito intracelular *Leishmania donovani*, mediante la utilización de MIF recombinante humano. En un experimento *in vitro*, demostraron que MIF participa en la activación de los macrófagos incrementando su capacidad fagocítica, disminuyendo e incluso eliminando al parásito, así establecieron que MIF actúa como un potente activador de los macrófagos y como un factor importante en la defensa del hospedero . Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales MIF ejerce estos efectos no se dilucidaron. En el 2000 Martiney y colaboradores reportaron la asociación entre niveles altos de MIF en suero de ratones infectados con *Plasmodium chabaudi* y la severidad de la enfermedad, demostrando que *P. chabaudi* induce la producción de MIF en los macrófagos . Posteriormente en el 2004 Sansanee y colaboradores reportan que pacientes infectados (niños de Tanzania) con el parásito *P. falciparum* tenían niveles incrementados de MIF y niveles disminuidos de TGF- β e IL-12 en suero, asociando la severidad de la enfermedad con los niveles disminuidos de estas citocinas . Con base en estos estudios hoy se sabe que existe una asociación directa entre la anemia severa por malaria y la variación genética del gen para MIF (polimorfismo del gen MIF-173 varía en una transición de C-G en la posición 173). La variante del genotipo MIF-173 CC fue asociada con una mayor probabilidad de padecer anemia severa por malaria comparada con MIF-173 GG .

Por otro lado, Satoskar y colaboradores, utilizando ratones deficientes para el gen MIF (MIF^{-/-}), demostraron que la ausencia de esta molécula impide el desarrollo de la inmunidad protectora contra el parásito intracelular *Leishmania major*, ya que los ratones deficientes para MIF fueron significativamente más susceptibles a la infección comparados con el grupo control (MIF^{+/+}). Los ratones MIF^{-/-} desarrollaron una mayor carga parasitaria y mayor daño en el tejido en asociación directa con los niveles incrementados de IL-6 y niveles significativamente menores de óxido nítrico (NO) producido por los macrófagos de los ratones MIF^{-/-} activados *in vitro* con IFN- γ . Demostrando así que MIF participa de manera muy importante en el desarrollo de la

inmunidad protectora contra el parásito *Leishmania major* a través de una regulación de la actividad leishmanicida de los macrófagos . Por otro lado, Reyes *et al* en el 2006 demostraron que MIF tiene un papel crítico en la restricción y regulación inicial de la parasitemia en contra de la infección por *T. cruzi*, debido a que MIF regula la producción temprana de otras citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12, IL-18, IL-1 β e IFN- γ en suero. Asimismo los niveles de IL-12, IFN- γ e IL-4 en el sobrenadante de cultivo de células de bazo estimuladas con antígeno de *T. cruzi*, se encontraron disminuidos durante la fase temprana de la infección, correlacionándose con un incremento significativo de nidos de amastigotes en músculo esquelético y corazón de ratones MIF-/- . Cabe hacer notar que los niveles de IL-10 no se alteraron, ni tampoco la producción de IgG1. Estos datos sugirieron que MIF participaba **a través de un mecanismo aún desconocido** en la respuesta inmune innata, mas que en la respuesta inmune adaptativa en la infección por *T. cruzi* .

Investigaciones con parásitos extracelulares han desmostrado que MIF también podría estar participando de manera importante en el control de estas infecciones parasitarias extracelulares, sin embargo no hay muchos estudios al respecto. En 1973 Boros y colaboradores describieron que granulomas hepáticos formados en la infección por *Schistosoma mansoni*, y mantenidos *in vitro* secretaban altos niveles de MIF . Recientemente, se estableció que MIF modula la respuesta inmune en la schistosomiasis. Experimentos en ratones infectados con *S. japonicum*, tratados a las 4-6 semanas post-infección con anticuerpos anti-MIF tuvieron un incremento significativo en el número de parásitos adultos, asociado con niveles disminuidos de TNF- α y niveles incrementados de IL-10 en esplenocitos y granulomas hepáticos. El tratamiento con anticuerpos anti-MIF después de 6 semanas post-infección no tuvo ningún efecto en el transcurso de la infección, sugiriendo que la acción reguladora de MIF es importante en la respuesta inmune innata y adaptativa en esta infección .

En el 2003 Rodríguez y colaboradores, analizaron el curso de la infección por *Taenia crassiceps* en ratones MIF-/- y MIF+/+, demostrando que la ausencia de MIF favorece significativamente el establecimiento de este parásito extracelular y una mayor carga parasitaria asociada a niveles disminuidos en suero de IgG2a específica y a una producción desminuida de IL-12, TNF- α y óxido nítrico en los macrófagos peritoneales de estos ratones .

En conclusión, tanto en la infección por *Leishmania*, *T. cruzi* o por *Taenia crassiceps* MIF tiene un papel crítico como mediador de la protección contra estas infecciones parasitarias a través de la activación específica de los macrófagos más que por una desregulación de una respuesta Th1 o Th2. Aun cuando, la participación de MIF en la respuesta inmune a estas infecciones parasitarias no está bien definida, no cabe duda que MIF participa regulando la expresión de moléculas importantes para su control. Quedando por definir el mecanismo exacto por el cual esta citocina actúa para contener el crecimiento parasitario.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la participación de MIF en la respuesta inmune innata en la infección por *T. cruzi*, utilizando dos cepas de parásitos, una de virulencia baja (Ninoa) y otra de virulencia media (Querétaro).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la parasitemia y la tasa de mortalidad entre los grupos de ratones MIF^{-/-} (KO) y MIF^{+/+} (WT), infectados con *T. cruzi*.
- Evaluar el nivel de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero de los dos grupos de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}) en tiempos muy tempranos de la infección (a las 0, 12, 18, 24, 48 y 72 hrs) para establecer su participación en la respuesta inmune innata.
- Determinar la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6) en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos peritoneales de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}) a las 18 y 48 hrs post-infección.
- Evaluar la tasa de infección por *T. cruzi* de los macrófagos peritoneales de ratones silvestres (MIF^{+/+}) y deficientes para MIF (MIF^{-/-}) a las 48 hr post-infección.

HIPOTESIS

MIF participa como un potencial mediador de la respuesta inmune innata del hospedero para controlar la infección por *T. cruzi* a través de la regulación de las citocinas proinflamatorias IL-12, TNF- α , IFN- γ e IL-1 β directamente involucradas en la patogénesis de la enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

Las infecciones parasitarias son un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo. Particularmente, la enfermedad de Chagas constituye un grave problema médico y social en el continente americano afectando entre 18 y 20 millones de personas. Sin lugar a dudas, el entendimiento de la respuesta inmune que subyace a esta infección, abrirá una gama de posibilidades para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

En el 2006 Reyes y colaboradores utilizando un modelo murino de infección con *T. cruzi* en ratones deficientes para MIF establecieron por primera vez que la molécula MIF tiene una participación activa en la restricción y regulación inicial de la parasitemia, sugiriendo que MIF participaba regulando la expresión de citocinas proinflamatorias generadas en la respuesta inmune innata. Aun cuando los resultados de este reporte sugerían la participación realmente no hubo un análisis de la participación de MIF en la respuesta inmune innata. Por lo que no dejó de ser un estudio meramente descriptivo quedando pendiente proponer el mecanismo fino que pueda explicar cómo MIF ejerce su acción.

Retomando el modelo previamente descrito nuestro interés particular fue estudiar la participación de MIF en la respuesta inmune innata no analizado por Reyes *et al.* Acercándonos al entendimiento de los mecanismos inmunológicos por los cuales MIF está participando en la restricción de la infección por *T. cruzi*.

VI. Materiales y Métodos

VI.1 Genotipo de los animales experimentales por técnica de PCR.

VI. 1.1 Extracción de DNA

Para la determinación del genotipo de los grupos a experimentar se empleó el método previamente reportado por Laird, P.W. . Se utilizaron ratones hembras entre 7-9 semanas de edad, utilizando guantes, material nuevo y estéril así como libre de DNAsas-RNAsas, se obtuvo aproximadamente 0.5 cm. de la parte final de la cola de cada uno de los ratones experimentales, la cola fue colocada en tubos de 1.8 ml (Eppendorf), marcados previamente, para llevar a cabo la digestión del tejido agregando 500 μ l de buffer de lisis (apéndice 1) y 20 μ l de protein K (in vitrogen 100 μ g/ μ l) dejando incubar toda la noche a 55 °C.

Posteriormente se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf con 500 μ l de isopropanol frío, invirtiéndolos de manera suave hasta hacer evidente la precipitación del DNA. Se centrifugo nuevamente a 1100 rpm durante 5 segundos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante para proceder a lavar el botón de DNA con etanol frío al 75 % en el mismo tubo resuspendiendo la pastilla y centrifugando nuevamente a 11000 rpm durante 5 minutos el sobrenadante fue desechado, dejando evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente mínimo 1 hora. Posteriormente el botón se resuspendió en 200 μ l de H₂O mQ.

VI. 1.2 Amplificación de gen

Se utilizaron primers específicos referidos en el Apéndice 2 para el reconocimiento del gen MIF.

Se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas de 0.2 ml, para llevar a cabo la reacción con un volumen final de 25 μ l colocando los siguientes reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerase, SIGMA) en el siguiente orden:

	Para MIF	Para NEO
Buffer [10x]	2.5 μ l	2.5 μ l
Mg Cl ₂ [50mM]	0.75 μ l	0.75 μ l

dNTP's	[10mM]	1.0 µl	0.5 µl
F	[15pM]	1.0 µl	3.0 µl
R	[15pM]	1.0 µl	3.0 µl
Red-Taq	[2.5U/µl]	0.5 µl	0.5 µl
H ₂ O	(Sigma)	18 µl	14.5 µl
Muestra DNA		1.0 µl	1.0 µl

Una vez listos los tubos con sus respectivos reactivos se colocan en el termociclador (Corbett Research) con la temperatura la alineación mencionada en el apéndice 2.

VI.1.3 Electroforésis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) 1% en buffer TBE 1x (apéndice) y 0.1% de bromuro de etidio (apéndice) sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a 4° C por 15 minutos para que se solidificara.

A cada uno de los tubos les agregó 5 µl de Buffer de carga blue Juice con Sybr-Green (In vitrogen) una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3 µl del marcador de peso molecular 100 pb (In vitrogen).

Las muestras fueron colocadas en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts, 200 mA durante 40 minutos. Se capturó la imagen con el equipo fujifilm Fla 5000.

VI.2 Infección *in vivo* y mantenimiento de las cepas Querétaro y Ninoa del parásito *Trypanosoma cruzi*.

Una vez determinado el genotipo del grupo de ratones control (MIF +/+), así como del grupo de ratones deficientes de MIF (MIF -/-) se inocularon intraperitonealmente (i.p) con 5000 trypomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Querétaro de infectividad media (donada por la Dra. Bertha Espinosa G, del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM), y *T. cruzi* Ninoa de baja infectividad (donada por el Dr. Pedro Reyes del Instituto de Cardiología "Ignacio Chávez") obtenidos por punción cardíaca de ratones previamente infectados, los parásitos se resuspendieron en 100µl de solución salina estéril (Pisa). Para mantener la cepa se realizaron pases sucesivos en ratones BALB/c, infectándolos i.p con 5000 trypomastigotes sanguíneos resuspendidos en 100 µl de solución salina estéril (Pisa).

VI. 3 Evaluación del número de parásitos en sangre

El número de parásitos en sangre de los ratones infectados de ambos grupos (MIF +/+ y MIF-/-) se evaluó mediante la obtención de 10 µl de sangre de periférica mediante una corte en la vena caudal con un bisturí de cada uno de los ratones infectados haciendo una dilución 1:50 en solución salina estéril (Pisa) con heparina en tubos Eppendorf de 1.8 ml. Posteriormente, de esta solución se tomaron 10 µl y se colocaron en una cámara de Neubauer (Hirschmann Techcolor) y se contaron los parásitos en los cuadrantes para leucocitos y el número de parásitos por ml de sangre se obtuvo aplicando la fórmula.

[(# de parásitos) (dilución)/0.4] (1000)= No. de parásitos/ml.

VI.4 Sobrevida

La sobrevida de los ratones infectados MIF+/+ y MIF-/- se hizo mediante monitoreo visual diario en el bioterio, durante 60 días posteriores a la infección.

VI.5 Cultivo de parásitos

Se utilizaron dos cepas de *T. cruzi* (Querétaro y Ninoa) ambas se mantuvieron en medio de cultivo bifásico de infusión cerebro corazón (BHI) enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado (Gibco) con solución salina al 0.85% como fase líquida. El agar se preparó de la siguiente forma:

BHI	3.7 gr.
Agar Nutritivo	2.3 gr.
Dextrosa	1.0 gr.
Agua Destilada	100ml

El medio de cultivo, la solución salina y el material de vidrio, como pipetas se esterilizó en autoclave por calor húmedo a 15 lbs de presión durante 15 minutos y enfriamiento lento.

Se resembraron 500 µl del parásito cada 20 días en medios de cultivo previamente esterilizados y suplementado con 1.7 ml de antibiótico, observando entre cada resiembra la viabilidad y estado axénico por medio de microscopia óptica.

VI.6 Obtención de antígeno total de *T. cruzi*

La obtención del antígeno de las cepas Querétaro y Ninoa de *T. cruzi*, se realizó mediante el cultivo del parásito *in vitro* aproximadamente 30 días en medio LIT a 28 °C sin agitación durante dos semanas. Posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 3000 rpm en tubos estériles de 50 ml para eliminar el medio de cultivo, lavando 2 veces con PBS o hasta que el botón de parásitos quedara limpio. El botón fue resuspendido en 2 ml de PBS conteniendo inhibidores de proteasas (Aprotinin, EDTA, PMSF, Peptatin y TLCK, todos marca sigma).

