



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

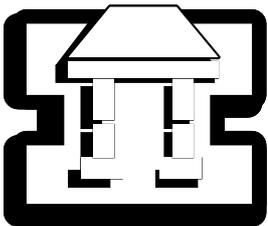
---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE CELULAS  
DENDRITICAS EXPUESTAS A ANTIGENOS  
DE *Taenia crassiceps***

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G O**  
**P R E S E N T A :**  
**CESAR AUGUSTO TERRAZAS ALDUCIN**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES**



**LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO**

**-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.

**Agradecimientos:**

Al Dr. Luis I. Terrazas por aceptarme en su equipo de investigación.

A la M. en C. Irma Rivera y al Biol. José Luis Reyes, por el soporte técnico.

A la Dra. Lorena Gómez, por la donación de los antígenos deglicosilados.

A los integrantes de la comisión dictaminadora, por sus opiniones.

## ÍNDICE

1.	<b>RESUMEN</b>	3
2.	<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
2.1	Inmunidad Innata	7
2.2	Células dendríticas	7
2.3	Receptores tipo Toll	9
2.4	Respuesta de células dendríticas a parásitos protozoarios	11
2.5	Respuesta de células dendríticas a parásitos helmintos	11
2.6	Inmunidad adaptativa	15
2.7	Respuesta Th1	16
2.8	Respuesta Th2	17
2.9	Cisticercosis experimental	19
3.	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	22
4.	<b>HIPÓTESIS</b>	22
5.	<b>OBJETIVOS</b>	23
6.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	24
6.1	Obtención de antígenos	25
6.1.2	Antígeno secretado/excretado de <i>Taenia crassiceps</i>	25
6.1.3	Antígeno soluble de <i>Taenia crassiceps</i> (TcAg)	25
6.1.4	Deglicosilación de antígenos solubles de <i>Taenia crassiceps</i>	25
6.1.5	Antígeno soluble de <i>Toxoplasma gondii</i>	26
6.1.6	Antígenos TLR dependientes	26
6.1.7	Cuantificación de proteínas	26
6.1.8	Cuantificación de carbohidratos	27
6.1.9	SDS-PAGE	28
6.2	Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea	28
6.2.1	Purificación de células dendríticas	29
6.2.2	Estimulación de células dendríticas <i>in vitro</i>	30
6.3	Co-cultivos células dendríticas y linfocitos CD4 DO11.10	30
6.3.1	Obtención células de bazo	30
6.3.2	Selección de CD4+ y proliferación celular	31
6.4	Transferencia de células dendríticas a ratones DO11.10	31
6.4.1	Obtención de suero	31

6.5	Análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo	32
6.6	Análisis de citocinas por RT-PCR	32
6.6.1	Electroforesis en gel de agarosa	34
6.7	Determinación de citocinas por ELISA	35
7.	<b>RESULTADOS</b>	36
8.	<b>DISCUSIÓN</b>	58
9.	<b>CONCLUSIONES</b>	66
10.	<b>REFERENCIAS</b>	67
11.	Apéndice I	71
12.	Apéndice II	74

## 1. Resumen

Las células dendríticas (CD) son las principales células presentadoras de antígeno del sistema inmune, están involucradas en el inicio de la respuesta inmune innata y adaptativa. Las CDs cuentan con receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Entre los PRRs más estudiados se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs). La respuesta característica de las CDs al ser estimuladas por ligandos para TLRs, como LPS y CpG, es el inicio de un proceso de maduración el cual se asocia con alta expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, acompañado del aumento de MHC-II y por secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Durante el proceso de maduración las CDs migran de los tejidos periféricos a los ganglios linfáticos donde activan a las células T y dependiendo del estímulo de maduración inicial, el estado de activación y el ambiente de citocinas, las CDs pueden activar células T, hacia Th1, Th2 o Treg. Algunos de los factores y mecanismos que favorecen el desarrollo de una respuesta Th1 inducidos por las CDs son bien conocidos, por otro lado los factores que promueven una respuesta Th2 aún no han sido completamente aclarados.