Los parásitos fueron sometidos a congelamiento inmediato con nitrógeno líquido y descongelamiento en baño María a 36 °C por al menos 10 veces para lisar las células, revisando al microscopio la destrucción del parásito. Se congeló a -70°C para su uso posterior. La concentración de proteína fue determinada por el método de Lowry. .

VI.6.1 Cuantificación de proteínas totales del antígeno de *T. cruzi*.

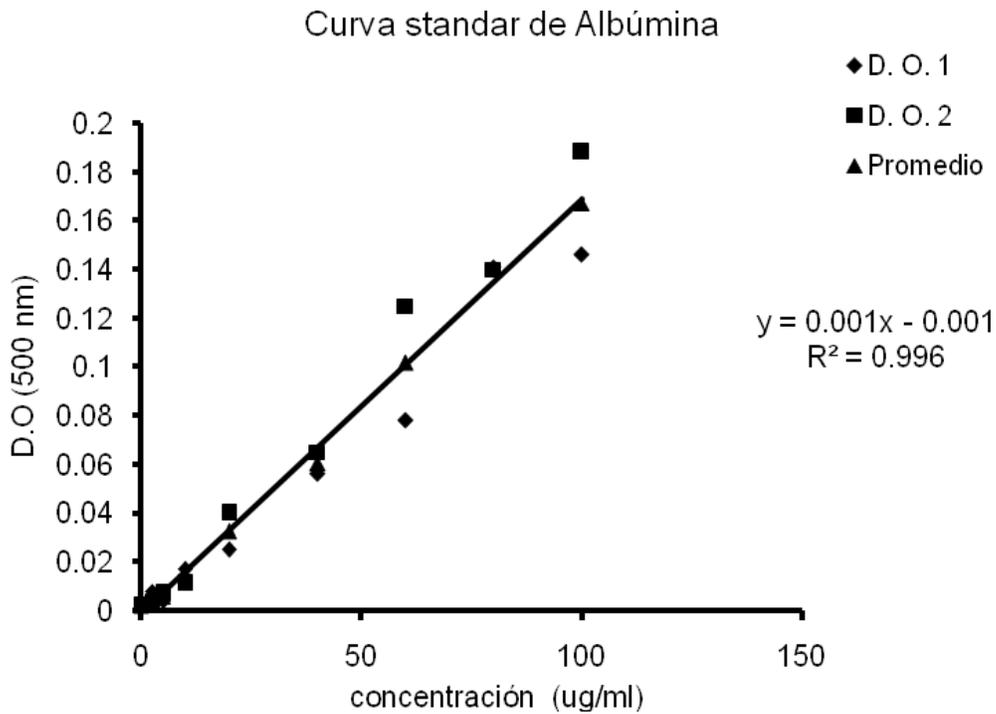
La determinación de la cantidad de proteína total de Ag obtenido se realizó por el método de cuantificación de proteínas Lowry modificado. Brevemente, se hizo una curva Standard con albúmina bovina sérica (ICN, Biomedicals, Inc.) desde 0 µg hasta 100 µg, se mezclaron los 3 reactivos: solución A, solución B y diferentes concentraciones de albúmina agregando a cada tubo 3ml agitando y dejando reposar 10 minutos en oscuridad. Finalmente se le adicionó a cada tubo 0.4 ml del reactivo Folin Cilcateau (J.T. Baker) diluido 1:2 en agua destilada, se agitó y dejó reposar 30 minutos. La lectura se hizo en un espectrofotómetro a 500nm, utilizando como blanco PBS.

De las muestras obtenidas de la lisis de los parásitos se realizaron 5 diluciones diferentes 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 y 1:50. Una vez realizadas estas diluciones se leyeron en un espectrofotómetro utilizando el factor 1 densidad óptica (D.O)= 40 µg.

Para la curva se utilizó la D.O de la lectura, el promedio, la intersección y la pendiente obtenidos del programa Excel (Microsoft) y se aplicó la formula $Y = mx + b$.

En donde $Y = D.O.$, $m =$ pendiente, $x =$ concentración y $b =$ intersección. Se utilizó el despeje $x = (y-b) / m$ para obtener la concentración de la diluciones realizadas.

De las concentraciones obtenidas de las 5 diluciones se tomó el promedio como la cantidad de antígeno obtenido.



Albúmina ($\mu\text{g/ml}$)	D. O. 1	D. O. 2	Promedio
100	0.146	0.188	0.167
80	0.141	0.140	0.140
60	0.078	0.125	0.101
40	0.056	0.065	0.0605
20	0.025	0.040	0.0325
10	0.017	0.011	0.014
5	0.004	0.007	0.005
2.5	0.008	0.004	0.006
0	0.002	0.002	0.002

Fig. 5.- Curva Estándar de albúmina, se presentan graficadas las dos densidades ópticas obtenidas y el promedio de estas contra la concentración de albúmina.

VI.7 Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (sandwich).

VII.7.1 Obtención del suero.

De los ratones infectados i.p con 5000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (Ninoa y Querétaro) se obtuvo sangre realizando una incisión en la región caudal a las 0, 12, 24, 48 y 72 hrs post-infección, la cual se centrifugo en tubos Eppendorf de 1.8 ml de 2 a 3 veces a 3000 rpm por 10 minutos hasta la obtención pura del suero, este se mantuvo en congelación a -70°C hasta su uso.

La concentración de las citocinas **IL-1 β , TNF- α , INF- γ , IL.6, IL-10, IL-12** se evaluó por medio de la técnica de ELISA sándwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Pharmingen, Peprotech y Biolegend). En todos los casos el procedimiento fue similar, siguiendo la especificaciones del proveedor y como previamente se reportó .

VI.7.2 Sensibilización de la placa.

El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 2 μ g /ml en buffer de fosfatos, pH 9 (0.1 M NaH₂PO₄ pH9, J.T. Baker) para cada una de las citocinas adicionando 50 μ l/pozo a placas de 96 pozos para ELISA (Nunc Maxisorp). Las placas se incubaron toda la noche a 4 °C.

VI.7.3 Muestras y curva

Al día siguiente las placas se sacaron a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con PBS tween-20, al 0.05% (Sigma), solución de lavado, una vez lavadas se les adiciono 200µl de buffer de bloqueó (10% FCS en PBS) dejando incubar a temperatura ambiente por 2 hr. Posteriormente las placas se lavaron dos veces con una solución de lavado y se colocó 50 µl/pozo de las muestras a determinar por duplicado, usando como control una curva de citocinas recombinante correspondiente a cada una de las citocinas de nuestro interés en, empezando con una concentración inicial de 4000pg/ml (Pharmingen) y siguiendo diluciones a la mitad en buffer de bloqueo. Las placas se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

VI.7.4 Revelado

Las placas se llevaron a temperatura ambiente, se lavaron 4 veces con buffer de lavado y se secaron por aspiración, se les adiciono el anticuerpo de detección marcado con biotina correspondiente para cada citocina a una concentración de 2µg/ml en buffer de bloqueo (Pharmingen), las placas se incubaron a temperatura ambiente por 1 hr para después lavarlas 5 veces con solución de lavado. Enseguida se adicionó 6µl/pozo del conjugado de estreptoavidina peroxidasa (BioRad) a una dilución de 1:2000 en buffer de bloqueo y se incubo a temperatura ambiente por 45 minutos. Posteriormente, se lavaron 6 veces con buffer de lavado. Se adicionó 100 µl/pozo de sustrato ABTS recientemente preparado (Sigma) (0.5% ABTS en 0.1M ácido cítrico anhidro, ph4.35 con NaOH más 1% H₂O₂ al 3%, todos los reactivos marca Sigma). La densidad óptica se determinó entre los primeros 30 minutos de iniciada la reacción en un lector de placas de ELISA (SpéctraMax 250, Molecular Devices) a 405nm.

VI.8 Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal.

Para la obtención de las células de la cavidad peritoneal de ratones silvestres y ratones deficientes para MIF, se utilizó el método básico de exudado peritoneal. Este método consiste en inyectar 10 ml de solución salina estéril (Pisa) en la cavidad peritoneal de los animales dando un ligero masaje a fin de remover la mayor cantidad de

macrófagos, posteriormente se hace una pequeña insición en la piel dejando expuesta la cavidad peritoneal para extraer los macrófagos contenidos en la solución salina la cual fue colocada en tubos cónicos estériles de 15 ml y llevados a volúmenes iguales para centrifugarlos a 3500 rpm durante 10 minutos, una vez centrifugados, el sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió en 1 ml de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100UI de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

VI.9 Cultivo e infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratones sanos.

El cultivo se realizó mediante la obtención de macrófagos peritoneales de los ratones silvestres y de los ratones deficientes para el gen MIF sanos, utilizando el método básico de exudado peritoneal descrito anteriormente. Los macrófagos obtenidos se ajustaron a 2×10^6 de células por ml con medio DMEM suplementado. Para la infección se utilizaron placas estériles de 12 pozos sembrando por duplicado 2×10^6 de células/ml, por pozo y para cada uno de los tratamientos Basal, *T. cruzi* y *T. cruzi* estimulado con 1ng de recombinante murina de IFN- γ , posteriormente fueron infectadas relación 1:10, es decir un macrófago por cada diez parásitos pozo, los macrófagos se cultivaron durante 48 hr a 37 °C, en una estufa de CO $_2$ obteniendo el sobrenadante a las 18 y 48 hr post-infección, el cual fue congelado a -20 °C para determinar la producción de citocinas *in vitro* empleando la técnica de ELISA sándwich.

VI. 10 Tinción de células (macrófagos) peritoneales.

Para determinar el porcentaje de macrófagos infectados así como el número de parásitos por cada 100 células intracelulares. Los macrófagos adheridos a los cubreobjetos fueron fijados con alcohol metílico y teñidos con colorante GIEMSA para su observación al microscopio de luz. Cada ensayo se realizó por duplicado.

VI.11 Determinación *in vitro* de citocinas (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6) en sobrenadante de cultivo de macrófagos por medio de la técnica de ELISA sándwich.

En los cultivos de macrófagos infectados con las cepas Querétaro y Ninoa del parásito de *T. cruzi* relación (1:10), se evaluó la producción de IL-12, TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-1 β por medio de la técnica de ELISA sándwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Pharmigen), la metodología a seguir se describió en uno de los puntos de la parte superior.

VI.12 Determinación de óxido nítrico (NO) en sobrenadante de cultivo de macrófagos

La determinación de óxido nítrico se realizó en los sobrenadantes de los macrófagos cultivados *in vitro* de los ratones deficientes para el gen MIF y MIF+/+, con y sin el parásito de los ratones deficientes para el gen MIF y silvestres. El ensayo consiste en preparar dos soluciones por separado.

Solución A, 0.1% de naphthylenediamine dihydrochloride en agua destilada.

Solución B, sulphanilamida 5 % en H₃PO₄ al 5 %.

Minutos antes de realizar el ensayo las soluciones se mezclaron vol/vol, para obtener el reactivo tener el reactivo de Griess. En una placa para ELISA de fondo plano, de 96 pozos se colocó una curva (empezando en 100 mM diluciones dobles) de nitrito de sodio (Na NO₂) como control y referencia para intrapolar las concentraciones (Densidad óptica) de las muestras. Tanto la curva como las muestras se colocaron en volúmenes de 100 μ l y 100 μ l de reactivo de Griess. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos y se leyeron a 550 nm en un lector de ELISA (Metertech S960).

VII. RESULTADOS

VII.1 Determinación del genotipo de los ratones del grupo control (MIF+/+) y el grupo experimental (MIF-/-)

Con el objetivo de asegurarnos que los ratones experimentales cumplieran con la condición de silvestre (MIF+/+) y deficientes para el gen que codifica para MIF (MIF-/-), todos los ratones se genotiparon por la técnica de PCR. La Figura 6 muestra una electroforesis en gel de agarosa del amplificado del gen funcional para MIF con un peso de 200 pb en los carriles 5, 6 y 7 del grupo utilizado como control y para NEO, el gen de inserción en los ratones deficientes para MIF con peso de 500 pb, en los carriles 1, 2 y 3.

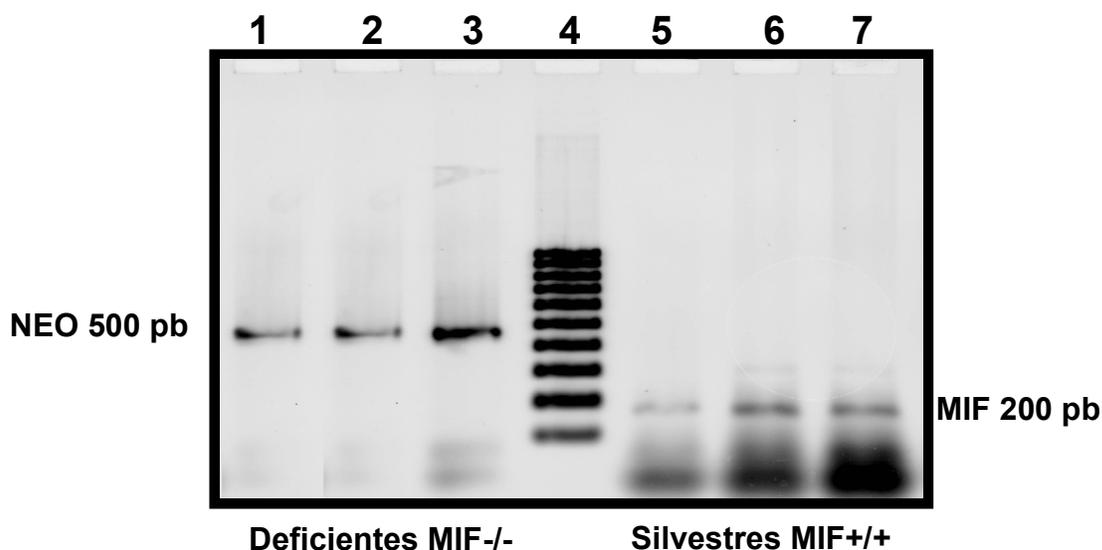
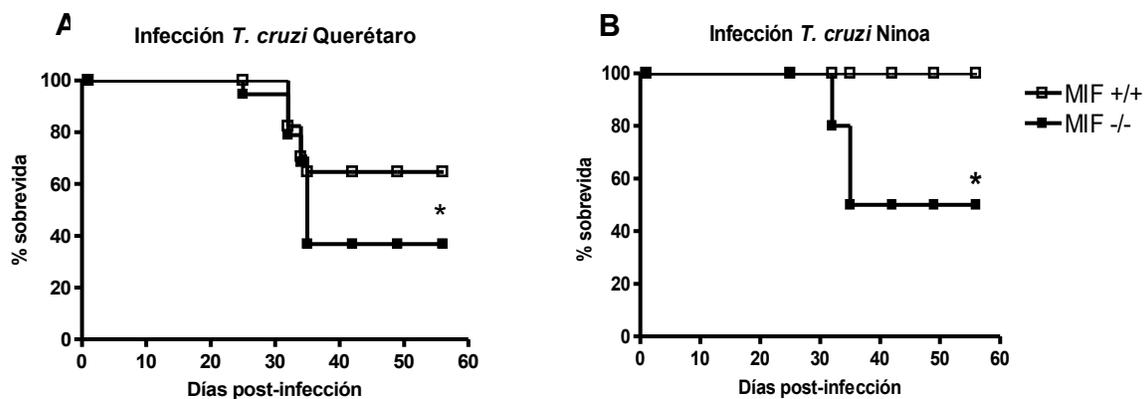


Fig. 6.- Determinación del genotipo de los ratones silvestres (MIF +/+) carriles 5-7 y de los ratones deficientes (MIF -/-) carriles 1-3 utilizando PCR. En el carril 4 se muestra el marcador de peso molecular de 100pb.

VII.2 SOBREVIDA

Con el fin de determinar la participación de MIF en la resistencia o susceptibilidad, en los ratones MIF+/+ y MIF-/- bajo las mismas condiciones de infección con *T. cruzi*, se monitoreó la supervivencia de los ratones durante los primeros 60 días post-infección.

En la figura 7 (A) podemos observar que con 5000 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro (virulencia media) los ratones MIF-/- fueron más susceptibles, sucumbiendo a partir de los 25 días posteriores a la infección, sobreviviendo sólo el 36% contra un 65% de supervivencia de los ratones MIF+/+. En el caso de los ratones infectados con la cepa Ninoa (virulencia baja) los ratones MIF+/+ tuvieron un 100% de supervivencia a la infección, no siendo así para los ratones MIF-/- donde solo el 50% de los ratones sobrevivió a la infección figura 7 (B). Estos resultados nos muestran que los ratones MIF-/- son más susceptibles a la infección por *T. cruzi*, en comparación con los MIF+/+.



VII.2 CARGA PARASITARIA

Fig. 7.- Curva de supervivencia de los ratones MIF+/+ vs. MIF-/- posterior al inoculo i.p de 5000 tripomastigotes sanguíneos *T. cruzi* A) cepa Querétaro B) cepa Ninoa. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes; *p<0.05 prueba de log rank, (Graphpad).

primeros 30 días posteriores a la infección. En la figura 8 (A) se muestra el crecimiento del

parásito en ratones MIF+/+ infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro en una curva típica, alcanzando un pico máximo de parasitemia alrededor del día 28 posterior al inoculo, con un promedio de 2×10^6 parásitos/ml. En cambio, los ratones MIF-/- presentaron un mayor número de parásitos en sangre. Estas diferencias fueron más marcadas en el día 21, 28 y 35 pos-infección, donde el punto más alto en el nivel de parásitos circulantes en los ratones MIF-/- se alcanzó el día 35 con 8×10^6 parásitos/ml. La figura 8 (B) muestra la curva de parasitemia de los ratones MIF+/+ infectados con la cepa de *T. cruzi* Ninoa alcanzando un pico máximo de parásitos alrededor del día 21 con 1.5×10^6 parásitos/ml, mientras que los ratones MIF-/- al mismo tiempo alcanzaron 2×10^6 parásitos/ml. Por otra parte, también se pueden observar claras diferencias en los ratones MIF-/- infectados con la cepa *T. cruzi* Querétaro (virulencia media) ya que presentaron 3 veces más parásitos circulantes en sangre, en comparación con los ratones MIF-/- infectados con la cepa Ninoa (virulencia baja).

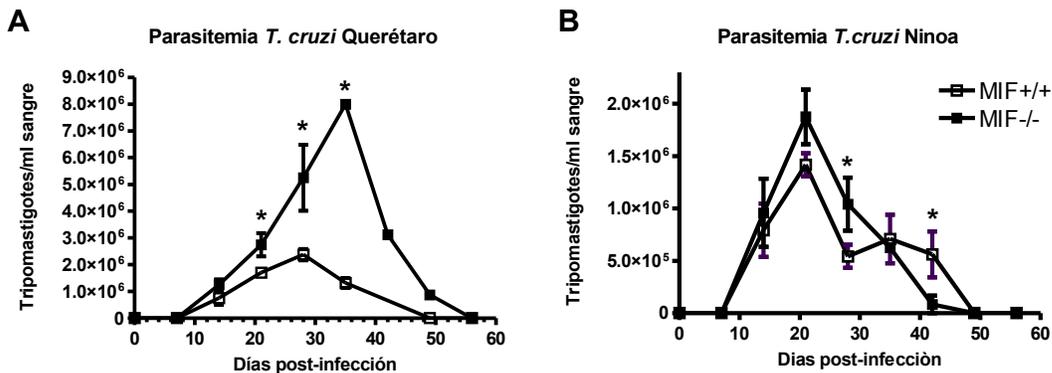


Fig. 8.- Evolución de la parasitemia después de la infección i.p con 5000 trypomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. Los ratones MIF-/- son más susceptibles a la infección por *T. cruzi* y presentan mayor número de parásitos en sangre en comparación con los ratones MIF+/+. A) Parasitemia de ratones Infectados con la cepa Querétaro, virulencia media. B) Parasitemia de ratones infectados con la cepa Ninoa, virulencia baja. Los resultados muestran la media de 18 ratones correspondientes a 3 experimentos independientes; * $p < 0.05$ "t" de students (Graphpad Prism)

VII.4 PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS EN SUELO.

VII.4.1 Citocinas proinflamatorias

Con el propósito de determinar la participación de MIF en la producción de citocinas proinflamatorias secretadas en los ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro y Ninoa, se obtuvieron y analizaron los sueros de tiempos tempranos (0, 12, 24, 48, 72 hrs p.i). En la figura 9 (A) se observa la producción de IL-12 en los ratones MIF^{-/-} infectados con la cepa de *T. cruzi* Querétaro, la cual fue estadística y significativamente menor durante los cuatro puntos determinados en la cinética post-infección comparada con la producción de esta misma citocina en los ratones MIF^{+/+}.

La figura 9 (B) muestra la producción de esta misma citocina en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Ninoa, a pesar de no observar diferencias significativas en la producción de esta citocina a excepción de las 24 hr, sin embargo se puede ver que la producción de esta se incrementa ligeramente en los ratones MIF^{+/+} comparada con los ratones MIF^{-/-}. Como se observa en las gráficas, la infección con la cepa Querétaro produce 2 veces mas IL-12 en comparación con la cepa Ninoa en ratones MIF^{+/+}.

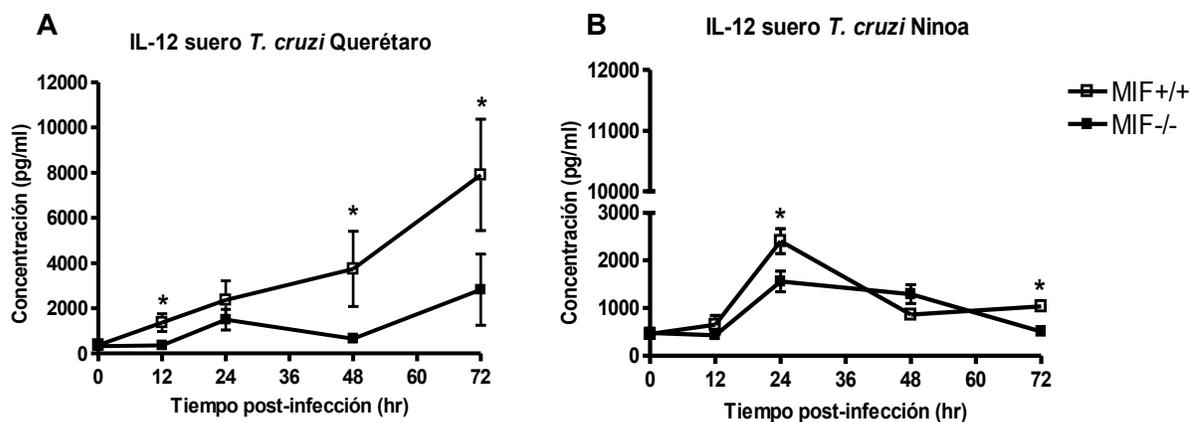


Fig. 9.- Producción de IL-12 en suero de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi*. (A) Infección cepa Querétaro, (B) Infección cepa Ninoa. Los resultados representan la media de 3

experimentos independientes con 6 ratones por grupo; *p< 0.05 prueba "t" students (graphpad Prism).

En lo que concierne a la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , como se muestra en las figuras 10-12 (A) ratones infectados con *T. cruzi* Querétaro y (B) ratones infectados con *T. cruzi* Ninoa, los ratones MIF-/- tienen disminuida la producción de estas citocinas comparado con los niveles producidos por ratones MIF+/+ que conforme transcurre la infección se observa un incremento en la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-1 β ,

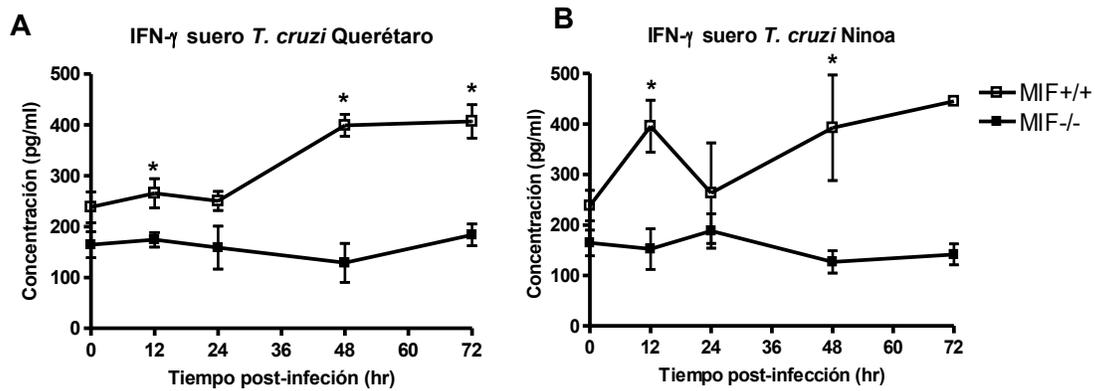


Fig. 10.- Los ratones MIF-/- infectados con la cepa de *T. cruzi* Querétaro o Ninoa tuvieron disminuida la producción de esta citocina durante las primeras 72 hr post-infección, comparado con los niveles producidos por los ratones MIF+/+. (A) cepa Querétaro, (B) cepa Ninoa. Los puntos graficados representan el promedio de 4 experimentos independientes con 5 ratones por grupo; *p< 0.05 prueba "t" students (graphpad Prism)

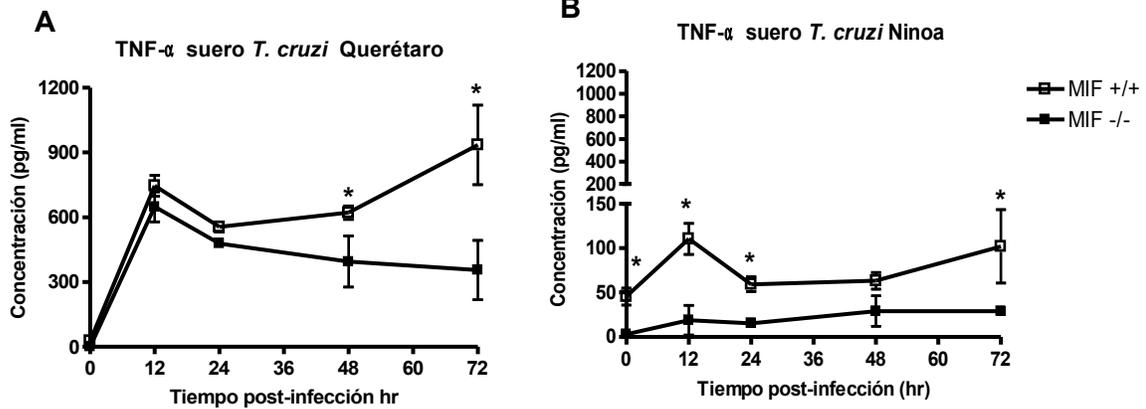


Fig. 11.- La producción de TNF- α en los ratones MIF-/- fue significativamente menor a los niveles producidos por los ratones MIF+/-, durante las primeras 72 horas posteriores a la infección. (A) cepa *T. cruzi* Querétaro (B) cepa *T. cruzi* Ninoa. Los resultados presentados son la media de 18 ratones de 3 experimentos independientes con 6 ratones por grupo; * $p < 0.05$ prueba "t" students (graphpad Prism).