Las infecciones crónicas causadas por helmintos se asocian con respuestas tipo Th2, esta respuesta se caracteriza por altos niveles de citocinas como IL-4, IL-13, IL-5 e IL-10. Además, estas infecciones modulan la respuesta inmune hacia antígenos no relacionados, predisponiendo al hospedero a infecciones secundarias más severas con patógenos secundarios, como virus y protozoarios. En trabajos previos se han planteado dos hipótesis sobre la interacción de antígenos de helmintos y las CDs, por un lado se postula que los helmintos no estimulan a las CDs, permaneciendo en estado inmaduro e induciendo una respuesta tipo Th2 como resultado de la presentación de antígeno en ausencia de moléculas co-estimuladoras y por la carencia de IL-12. Por otro lado, investigaciones recientes muestran un estado modulado en las CDs expuestas a los antígenos de diferentes helmintos, los cuales tienen la característica de polarizar la respuesta inmune para adquirir un fenotipo Th2 *in vitro*, estas evidencias sugieren mecanismos más complejos para la modulación de las CDs por los helmintos.

El céstodo *Taenia crassiceps* es un helminto utilizado como modelo experimental de cisticercosis, y la respuesta en la infección crónica es de tipo Th2. Debido a que las CDs pueden activar a las células T, es posible que los antígenos de *Taenia* puedan ser reconocidos por ellas e iniciar una respuesta Th2.

Para estudiar la interacción entre células dendríticas y los antígenos de *Taenia*, diferenciamos CDs *in vitro* a partir de células de médula ósea de ratones BALB/c. Las CDs fueron expuestas a antígenos de la fase larvaria del céstodo (TcES, TcAg), y/o estimuladas con antígenos TLR dependientes (CpG, LPS, o antígeno soluble de *Toxoplasma gondii*), se caracterizaron los cambios en la expresión de moléculas co-estimuladoras, el perfil de citocinas y su capacidad de presentación de antígeno. Las células dendríticas expuestas *in vitro* a TcES o TcAg, mostraron una expresión modulada de CD40 y CD86, los niveles de expresión fueron menores comparadas con las CDs expuestas a ligandos para TLRs, pero sus niveles de expresión no fueron basales. En cambio, los niveles de MHC-II inducidos por los antígenos de *Taenia* fueron expresados de manera similar comparados con las CDs expuestas a LPS. Las CDs tratadas con los antígenos de *T. crassiceps* no fueron capaces de inducir la producción de citocinas pro-inflamatorias, en cambio indujeron una baja expresión de IL-10, de manera interesante la co-administración de TcES o TcAg con LPS, CpG o antígeno de TSA, resultó en una disminución de la activación de las CDs y afectó la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-15, este efecto fue independiente de STAT 6 y dependiente de los carbohidratos presentes en los antígenos solubles de *Taenia*. En cultivos de CDs tratadas con TcES o TcAg con células CD4+ de ratones DO11.10 los niveles de IL-4 se mantienen y aumenta la producción de IL-5, mientras que los niveles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-15 disminuyen en presencia de los antígenos, de la misma manera la producción de citocinas pro-inflamatorias disminuye en presencia de LPS o TSA. La transferencia *in vivo* de las CDs cargadas con OVA y tratadas con TcAg en ratones DO11.10, lograron inducir la producción de IL-4 e IL-5 pero no IFN- $\gamma$ .

## 2. Introducción

La respuesta inmune es esencial para el mantenimiento de la homeostasis del individuo, durante años se ha estudiado para entender su funcionamiento y aprovechar sus características para potenciar la respuesta inmune para la eliminación de patógenos. La respuesta inmune en algunos casos es deficiente o puede destruir los tejidos del huésped, siendo necesaria la regulación adecuada de dicha respuesta. La respuesta inmune que provocan organismos parásitos metazoarios es difícil de entender, ya que cuentan con una estructura más compleja y una diversidad antigénica mayor, comparada con parásitos protozoarios, bacterias o virus. Los helmintos parásitos han recobrado importancia en la investigación básica, ya que de manera muy interesante pueden eludir al sistema inmune para prolongar su supervivencia en el huésped (Maizels et al., 2004). Un punto importante es la hipótesis de la regulación inmune que llevan a cabo los helmintos hacia respuestas inflamatorias, incluyendo las respuestas autoinmunes, las reacciones exacerbadas que provocan alergias y disminuyendo la eficacia del sistema inmune para eliminar infecciones que requieren una respuesta Th1. Esta idea es llamada "hipótesis de la higiene" donde en países donde la población vive en mayores condiciones higiénicas, la prevalencia de las enfermedades mediadas por el sistema inmune como encefalomiелitis autoinmune, artritis reumatoide, diabetes tipo 1 y asma han aumentado considerablemente. En contraste en los países subdesarrollados donde las condiciones higiénicas adecuadas son un privilegio, este tipo de enfermedades tienen baja prevalencia. La emergencia de estas enfermedades, puede ser debido a la carencia de la exposición natural con los helmintos, perdiendo así la respuesta Th2 y reguladora característica que inducen estos organismos (Rook, 2007). Esta hipótesis es soportada por experimentos recientes donde la infección por helmintos previene el desarrollo de enfermedades mediadas por el sistema inmune (Cooke et al., 2004; Rook, 2007). Sin embargo, el fenómeno de la modulación inmune dista de ser claro, dentro de las preguntas actuales más importantes se encuentra cual es el inicio de la respuesta Th2 característica durante la infección crónica con helmintos y como estos parásitos modulan de manera negativa a la respuesta inflamatoria Th1 (Diaz and Allen, 2007). En los últimos años, las investigaciones sobre la modulación de la respuesta inmune se han enfocado a las células presentadoras de antígenos, entre ellas macrófagos, linfocitos B y células dendríticas. Hasta el momento la participación de las células dendríticas en el inicio de la respuesta Th2 es controvertida (MacDonald and Maizels, 2008). Algunos investigadores postulan que los helmintos fallan en la estimulación de las células dendríticas,