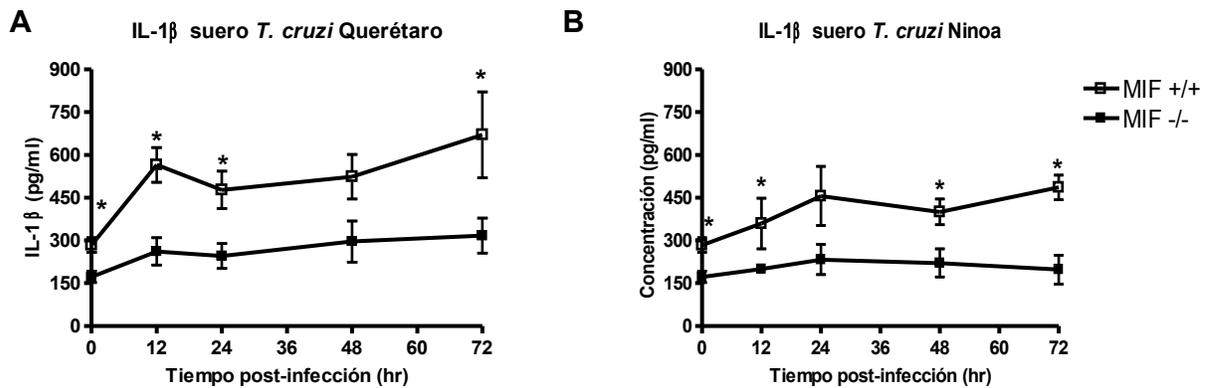


Fig. 12.- Los niveles de IL-1 β producidos por los ratones MIF $^{-/-}$ infectados con la cepa de *T. cruzi* Querétaro o Ninoa se mantuvieron significativamente disminuidos desde el inicio de la infección, mientras que en los ratones silvestres MIF $^{+/+}$ tuvieron significativamente incrementada la producción de esta citocina. (A) ratones infectados con la cepa Querétaro, (B) ratones infectados con la cepa Ninoa. Los puntos graficados son el promedio de 4 experimentos independientes con 5 ratones por grupo * $p < 0.05$ prueba "t" students (graphpad Prism).

Finalmente para comprobar la actividad proinflamatoria de MIF, sobre las citocinas antes descritas, se decidió medir la producción de esta citocina en suero y como lo muestra la figura 13 (A y B). Como era de esperarse, los ratones MIF $^{-/-}$ infectados con *T. cruzi*, cepa Querétaro o Ninoa, no producen MIF. Resulto mas que interesante ver que en los ratones MIF $^{+/+}$ infectados con la cepa Querétaro hubo una sobreexpresión de MIF a nivel sistémico estadísticamente significativa sin embargo no fue el caso para los ratones MIF $^{+/+}$ infectados con la cepa Ninoa, los niveles de MIF tuvieron un ligero incremento a las 72 hr post infección.

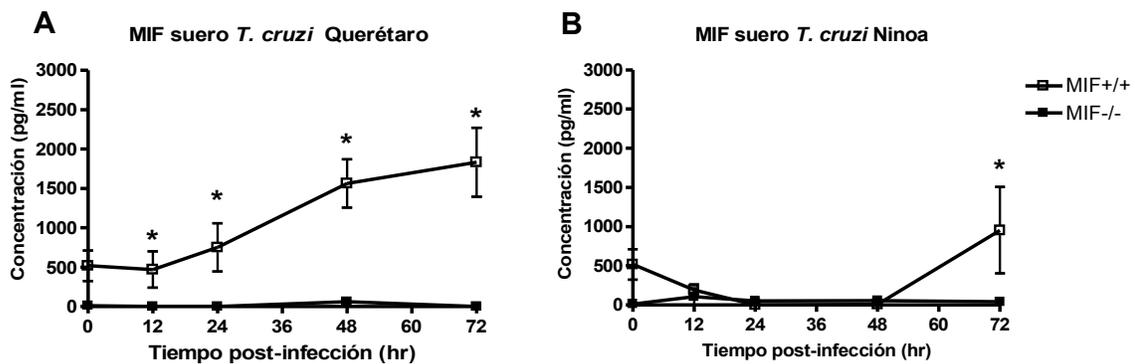


Fig. 13.- Los niveles de MIF producidos por los ratones MIF $^{-/-}$ infectados con la cepa de *T. cruzi* Querétaro o Ninoa se mantuvieron significativamente disminuidos desde el inicio de la infección, mientras que en los ratones silvestres MIF $^{+/+}$ tuvieron significativamente incrementada la producción de esta citocina. (A) cepa Querétaro, (B) cepa Ninoa. Los puntos graficados son el promedio de 2 experimentos independientes con 4 ratones por grupo * $p < 0.05$ prueba "t" students (graphpad Prism).

VII.5 CITOCINAS ANTINFLAMATORIAS.

La citocina IL-10 está considerada dentro del grupo de citocinas con efectos antiinflamatorios. En la infección con *T. cruzi* niveles altos de esta citocina y otras como IL-4 y TGF- β , han sido asociadas a una mayor susceptibilidad. En este trabajo se determinó la concentración en suero de IL-10 en ratones infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro y Ninoa. En la figura 14 (A) se muestran los niveles de IL-10 producidos durante las primeras 72 hrs posteriores a la infección de los dos grupos experimentales (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}). Como lo muestra la grafica no hubo diferencias significativas en la producción de esta citocina entre los ratones silvestres (MIF^{+/+}) y los ratones experimentales (MIF^{-/-}) infectados con la cepa Querétaro a excepción de las 12 hr. En la figura 14 (B) se observa que durante el transcurso de la infección no hubo diferencias significativas en la producción de IL-10 en los ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} infectados con *T. cruzi* cepa Ninoa.

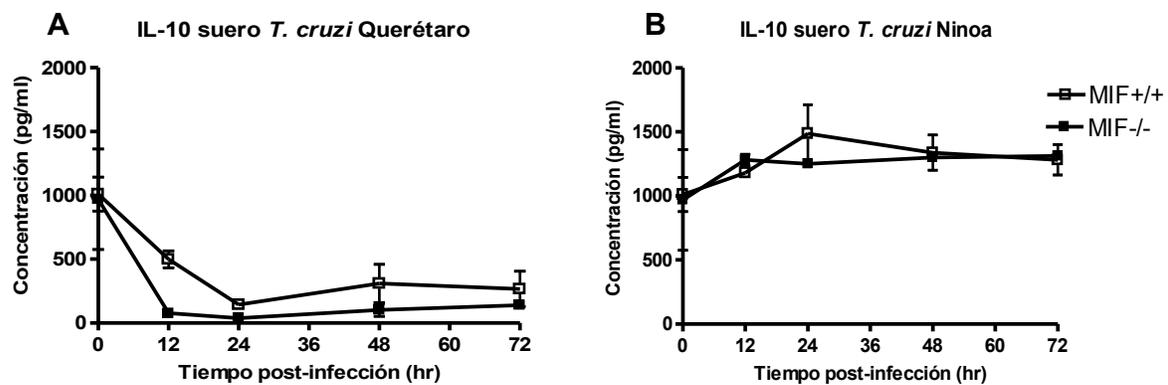


Fig. 14.- Producción de IL-10 de ratones MIF ^{+/+} y MIF ^{-/-} infectados con *T. cruzi* a excepción del primer tiempo no se observan diferencias significativas en la producción de esta citocina. (A) cepa Querétaro (B) cepa Ninoa. Los resultados son la media \pm 5 ratones por punto y representan un solo experimento con una *p < 0.05 considerada significativa por prueba de "t" de students (Graphpad Prism).

VII.6 DETERMINACION *IN VITRO* DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *T. cruzi*

VII.6.1 Citocinas proinflamatorias

Con el objetivo de determinar la producción de citocinas proinflamatorias *in vitro* en sobrenadante de cultivo de macrófagos, se sacrificaron ratones sanos de ambos grupos (MIF+/+ y MIF-/-), se obtuvieron células de la cavidad peritoneal y se purificaron macrófagos por adherencia, los cuales fueron infectados *in vitro* con el parásito *T. cruzi* cepa Querétaro o Ninoa, relación (1:10) es decir 10 parásitos por macrófago y se estimularon con 1ng/ml de interferón gamma recombinante (IFN- γ). Después de la infección se recuperaron los sobrenadantes a las 18 y 48 hr post-infección, donde se determinó la producción de IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6.

En la figura 14 puede apreciarse que los macrófagos de los ratones MIF-/- tuvieron disminuida la producción de IL-12 cuando se infectaron *in vitro* con *T. cruzi* (A) cepa Querétaro (B) cepa Ninoa comparado con los macrófagos de ratones MIF+/+ que si produjeron esta citocina. Adicionalmente, cuando los macrófagos de los ratones MIF-/- fueron infectados en presencia de IFN- γ , produjeron menor cantidad de IL-12, mientras que los macrófagos de ratones MIF+/+ produjeron niveles significativamente superiores de IL-12 comparados con los MIF-/- . Cabe hacer notar que la producción de IL-12 a las 18 hr fue despreciable sin diferencias entre grupos (datos no mostrados).

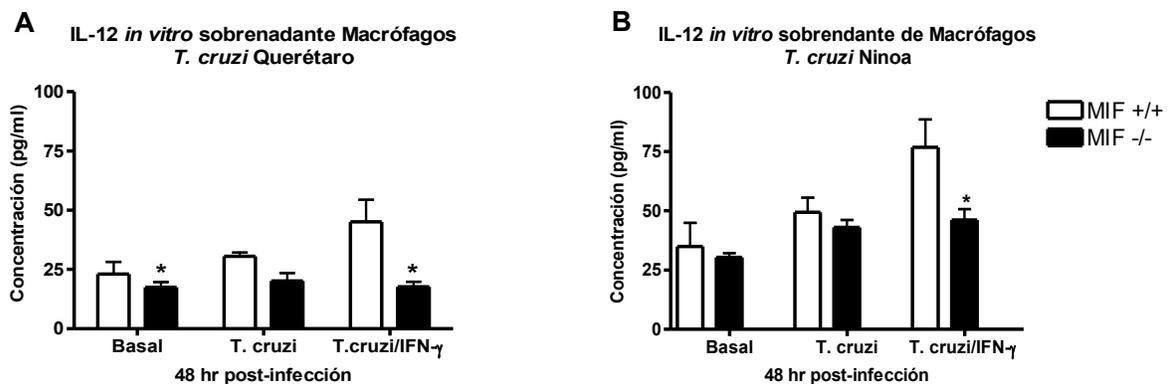


Fig. 15.- Nivel de IL-12 en sobrenadante de cultivo de macrófagos posterior al estímulo *in vitro* con IFN- γ . En las graficas podemos observar que a las 48 hr posteriores a la infección los macrófagos de ratones MIF-/-, no producen la misma cantidad de IL-12, que los macrófagos de ratones MIF+/+, aun después del estímulo con rMuIFN- γ . (A) cepa Querétaro (B) cepa Ninoa. Los

valores graficados son el promedio de 8 ratones de 2 experimentos independientes, *p <0.05 considerada significativa por prueba de “t” de students (Graphpad Prism).

En lo que concierne a la producción de TNF- α e IL-1 β , podemos observar que cuando los macrófagos de ratones MIF $^{-/-}$ fueron infectados *in vitro* con *T. cruzi*, en presencia de IFN- γ , tienen niveles disminuidos de TNF- α e IL-1 β , mientras que los macrófagos MIF $^{+/+}$ tuvieron un incremento significativo en la producción ambas citocinas (figuras 15 y 16). Por otro lado es importante mencionar que la producción de TNF- α como IL-1 β a las 18 hr post-infección fue despreciable (datos no mostrados).

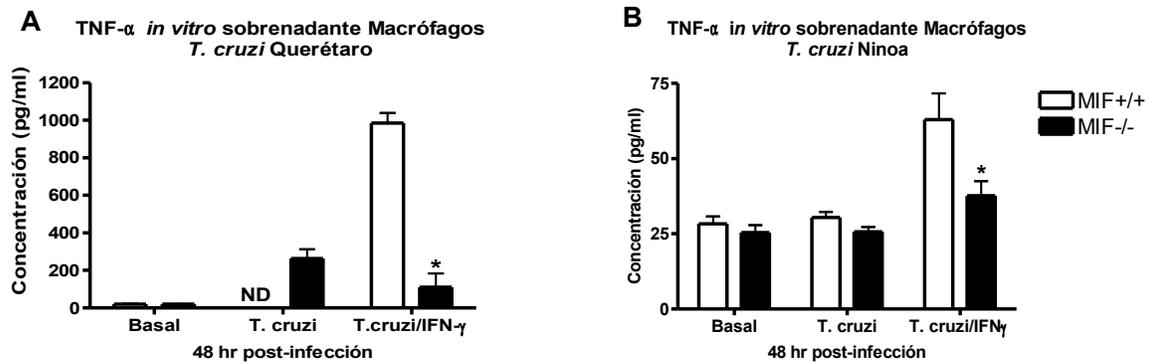


Fig. 16.- Producción de TNF- α en sobrenadante de cultivo de macrófagos de ratones MIF $^{-/-}$ y MIF $^{+/+}$ infectados con *T. cruzi*. Los macrófagos de ratones MIF $^{+/+}$ estimulados con IFN- γ producen una mayor cantidad de esta citocina a las 48 hr post-infección, en comparación con los macrófagos de ratones MIF $^{-/-}$. (A) cepa Querétaro (B) cepa Ninoa. Los valores son el promedio de de 10 ratones de 2 experimentos independientes estadísticamente significativos *p <0.05 considerada significativa por prueba de “t” de students (Graphpad Prism).