conduciendo así a la presentación de antígeno en estado inmaduro e iniciando una respuesta tipo Th2 por la carencia de producción de IL-12 y por la baja expresión de moléculas co-estimuladoras, ambas señales necesarias para la polarización apropiada de una respuesta tipo Th1. Sin embargo, experimentos utilizando un estímulo inductor de una respuesta Th1, como lo es *Propiobacterium acnes*, en ratones deficientes en IL-12 la respuesta Th1 se lleva a cabo de manera adecuada, demostrando que la ausencia de IL-12 no da lugar a una respuesta Th2 (MacDonald and Pearce, 2002).

Por otro lado, existe la hipótesis en la que se sugiere que las CD4 poseen receptores homólogos a los TLRs, los cuales pueden reconocer patrones conservados en los helmintos, condicionando así las señales necesarias para el inicio de una respuesta tipo Th2. Sin embargo, hasta el momento no han sido identificados estos receptores y no han sido aclaradas las señales necesarias para iniciar una respuesta Th2 por las células dendríticas en respuesta a helmintos (MacDonald and Maizels, 2008).

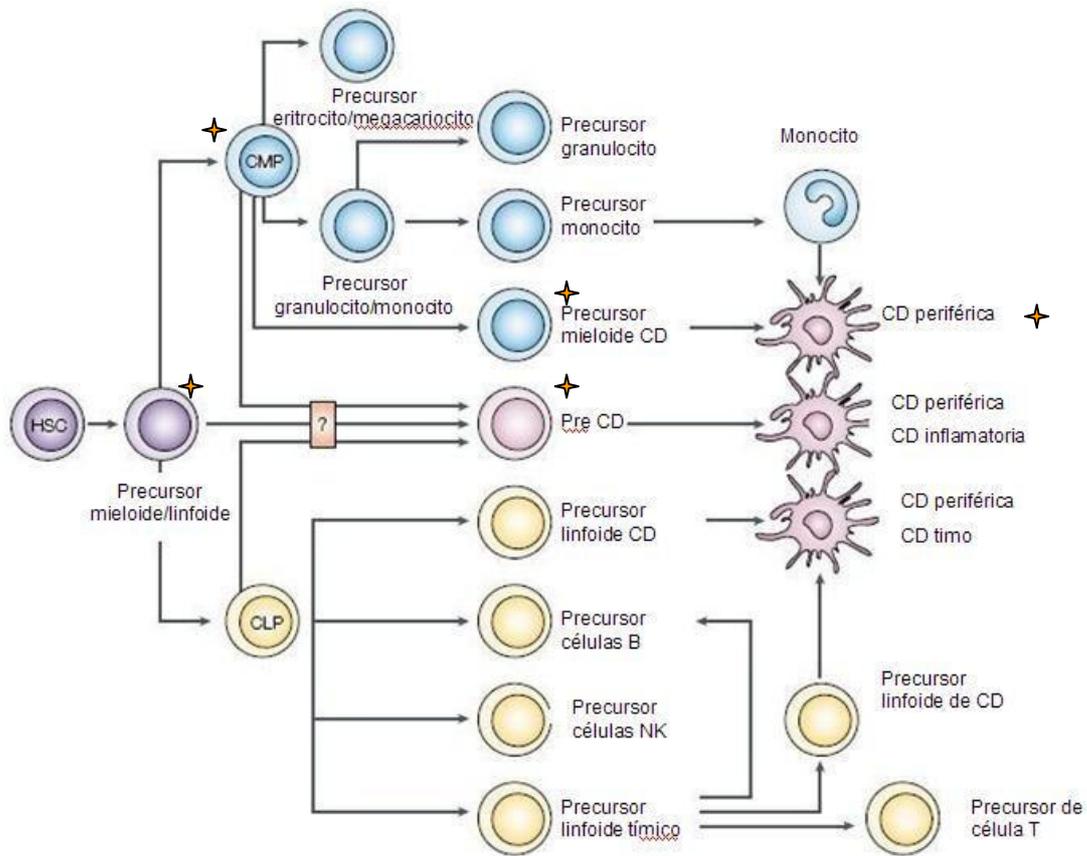
En la en la cisticercosis experimental, causada por el helminto *Taenia crassiceps* existe una polarización de la respuesta inmune en la infección crónica hacia un tipo Th2 (Terrazas et al., 1998), nuestro grupo caracterizó una población de macrófagos con características supresoras en cisticercosis experimental, llamados macrófagos alternativamente activados (Terrazas et al., 2005), es decir, la infección por *T. crassiceps* afecta el funcionamiento de esta célula presentadora de antígeno y no es ignorada por el sistema inmune como se ha propuesto para las células dendríticas. Esto nos llevó a pensar que la naturaleza del antígeno puede influir directamente en el estado de activación de las células dendríticas confiriendo características que puedan llevar a cabo una respuesta Th2. Para investigar el papel de las células dendríticas en el inicio de la respuesta Th2, llevamos a cabo experimentos *in vitro* con CD4 derivadas de médula ósea de ratones BALB/c, una vez diferenciadas fueron expuestas a los antígenos del helminto *Taenia crassiceps*, se analizaron diversos marcadores de membrana y citocinas producidas en comparación con antígenos TLR dependientes.

## **2.1 Inmunidad innata**

La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra las infecciones, consiste en barreras epiteliales, células y factores solubles que reconocen microbios o sustancias producidas en infecciones. Los mecanismos de la inmunidad innata existen antes del contacto con los patógenos, y se activan rápidamente al entrar en contacto con ellos, esto sucede antes del desarrollo de la inmunidad adaptativa. Algunas veces, como repuesta inicial puede prevenir la infección del huésped, y en muchos casos, puede eliminar los microbios. Sin embargo, no posee memoria inmunológica. Por otra parte puede estimular la respuesta inmune adaptativa y puede influir en la naturaleza de la repuesta secundaria para hacerla más efectiva contra diferentes tipos de microbios. Las principales células de la respuesta innata son los basófilos, eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y células asesinas naturales (NK) (Abbas, 2003). Las células dendríticas funcionan como células presentadoras de antígeno profesionales, las cuales reciben las señales de infección y traducen esta información para instruir a la inmunidad adaptativa para responder contra el patógeno inicial, estas células cuentan con receptores que reconocen patrones moleculares compartidos por varios patógenos (PRRs), al recibir alguna señal de infección por medio de estos receptores, las células se activan aumentando la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, aumentan la capacidad de presentación de antígeno por medio del complejo principal de histocompatibilidad clase II, y además responden secretando citocinas que estimulan la reacción celular de la inmunidad innata, llamada inflamación, la cual consiste en el reclutamiento de leucocitos y proteínas del plasma en el lugar de la infección para eliminar el agente infeccioso (Kelsall et al., 2002).

## **2.2 Células dendríticas (CDs)**

Las células dendríticas son células que forman parte del sistema inmune innato, son células presentadoras de antígeno profesionales, y pueden ser de origen mieloide o linfoide. Entre los distintos fenotipos de células dendríticas encontramos CDs mieloides (CD8-), linfoides (CD8+), plasmacitoides (B220+), y células de Langerhans (Ardavin, 2003). Para fines de experimentación se han empleado métodos para diferenciar CDs a partir de células de médula ósea en ratón, cultivándolas en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), lo cual resulta en una alta producción de CDs *in vitro* y con una pureza de 80 – 85% (Lutz et al., 1999).



**Figura 1.** Hipótesis de diferenciación de CDs a partir de un progenitor común. Aún se encuentra en controversia si las CDs linfoides y mieloides provienen de un mismo precursor. ✦ Línea de diferenciación que usamos en nuestros experimentos. Células obtenidas de médula ósea (HSC) dan origen a CMP, estos al cultivarse en presencia de GM-CSF originan precursores de CDs que finalmente se diferencian a CDs CD8-. HSC: Célula stem hematopoyética. CMP: Precursor común mieloide. CLP: Precursor común linfoide. (Imagen modificada de (Ardavin, 2003).