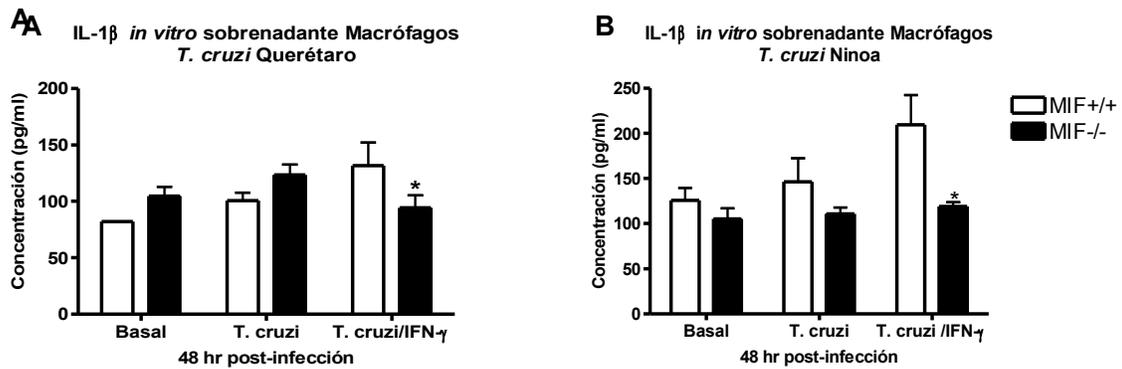


Fig. 17.- Producción de IL-1 β a las 48 hr post-infección en sobrenadante de cultivo de macrófagos de ratones MIF-/- y MIF+/+ infectados *in vitro* con *T. cruzi*. Los macrófagos de ratones MIF-/- estimulados con IFN- γ , tienen disminuida la producción de IL-1 β , en comparación con los macrófagos de los ratones MIF+/+. (A) cepa Querétaro (B) cepa Ninoa Los datos graficados son el promedio de 10 ratones de 2 experimentos independientes *p <0.05 considerada significativa por prueba de "t" de students (Graphpad Prism).

Por otro lado como se muestra en las figuras 18 y 19, no se observaron diferencias en la producción de IL-6 entre los macrófagos de ratones MIF+/+ y MIF-/-.

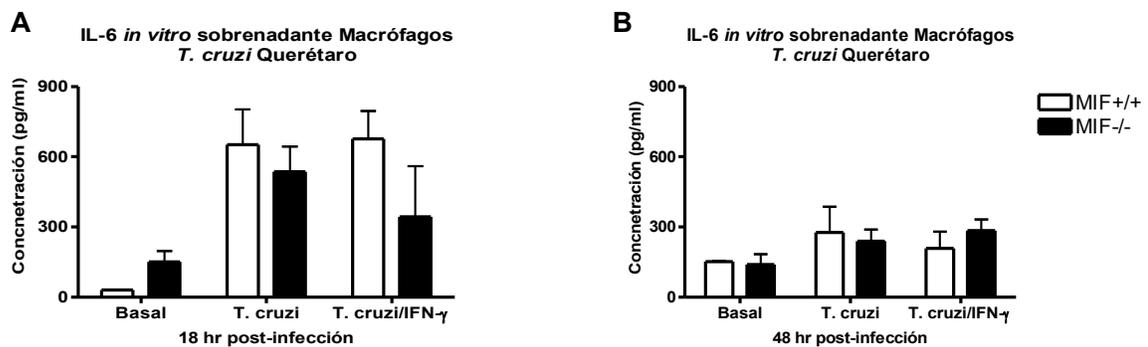


Fig. 18.- Producción de IL-6 en sobrenadante de macrófagos de ratones infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro estimulados con IFN- γ . No se observaron diferencias significativas en la

producción de IL-6 en macrófagos de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+}. (A) 18 hr post-infección (B) 48 hr post-infección. Los datos graficados pertenecen a 2 experimentos independientes estadísticamente no significativos por prueba de “t” de students (Graphpad Prism).

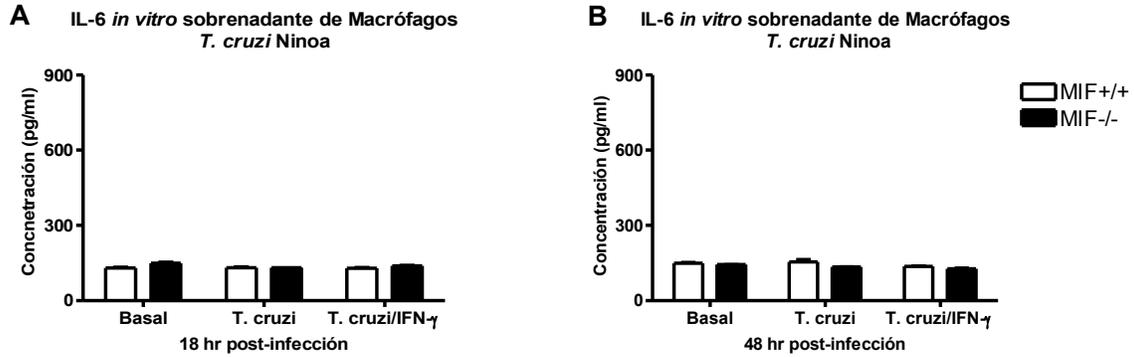


Fig. 19.- Niveles de IL-6 en sobrenadante de macrófagos de ratones infectados *in vitro* con *T. cruzi* cepa Ninoa estimulados con IFN- γ . No se observaron diferencias significativas en la producción de IL-6 en macrófagos de ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+}. (A) 18 hr post-infección (B) 48 hr post-infección. Los valores graficados son el promedio de 10 ratones de 2 experimentos independientes, estadísticamente no significativos por prueba de “t” de students (Graphpad Prism).

VII.7 Determinación del porcentaje de células (macrófagos) infectados con dos diferentes cepas de *T. cruzi*.

VII.7.1 Porcentaje de Infección

Con el objetivo de determinar el porcentaje y número de parásitos internalizados durante la infección *in vitro* en macrófagos peritoneales de ratones (MIF^{+/+} y MIF^{-/-}). Se realizó la tinción de células adheridas a los cubreobjetos de los cultivos *in vitro* de macrófagos (purificados de la cavidad peritoneal). La figura 20 (A) muestra el porcentaje de macrófagos infectados *in vitro* con *T. cruzi* cepa Querétaro, observando marcadas diferencias significativas en el porcentaje de infección ya que el 77 % de los macrófagos de ratones MIF^{-/-} se infectan, contra un 35% de infección en macrófagos de ratones MIF^{+/+}. Por otra parte en la figura 20 (B) Podemos observar que el 63% de los macrófagos de

ratones MIF^{-/-} se infectan con *T. cruzi* cepa Ninoa, contra un 29% de infección en los macrófagos de ratones MIF^{+/+}, observando una mayor susceptibilidad a la infección en los macrófagos deficientes para MIF, aún después de haber sido estimulados con IFN- γ .

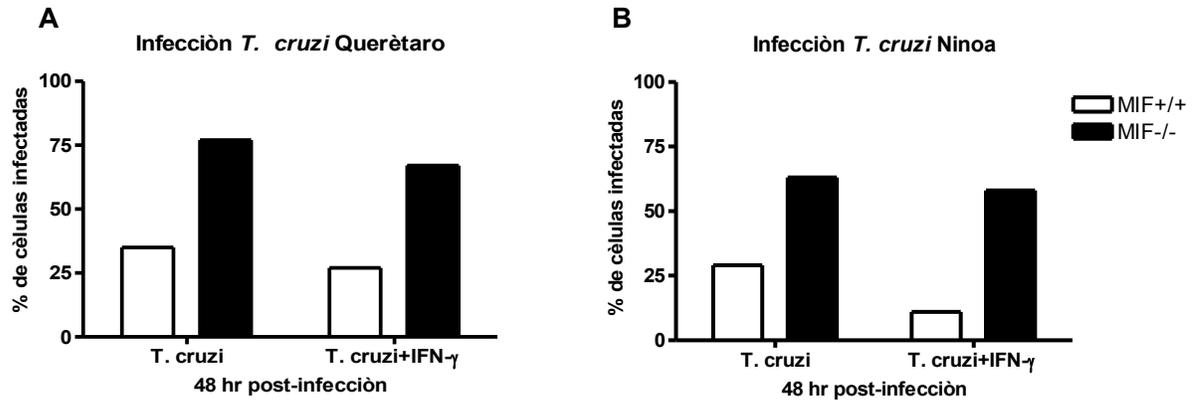


Fig. 20.- Porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}) con *T. cruzi* relación (1:10), los macrófagos de ratones MIF^{-/-} son mas susceptibles a la infección en comparación con los macrófagos de ratones MIF^{+/+} (A) 48 hr post-infección cepa Querétaro (B) 48 hr post-infección cepa Ninoa.

VII.7.2 Promedio de parásitos internalizados por célula.

Con el fin de determinar el número de parásitos internalizados por célula durante la infección *in vitro* de macrófagos de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}) relación 10 parásitos por macrófago, estimulados con 1ng de IFN- γ , se realizó una observación visual de 100 células por duplicado (metodología descrita anteriormente). Es importante resaltar que las gráficas muestran el promedio del total de las células contadas, ya que durante el conteo se observaron macrófagos con hasta 10 parásitos internalizados, así como macrófagos con uno sólo o ningún parásito. La figura 21 (A y B) muestran el promedio de parásitos por internalizados célula.

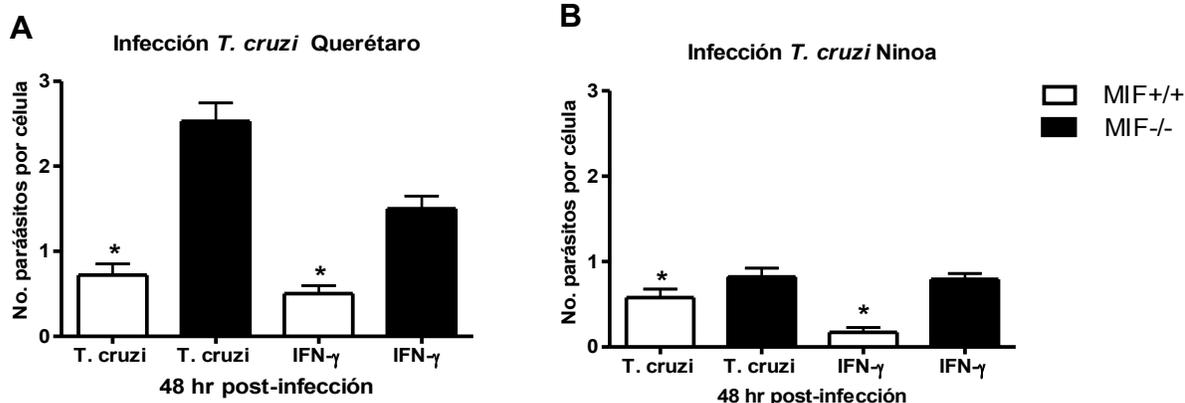


Fig. 21.- Promedio de parásitos internalizados por cada macrófago en cultivos de macrófagos peritoneales de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}), los macrófagos de ratones MIF^{-/-} son infectados con un número mayor de parásitos en comparación con los macrófagos de ratones MIF^{+/+}. (A) 48 hr post-infección cepa Querétaro (B) 48 hr post-infección cepa Ninoa. Los datos graficados son el promedio de 10 ratones de 2 experimentos independientes estadísticamente significativos con una *p <0.05 considerada significativa por prueba de “t” de students (Graphpad Prism).

VII.8 Producción de óxido nítrico (NO) en sobrenadante de cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneales.

De los sobrenadantes de macrófagos de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}) infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro o Ninoa, se determinó la producción de NO a las 18 y 48 hr post-infección ante un estímulo de 1ng/ml de IFN- γ . En la figura 22 (A y B) podemos observar que los macrófagos deficientes para MIF producen menor cantidad de NO durante la infección *in vitro* con la cepa Querétaro, comparada con los niveles producidos en los macrófagos de ratones MIF^{+/+}. Por otro lado, como se muestra en la figura 22 (C y D) los macrófagos de ratones MIF^{-/-} infectados con la cepa Ninoa tienen disminuida la producción de NO a pesar de haber sido estimulados con IFN- γ , en comparación son los niveles producidos por los macrófagos de ratones MIF^{+/+}.

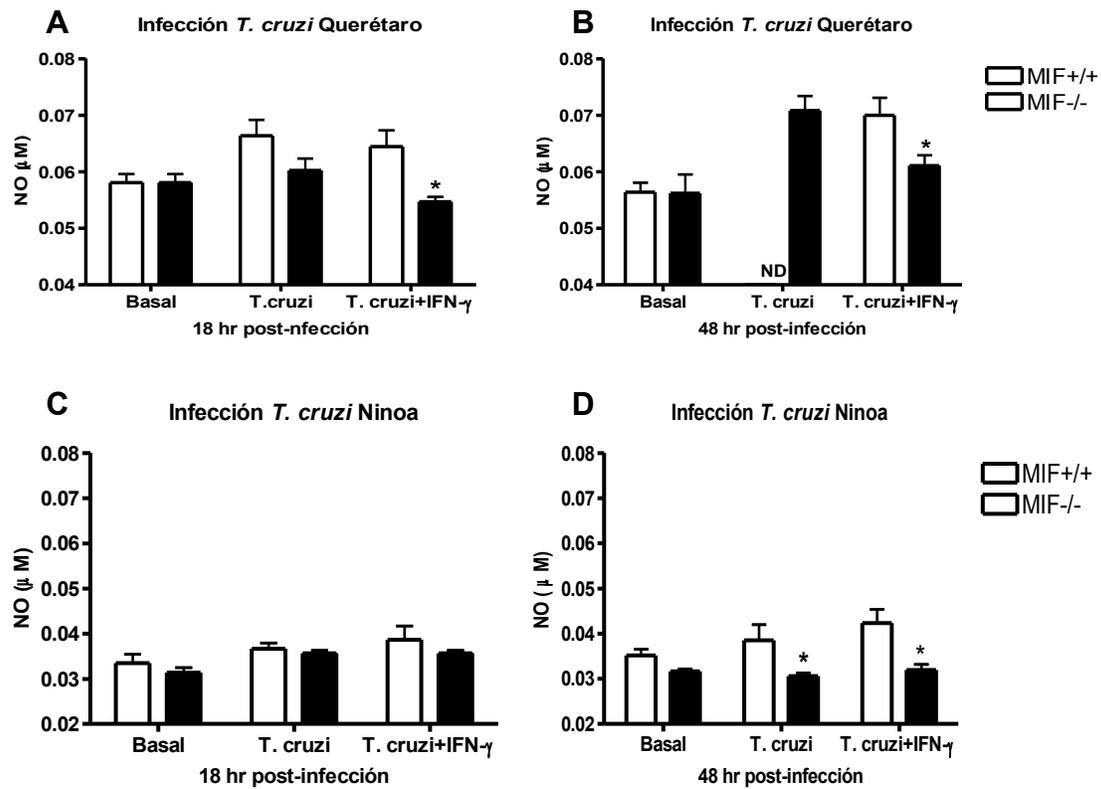


Fig.22.- Producción de óxido nítrico (NO) en sobrenadante de Macrófagos in vitro, las células de ratones MIF^{-/-} producen menor cantidad de NO comparado con los niveles producidos por los macrófagos de ratones MIF^{+/+}. (A) 18 hr post-infección cepa Querétaro (B) 48 hr post-infección cepa Querétaro (C) 18 hr post-infección cepa Ninoa (D) 48 hr post-infección cepa Ninoa. Los valores graficados son el promedio de 10 ratones de 2 experimentos independientes estadísticamente significativos *p < 0.05 considerada significativa por prueba de “t” de students (Graphpad Prism).

VIII. DISCUSIÓN

En un principio el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), había sido descrito como un producto de los linfocitos T activados en la hipersensibilidad de tipo retardada. Recientemente se sabe que es una molécula proinflamatoria multifuncional involucrada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes e inflamatorias .

A diferencia de las claras evidencias del papel de MIF en las enfermedades autoinmunes, su participación en la respuesta inmune a enfermedades parasitarias a penas está siendo reconocida. Recientemente se ha dilucidado que MIF participa de manera importante en el control de infecciones ocasionadas por *Leishmania major*, *Plasmodium chabaudi*, *P. falciparum*, *T. crassicep*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania major*. Sin embargo, en todos los casos aún falta establecer con mayor claridad de que manera, y a que nivel participa esta molécula en la respuesta inmune a estos parásitos .

Con el objetivo de incrementar el conocimiento acerca de la participación de MIF en la regulación de la respuesta inmune innata durante la infección experimental con *T. cruzi* se utilizó un modelo murino de infección. En este modelo se sabe que la respuesta de tipo proinflamatoria conocida también como (Th1) es de gran importancia para controlar la replicación del parásito a través de la producción de citocinas como IL-12, IFN- γ y TNF- α cuya regulación por MIF aún no ha sido bien establecida.

Después de haber infectado i.p. con una dosis de 5000 tripomastigotes de las cepas Querétaro y Ninoa de *Trypanosoma cruzi* a ratones deficientes para el gen que codifica para MIF (MIF^{-/-}) y a un grupo control de ratones (MIF^{+/+}), ambos con fondo genético BALB/c, se dio seguimiento al curso de la infección y de la respuesta inmune

innata en los primeros 60 días posteriores a la infección. Durante este tiempo se pudo observar que la capacidad para controlar la división del parásito en los ratones MIF^{-/-} infectados con la cepa Querétaro o Ninoa era deficiente, ya que estos ratones presentaron entre 2 y 4 veces más parásitos circulantes en sangre que los ratones MIF^{+/+}, respectivamente como se observó en las curvas de parasitemia (figura 8).

En cuanto al análisis de la curva de supervivencia de ratones infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro (virulencia media) y Ninoa (virulencia baja), observamos que a partir del día 21 y 32 post-infección respectivamente, los ratones MIF^{-/-} se mostraron altamente susceptibles a la infección con la cepa Querétaro muriendo el 64% comparado con un 34% de mortalidad de los ratones MIF^{+/+} infectados con la misma cepa, dentro de los primeros 35 días p.i. Por otro lado, a pesar de estar considerada a la cepa Ninoa como una cepa de baja virulencia, observamos los ratones MIF^{-/-} infectados con *T. cruzi* Ninoa, el 50 % sucumbió ante la infección mientras que el 100% de los ratones MIF^{+/+} sobrevivió a la infección; esto nos hace suponer que aparentemente algo ocurre en los ratones MIF^{-/-} durante la respuesta inmune innata que hace que pierdan la capacidad para controlar la replicación del parásito, ya que en estos días es evidente la diferencia en el número de parásitos entre los ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} (figura 7). Además cabe mencionar que la diferencia observada entre el porcentaje de mortalidad entre las dos cepas de *T. cruzi* empleadas para la infección correlaciona con el hecho de que los ratones infectados con la cepa Querétaro presentaron una mayor carga parasitaria en comparación con los ratones infectados con la cepa Ninoa.

Numerosos estudios acerca de los mecanismos moleculares empleados por el parásito *T. cruzi* para la invasión de células mamíferas hospederas, sugieren que la habilidad de los tripomastigotes metacíclicos procedentes de distintas cepas de *T. cruzi* está determinada por la expresión diferencial de un grupo de glicoproteínas (gp) de superficie, tales como gp90, gp 35/50 y gp82, las cuales son moléculas capaces de inducir la señalización de Ca⁺⁺ en la célula blanco, el cual es necesario durante el proceso de adhesión. Se ha visto que los tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* de cepas pobremente infectivas expresan gp90 y gp35/50, mientras que las cepas altamente infectivas expresan gp82 .

Recientemente se describió que el ligando encontrado en los macrófagos de humanos para la proteína gp93 secretada por *T. cruzi* facilita la internalización del parásito a las células del hospedero utilizando la vía de las MAP cinasas, específicamente manteniendo la fosforilación de ERK1 y ERK2 . Este mismo proceso de fosforilación es realizado también por MIF , entonces, en los ratones deficientes para MIF (MIF^{-/-}), podríamos esperar una disminución en la internalización del parásito al inicio de la infección y por lo tanto disminución o igualdad en el nivel de parasitemia en los ratones MIF^{-/-}; sin embargo este hecho no se observó. Esta observación sugiere que esta vía de internalización no es tan importante como se ha sugerido y posiblemente sea de mayor importancia la vía de reclutamiento de lisosomas para la internalización del parásito .

Por otro lado, las citocinas proinflamatorias IL-12, IFN- γ y TNF- α desempeñan un papel importante como factores que participan en el control inicial de la infección, particularmente éstas, a través de la activación de macrófagos . Para evaluar la posible alteración en la producción de estas citocinas en nuestro modelo, se realizaron determinaciones durante las primeras 72 hr posteriores a la infección. Se encontró que durante estas primeras 72 hr post-infección, este tipo de respuesta en el grupo de ratones MIF^{-/-} infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro o Ninoa, se encuentra abatida por la poca producción de IL-12, IFN- γ y TNF- α (figuras 9, 10 y 11). Estos resultados sugieren que MIF es necesario para una respuesta rápida en la producción de este tipo de citocinas proinflamatorias, ya que la ausencia de MIF limita drásticamente la aparición de la respuesta proinflamatoria.

El monitoreo de las primeras 72 hr posteriores a la infección nos permitió dilucidar parcialmente la explicación respecto a la susceptibilidad presente en los ratones MIF^{-/-}, ya que nuestros datos coinciden con resultados previos, donde se ha visto que en control en la replicación del parásito durante la etapa temprana de la infección es determinante para el resto de la misma . En esta etapa temprana los ratones MIF^{-/-} no lograron alcanzar los mismos niveles en la producción de IL-12, IFN- γ y TNF- α , en suero en comparación con los ratones MIF^{+/+}.

Por otra parte, está claramente establecido que las células de la respuesta inmune innata como los macrófagos y las células NK son las primeras en tener contacto con el parásito, y que además son las responsables de iniciar la respuesta inmune a

través del reconocimiento de uno de los principales antígenos de *T. cruzi* (GPI) a través de los receptores tipo toll 2, y 9 (TLR2 y TLR9), que junto con la vía de señalización dependiente de MyD88, cooperan en el control de la replicación del parásito a través de la activación de los macrófagos y la consecuente producción de citocinas proinflamatorias tales como IL-12, IFN- γ y TNF- α , implicadas en el control inicial del parásito . Con base en estas observaciones es posible que la producción inicial de IL-12, IFN- γ , pudiera ser debido a que la carencia de MIF, tenga como consecuencia una posible disminución en la expresión de TLR2 y TLR9.

Por otra parte, Oliveira *et al* en el 2004 reportaron el importante papel del receptor tipo toll 4 (TLR4) para la expresión de una respuesta proinflamatoria *in vivo* en respuesta al Glycoinositolfosfolipido (GIPL) otro antígeno de *T. cruzi*, así como para la activación del factor de transcripción NF-kB, ya que en su trabajo encontraron que ratones C3H/HeJ mutados para TLR4 mostraban defectos en su capacidad para controlar la replicación del parásito en etapas tempranas de la infección y además presentaban una alta mortalidad en comparación con los ratones silvestres de la misma cepa . En recientes trabajos se ha visto que MIF regula la respuesta inmune innata a través de la modulación de TLR4 y que la deficiencia en la expresión de esta receptor conlleva a una reducción en la actividad de NF-kB y la producción de TNF- α . Hechos que nos llevan a suponer que la expresión de TLR4 en los ratones MIF-/- se encuentra disminuida como consecuencia de la ausencia de MIF .

En lo que concierne a la producción de IL-1 β en suero (figura 12), de ratones infectados con *T. cruzi* cepa Querétaro o Ninoa, encontramos que los ratones MIF-/- tuvieron disminuida la producción de esta citocina a lo largo de las 72 hr posteriores a la infección en comparación con los niveles producidos por los ratones MIF+/+. La carencia de esta citocina sugiere junto con otros reportes, que existe una relación muy cercana entre MIF y esta citocina sugiriendo una posible regulación específica de MIF sobre IL-1 β . En trabajos anteriores se ha reportado que la caspasa 1 (ICE) es esencial para la maduración y secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-18 , por lo cual nosotros sugerimos realizar estudios que permitan averiguar una posible regulación por parte de MIF sobre esta enzima.

Por otra parte, con el fin de confirmar que la disminución en la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-1 β , estaban en asociación directa con la ausencia de MIF, se decidió medir la producción de esta citocina en suero. Como era de esperarse los ratones MIF $^{-/-}$ no produjeron esta citocina. Por el contrario, los ratones MIF $^{+/+}$ presentaron niveles incrementados de MIF tras la infección con *T. cruzi*. Resultó más que interesante observar una producción diferencial en MIF entre las dos cepas de *T. cruzi* empleadas para la infección, ya que como se muestra en la figura 13 (A y B), los ratones MIF $^{+/+}$ infectados con la cepa Querétaro producen niveles significativamente más altos desde el inicio de la infección en comparación con los ratones MIF $^{+/+}$ infectados con la cepa Ninoa, que muestran un ligero incremento a las 72 hr post-infección. Esta observación podría explicar por que los ratones MIF $^{+/+}$ infectados con Querétaro desarrollan mayores niveles de citocinas proinflamatorias que los MIF $^{+/+}$ infectados con Ninoa, es decir, a mayores niveles de MIF hay mayores niveles de citocinas proinflamatorias. Esto parece no estar de acuerdo con la hipótesis de que: las citocinas proinflamatorias confieren protección al hospedero contra la infección de *T. cruzi*, ya que la mayor producción de MIF y citocinas proinflamatorias la observamos en la cepa de mayor virulencia (Querétaro) asociada a mayor número de casos de mortalidad. Sin embargo es posible que la mortalidad en realidad este en asociación directa con la respuesta proinflamatoria exacerbada más que al parásito por si mismo. Cual también explicaría por que la cepa de menor virulencia (Ninoa), donde no hay casos de mortalidad los niveles de MIF y citocinas proinflamatorias fueron menores.

Sin lugar a dudas, MIF parece tener una importante participación en el control del crecimiento parasitario de *T. cruzi* a través de la inducción de citocinas proinflamatorias, dado que la ausencia total de este genera una mayor carga parasitaria y mortalidad, como ya se ha descrito anteriormente tanto en la infección por *Leishmania* o por *Taenia crassiceps*. Sin embargo se requiere de un balance delicado entre la respuesta proinflamatoria y la anti-inflamatoria para la sobrevivencia del hospedero. Coincidiendo con los niveles disminuidos de IL-10 observados en Querétaro.

Se han publicado numerosos reportes afirmando que durante la infección causada por *T. cruzi* la respuesta proinflamatoria es la que confiere resistencia, y que por el contrario, la respuesta de tipo Th2 se asocia a la susceptibilidad. Así que con el objetivo

de establecer si la mayor susceptibilidad observada en los ratones MIF^{-/-} se asociaba a un perfil de citocinas tipo Th2 como IL-4 e IL-10, se decidió medir la producción de IL-10. Sin embargo, no se observaron diferencias en la producción de esta citocina (figura 14), descartando la posibilidad de que un exceso en la producción de esta citocina estuviera asociada a dicha susceptibilidad.

En esta primera parte pudimos establecer que la deficiencia de MIF afecta directamente la producción a nivel sistémico de citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ), a tiempos muy tempranos post-infección con *T. cruzi*; y que este fenómeno se ve reflejado en una mayor carga parasitaria y mortalidad. Los resultados obtenidos en nuestra investigación coinciden con reportes previos donde se ha observado que la producción de citocinas proinflamatorias en la etapa temprana es determinante en la infección causada por *T. cruzi*.

Dado que los macrófagos son una de las células de la primera línea de defensa en la respuesta inmune innata, nos dimos a la tarea de investigar la participación de MIF en la producción de citocinas proinflamatorias. Para tal fin hicimos cultivos de macrófagos infectados *in vitro* con dos cepas *T. cruzi*.

Se sabe que durante la infección por *T. cruzi*, el parásito por si solo es capaz de inducir una respuesta proinflamatoria rápida, mediante el reconocimiento y procesamiento de sus diferentes antígenos a través de los diferentes tipos de receptores como TLR's, de manosa, y lectinas expresados en la superficie de los macrófagos, iniciando así una cascada de señalización y la consecuente producción de citocinas proinflamatorias.

De la figura 15 a 17 podemos observar la cinética de producción de citocinas proinflamatorias a las 18 y 48 horas posteriores a la infección *in vitro* con trypomastigotes de *T. cruzi* utilizando dos cepas, Querétaro de virulencia media y Ninoa de virulencia baja, en sobrenadante de cultivo de macrófagos peritoneales de ratones sanos relación (1:10), estimulados con 1ng/ml de interferón-gamma recombinante (IFN- γ r). Como lo muestran las figuras, encontramos que la producción de citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α e IL-1 β se hace de manera diferencial, es decir no todas de la misma manera ni con la misma intensidad, ya que observamos que la producción de IL-12 incrementa a partir de la 48 hr posteriores a la infección, a diferencia de TNF- α , donde se

observan diferencias desde las 18 horas. En cuanto a la producción de IL-1 β , no se observa incremento en su producción sin embargo se mantiene. Lo que es importante resaltar es que los macrófagos de ratones MIF^{-/-} infectados *in vitro* con *T. cruzi* cepa Querétaro o Ninoa tienen disminuida la producción de estas citocinas aun después de haber sido estimulados con la (IFN- γ).

En lo que respecta a la producción de IL-6 no se observaron diferencias significativas en producción de esta citocina (figuras 18 y 19). En conjunto estos resultados nos sugieren que la ausencia de MIF afecta de manera importante la producción *in vitro* de estas citocinas.

Por otra parte, en las figuras 20 y 21, podemos observar que durante la infección *in vitro* con dos cepas de *T. cruzi*, los macrófagos de ratones MIF^{-/-}, infectados con la cepa Querétaro virulencia media o Ninoa virulencia baja, tuvieron mayor porcentaje de internalización y número de parásitos por célula, aun después de haber sido estimulados con (IFN- γ). Estos resultados correlacionaron con una disminución en la producción de óxido nítrico (NO) a las 18 y 48 horas posteriores a la infección en comparación con los macrófagos MIF^{+/+} (figura 22).

Se sabe que IFN- γ es una citocina clave involucrada en la respuesta inmune a la infección causada por *T. cruzi*, y se ha visto que tanto *in vivo* como *in vitro* esta participa en la activación de los mecanismos microbicidas de los macrófagos induciendo la síntesis de la enzima sintasa de óxido nítrico (iNOS) y la producción de óxido nítrico (NO), molécula encargada de la eliminación parásitos .

Estudios realizados con ratones deficientes para el receptor de IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}) e (iNOS^{-/-}) se ha visto una marcada incapacidad para sobrevivir a la infección aguda causada por *T. cruzi* con similares cinéticas de parasitemia y mortalidad, demostrando la importancia de IFN- γ e iNOS en la regulación de las funciones efectoras del óxido nítrico para resistir a la infección aguda causada por *T. cruzi* .

Por otro lado, un estudio realizado en macrófagos humanos tratados previamente con recombinante IFN- γ y TNF- α se observó un incremento significativo en su actividad tripanosida. Además se observó que TNF- α sinergiza con IFN- γ sobre la activación de

macrófagos sin embargo IFN- γ mostró mayor capacidad para inducir la producción de óxido nítrico en macrófagos, estos resultados sugirieron que tanto IFN- γ como TNF- α están involucrados en la activación de los mecanismos tripanocidas en macrófagos humanos a través de un mecanismo dependiente de óxido nítrico .

Murray y colaboradores en 1985 utilizando un modelo murino demostraron que la activación *in situ* de macrófagos peritoneales por (rMuIFN- γ) favorecía la actividad leishmanicida *in vitro* contra amastigotes de *Leishmania donovani* . Por su parte, Reed A.G en 1988 reportó que después de una dosis intraperitoneal *in vivo* de 10 μ g de (rMuIFN- γ) a ratones sanos, los macrófagos obtenidos de la cavidad peritoneal de estos eran cultivados e infectados *in vitro* con *T. cruzi*, mostraron un incremento en su capacidad para inhibir el desarrollo intracelular del parásito hasta en un 100%, en comparación con el grupo control el cual fue tratado con solución salina, dicha capacidad fue correlacionada con un incremento en la actividad del estallido respiratorio .

Por otro lado, también se ha reportado que macrófagos peritoneales infectados *in vitro* con *Salmonella typhiparum*, preincubados con 10^2 a 10^3 U (rMuIFN- γ) por ml, presentaban un incremento en su capacidad para eliminar a esta bacteria a las 12 y 48 horas posteriores a la infección, asociado con el incremento en la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) alcanzando su pico máximo a las 72 horas .

Dado que los macrófagos derivados de ratones MIF-/- fueron más susceptibles a la infección *in vitro* con trypomastigotes de *T. cruzi*, dicha susceptibilidad se asoció a niveles disminuidos de citocinas proinflamatorias, podemos decir que la expresión funcional MIF es esencial para la activación de los macrófagos y que la ausencia de MIF posiblemente afecte la activación de células NK, dendríticas y posiblemente la expresión de receptores involucrados en el reconocimiento de antígenos de *T. cruzi*, como manosa, TLR 2, 4 y 9 e IFN- γ (figura 24).

Adicionalmente resultó más que interesante observar que hubo un comportamiento diferencial entre los macrófagos infectados *in vitro* con *T. cruzi* cepa Querétaro y cepa Ninoa. Como ya se mencionó anteriormente la cepa Querétaro es de virulencia media, mientras que la cepa Ninoa es de virulencia baja, y es de llamar la atención que los macrófagos infectados con la cepa Querétaro produjeran niveles más altos de citocinas

proinflamatorias que los infectados con la cepa Ninoa, sugiriendo entonces que aún cuando las citocinas proinflamatorias son importantes para contener la replicación del parásito, pueden resultar dañinas al hospedero y llevarlo a la muerte, lo que explicaría la mayor mortalidad murina asociada a la cepa Querétaro (figura 23) .

Diferencias observadas entre las dos cepas de *T. cruzi* empleadas en la infección *in vivo* en ratones silvestres MIF+/+.

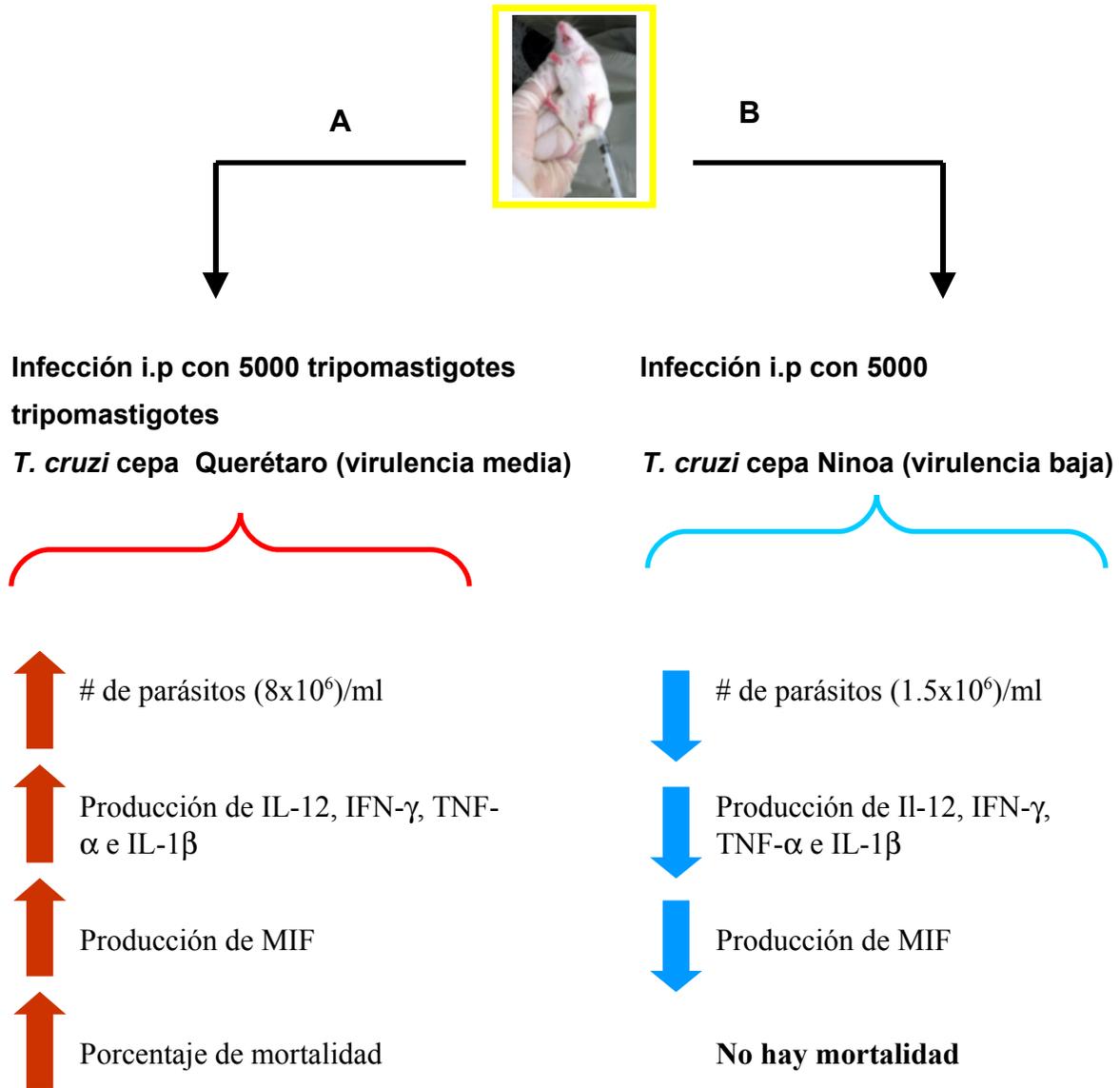


Figura 23.- Comportamiento de los ratones silvestres (MIF+/+) infectados con las dos cepas de *T. cruzi*. (A) infección con *T. cruzi* Querétaro (virulencia media), presentan una mayor carga parasitaria y mortalidad así como una mayor producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y MIF). (B) infección con *T. cruzi* Ninoa (virulencia baja), no se observó mortalidad, su carga parasitaria fue menor, al igual que la producción de citocinas proinflamatorias (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β y MIF), es importante resaltar que aun cuando se sabe que este tipo de citocinas son

importantes para contener la infección, un exceso puede resultar dañino para el hospedero llevándolo a la muerte, lo que explicaría la mayor mortalidad murina asociada a la cepa Querétaro.

Participación de MIF en la respuesta inmune innata en la infección por *T. cruzi*.

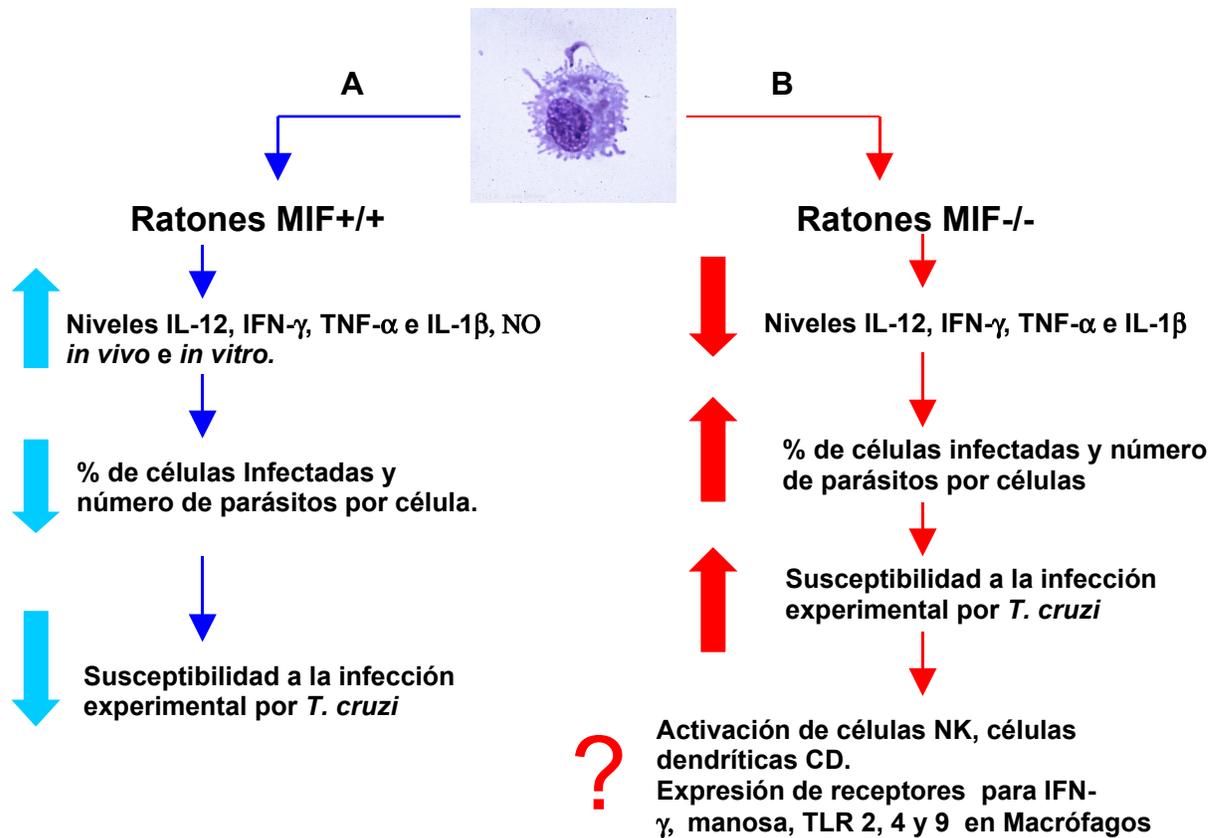


Figura.- 24. (A) Los ratones Balb/c (MIF+/+) infectados con *T. cruzi*, se favorece la producción tanto *in vivo* como *in vitro* de citocinas proinflamatorias IL-12, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , este último implicado en la activación de los mecanismos microbicidas de macrófagos como es la producción de óxido nítrico (NO), molécula encargada del aniquilamiento del parásito, en conjunto podemos observar la importante participación de MIF para estimular la producción de estas citocinas y NO, implicadas en el control de la replicación del parásito, el cual se ve reflejado en un menor porcentaje de células infectadas y número de parásitos por célula. (B) Por el contrario la marcada susceptibilidad de los ratones Balb/c (MIF-/-) infectados con *T. cruzi*, ya que presentaron un mayor número de parásitos y células infectadas asociado a los niveles disminuidos en la producción de

citocinas proinflamatorias y NO. Demostrando de esta manera que MIF participa de manera importante durante la infección experimental por *T. cruzi*, y que posiblemente la ausencia de este gen interfiera en la activación de otro tipo de células como NK, dendríticas o quizás en la expresión de receptores para IFN- γ , manosa, TLR 2, 4 y 9 en macrófagos.

IX. CONCLUSIONES

- Independientemente de la cepa utilizada de *T. cruzi* los ratones MIF^{-/-} son más susceptibles a la infección.
- MIF participa de manera importante para controlar la replicación del parásito durante la fase aguda en la enfermedad de chagas experimental.
- La susceptibilidad incrementada en los ratones MIF^{-/-} se debe a su incapacidad de producir citocinas proinflamatorias (IL-12, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) en la respuesta inmune innata asociadas con la resistencia a *T. cruzi*.
- MIF participa en la regulación de IL-12, TNF- α e IL-1 β durante la infección *in vitro* con *T. cruzi*.
- La cepa de *T. cruzi* Querétaro induce una mayor cantidad de citocinas proinflamatorias que la cepa de *T. cruzi* Ninoa.

X. REFERENCIAS

1. Abbas AK. Cellular and molecular Immunology 2003.
2. Hernández-Urzúa MA. Interleucinas e inmunidad innata. Rev Biomed 2001;12(4):272-80.
3. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. J Exp Med 1994;179(6):1895-902.
4. Shimizu T, Abe R, Nishihira J, *et al.* Impaired contact hypersensitivity in macrophage migration inhibitory factor-deficient mice. Eur J Immunol 2003;33(6):1478-87.
5. Denkiner CM, Metz C, Fingerle-Rowson G, Denkiner MD, Forsthuber T. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 2004;52(6):389-400.
6. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. Nat Rev Immunol 2003;3(10):791-800.
7. Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. Microbes Infect 2002;4(4):449-60.
8. Leng L, Metz CN, Fang Y, *et al.* MIF signal transduction initiated by binding to CD74. J Exp Med 2003;197(11):1467-76.
9. Dewor M, Steffens G, Krohn R, Weber C, Baron J, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes fibroblast migration in scratch-wounded monolayers in vitro. FEBS Lett 2007;581(24):4734-42.
10. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. Nat Med 2007;13(5):587-96.
11. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. J Exp Med 1999;189(2):341-6.
12. Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. Scand J Infect Dis 2003;35(9):573-6.
13. Weiser WY, Pozzi LM, David JR. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. J Immunol 1991;147(6):2006-11.
14. Martiney JA, Sherry B, Metz CN, Espinoza M, Ferrer AS, Calandra T, Broxmeyer HE, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. Infect Immun 2000;68(4):2259-67.
15. Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. Faseb J 2003;17(15):2221-30.
16. Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. Cancer 2005;103(3):588-98.
17. Bucala R, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. Immunity 2007;26(3):281-5.

18. Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 2002;30(1 Supp):S27-S35.
19. Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med* 1996;183(1):277-82.
20. Chaiyaroj SC, Rutta AS, Muenthaisong K, Watkins P, Na Ubol M, Looareesuwan S. Reduced levels of transforming growth factor-beta1, interleukin-12 and increased migration inhibitory factor are associated with severe malaria. *Acta Trop* 2004;89(3):319-27.
21. Koebernick H, Grode L, David JR, Rohde W, Rolph MS, Mittrucker HW, Kaufmann SH. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(21):13681-6.
22. Matsui Y, Okamoto H, Jia N, Akino M, Uede T, Kitabatake A, Nishihira J. Blockade of macrophage migration inhibitory factor ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37(2):557-66.
23. Murakami H, Akbar SM, Matsui H, Horiike N, Onji M. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2002;128(3):504-10.
24. Satoskar AR, Bozza M, Rodriguez Sosa M, Lin G, David JR. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect Immun* 2001;69(2):906-11.
25. Rodriguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 2003;71(3):1247-54.
26. Awandare GA, Ouma C, Keller CC, *et al.* A macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphism is associated with high-density parasitemia in children with malaria. *Genes Immun* 2006;7(7):568-75.
27. Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2006;74(6):3170-9.
28. Boros DL, Warren KS, Pelley RP. The secretion of migration inhibitory factor by intact schistosome egg granulomas maintained in vitro. *Nature* 1973;246(5430):224-6.
29. Stavitsky AB, Metz C, Liu S, Xianli J, Bucala R. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum*-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. *Parasite Immunol* 2003;25(7):369-74.
30. Lopez-Olmos V, Perez-Nasser N, Pinero D, Ortega E, Hernandez R, Espinoza B. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1998;69(3):239-54.
31. Brener Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. *Pharmacol Ther* 1979;7(1):71-90.
32. Dias E, Laranja FS, Miranda A, Nobrega G. Chagas' disease; a clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation* 1956;14(6):1035-60.
33. Zingales B, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1985;117:129-52.
34. Denkers EY, Butcher BA. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol* 2005;21(1):35-41.

35. Andrews NW. Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J Cell Biol* 2002;158(3):389-94.
36. Sacks D, Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nat Immunol* 2002;3(11):1041-7.
37. Bogdan C, Rollinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today* 1999;15(1):22-8.
38. Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001;414(6866):920-4.
39. Campos MA, Gazzinelli RT. *Trypanosoma cruzi* and its components as exogenous mediators of inflammation recognized through Toll-like receptors. *Mediators Inflamm* 2004;13(3):139-43.
40. Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruda LB, *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 2004;173(9):5688-96.
41. Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 2006;177(6):3515-9.
42. Une C, Andersson J, Orn A. Role of IFN-alpha/beta and IL-12 in the activation of natural killer cells and interferon-gamma production during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 2003;134(2):195-201.
43. Lodoen MB, Lanier LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2006;18(4):391-8.
44. Korbel DS, Finney OC, Riley EM. Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *Int J Parasitol* 2004;34(13-14):1517-28.
45. Petray P, Rottenberg ME, Grinstein S, Orn A. Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* 1994;16(4):193-9.
46. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 2000;12(1):64-76.
47. Gomez-Garcia L, Alejandre-Aguilar R, Aranda-Fraustro A, Lopez R, Monteon VM. Description of inflammation and cytokine profile at the inoculation site and in heart tissue of mice re-infected with *Trypanosoma cruzi* vector derived-metacyclic trypomastigotes. *Parasitology* 2005;130(Pt 5):511-22.
48. Magalhaes-Santos IF, Andrade SG. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(5):555-61.
49. Giordanengo L, Guinazu N, Stempin C, Fretes R, Cerban F, Gea S. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *Eur J Immunol* 2002;32(4):1003-11.
50. Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. *Trends Parasitol* 2002;18(6):272-8.
51. Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(1):1-12.
52. Mathieu-Daude F, Bosseno MF, Garzon E, Lelievre J, Sereno D, Ouaisi A, Breniere SF. Sequence diversity and differential expression of Tc52 immuno-regulatory protein in *Trypanosoma cruzi*: potential implications in the biological variability of strains. *Parasitol Res* 2007;101(5):1355-63.

53. Hall BS, Tam W, Sen R, Pereira ME. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Mol Biol Cell* 2000;11(1):153-60.
54. Liang Y, Zhou Y, Shen P. NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cell Mol Immunol* 2004;1(5):343-50.
55. Liou HC. Regulation of the immune system by NF-kappaB and IkappaB. *J Biochem Mol Biol* 2002;35(6):537-46.
56. Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991;19(15):4293.
57. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
58. Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* 1996;64(1):128-34.
59. Abrahamssohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* 1996;84(2):231-44.
60. Cardoni RL, Antunez MI, Abrami AA. [TH1 response in the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*]. *Medicina (B Aires)* 1999;59 Suppl 2:84-90.
61. Ruiz RC, Favoreto S, Jr., Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *Biochem J* 1998;330 (Pt 1):505-11.
62. Yoshida N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *trypanosoma cruzi*. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 2006;78(1):87-111.
63. Villalta F, Zhang Y, Bibb KE, Burns JM, Jr., Lima MF. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249(1):247-52.
64. Antunez MI, Cardoni RL. IL-12 and IFN-gamma production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental + infections. *Immunol Lett* 2000;71(2):103-9.
65. Lieke T, Graefe SE, Klauenberg U, Fleischer B, Jacobs T. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infect Immun* 2004;72(12):6817-25.
66. Lan HY, Bacher M, Yang N, *et al.* The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med* 1997;185(8):1455-65.
67. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev* 2003;193:10-21.
68. Kumar S, Tarleton RL. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* 2001;166(7):4596-603.
69. Michailowsky V, Silva NM, Rocha CD, Vieira LQ, Lannes-Vieira J, Gazzinelli RT. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol* 2001;159(5):1723-33.
70. Rodriguez M, Terrazas LI, Marquez R, Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol* 1999;21(4):177-85.

71. Tarleton RL, Grusby MJ, Zhang L. Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 2000;165(3):1520-5.
72. Stafford JL, Neumann NF, Belosevic M. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. *Crit Rev Microbiol* 2002;28(3):187-248.
73. Black CM, Catterall JR, Remington JS. In vivo and in vitro activation of alveolar macrophages by recombinant interferon-gamma. *J Immunol* 1987;138(2):491-5.
74. Une C, Andersson J, Eloranta ML, Sunnemark D, Harris RA, Orn A. Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN-gamma) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin Exp Immunol* 2000;121(3):499-505.
75. Holscher C, Kohler G, Muller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun* 1998;66(3):1208-15.
76. Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992;33(1):35-40.
77. Murray HW, Spitalny GL, Nathan CF. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J Immunol* 1985;134(3):1619-22.
78. Reed SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol* 1988;140(12):4342-7.
79. Kagaya K, Watanabe K, Fukazawa Y. Capacity of recombinant gamma interferon to activate macrophages for *Salmonella*-killing activity. *Infect Immun* 1989;57(2):609-15.

XI. APÉNDICE 1

Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) para 10 Lts y pH 7.4

80 gr Na Cl (J.T Baker)

11.6 gr Na₂PO₄ (J.T Baker)

2 gr KH₂PO₄ (J.T Baker)

2 gr KCl (ICN Biomedicals Inc.)

Buffer de lisis (Laird W. P. et al. 1991 Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research Vol. 19 Num 15, 4293).

200 mM NaCl (J.T Baker)

5mM de Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) (J.T Baker)

0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS) (J.T Baker)

100mM Tris HCl, pH 8.5 (ICN Biomedicals Inc.)

Aforar a 1 Lt con agua destilada

Solución hemolizante

Tris base 0.17 M (ICN Biomedicals Inc.)

NH₄Cl 0.16 M (J.T Baker)

Se prepara para 300 ml.

Buffer TBE 10x

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals)

Ácido Bórico (890mM) (J.T Baker)

40 ml de 0.5 M Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) disódico (J.T Baker)

Se ajusta todo a pH 8.0 Y se afora a 500 ml. Con agua destilada

Buffer de pegado (ELISA)

0.1 M de Na₂HPO₄ (J.T Baker)

Para 1 Lt con agua destilada.

Solución de lavado (ELISA)

1000 ml de PBS más 0.5% Tween 20 (Promega co.)

Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1% de Albumina serica bovina (ICN Biochemicals)

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biochemicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11 ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70 °C.

APÉNDICE 2

Gen	Secuencias	Producto	T alineación	ciclos
MIF	(F) AgACCACgtgCtTAgCTgAg (R) gCATCgCTACCggTggATAA	200 pb	60 ° C	35
NEO	(F) ATTgAACAAgATggATTgCAC (R) CgTCCAgATCATCCTgATC	500 pb	60 ° C	35