Las CDs se encuentran en tejidos periféricos en estado inmaduro, con gran capacidad fagocítica y baja expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, además de bajos niveles de MHC-II, al encontrarse con antígenos, las CDs llevan a cabo un proceso de maduración, aumentando la expresión de CD80, CD86 y aumentan la presentación de antígeno unido a MHC-II, mientras esto sucede las CDs migran hacia los órganos linfoides donde llevan a cabo la activación de linfocitos T (Banchereau and Steinman, 1998). En los últimos años se han propuesto hipótesis sobre la inducción de

tolerancia o inmunidad por las células dendríticas, una de ellas postula que existen subclases de células dendríticas las cuales están programadas para inducir inmunidad (CD11c+ CD8-) o tolerancia (CD11c+ CD8+) , por otra parte ha sido propuesto que las diferentes subclases de células dendríticas tienen la capacidad de inducir ambas respuestas (Shortman and Heath, 2001). La mayor parte de evidencias sugiere que la polarización de la respuesta inmune no es debido a señales intrínsecas de la célula, sino que es el resultado de la estimulación del ambiente. Los factores que contribuyen a tolerancia o inmunidad son el ambiente de citocinas (Grohmann et al., 1999), la ligación de productos microbianos a receptores de reconocimiento de patrones (Medzhitov and Janeway, 2000), la dosis de antígeno (Boonstra et al., 2003) y el estado de maduración de las CDs (Steinman and Nussenzweig, 2002).

### **2.3 Receptores tipo toll (TLRs)**

Los receptores tipo Toll son uno de los mecanismos por el cual el sistema inmune innato reconoce la presencia de organismos patógenos y se encuentran presentes en varios tipos celulares. Los TLRs funcionan reconociendo patrones moleculares que están presentes en componentes microbianos. La estimulación a través de los diferentes TLRs induce distintos patrones de expresión génica, los cuales no sólo conducen a la activación del sistema inmune innato, sino también instruyen el desarrollo de inmunidad específica de la inmunidad adquirida. Los receptores tipo Toll se encuentran clasificados dentro de los PRRs (receptores que reconocen patrones moleculares), hasta la fecha han sido descritos 11 diferentes TLRs (Tabla 1), algunos de ellos señalizan por sí mismos y otros necesitan unirse con otro TLR para señalizar. Dentro de los TLRs existen algunos extracelulares (TLR1, TLR2 y TLR4) y otros que se encuentran dentro del citoplasma involucrados en el reconocimiento estructuras como los ácidos nucleicos (TLR3, TLR7 y TLR9), su estructura intracelular es parecida a la del receptor de interleucina 1 (IL-1 Rs) la cual contiene una región conservada de 200 aminoácidos conocida como dominio TIR donde se encuentran 3 cajas conservadas cruciales para la señalización, pero difiere en su dominio extracelular, donde los TLRs son ricos en repeticiones de leucina (LRR), mientras que el IL-1R tiene tres dominios de tipo inmunoglobulina (Akira and Takeda, 2004).

La estimulación a través de los TLRs da como resultado una cascada de señalizaciones donde la principal molécula adaptadora es MyD88, como resultado final se lleva a cabo la translocación al núcleo del factor nuclear kB (NF-kB), iniciando la

transcripción de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, se ha demostrado que TLR4 tiene una vía de señalización alterna a MyD88, la cual se realiza por la molécula TRIF. Hasta ahora la característica de señalización a través de los diferentes TLRs resulta en la expresión de moléculas co-estimuladoras en CDs y la producción de citocinas pro-inflamatorias (Akira and Takeda, 2004).

Los diferentes TLRs y sus principales ligandos así como el origen de los últimos se muestran en la tabla 1.

TLR	Ligando	Origen del Ligando
TLR 1	Triacil lipopéptidos Factores solubles	Bacteria, Micobacteria <i>Neisseria meningiditis</i>
TLR 2	Lipoproteína/lipopéptidos Peptidoglicano Zimosan	Varios patógenos Bacteria Gram positiva Hongos
TLR 3	Doble cadena de RNA	Virus
TLR 4	Lipopolisacárido	Bacteria Gram negativa
TLR 5	Flagelina	Bacteria
TLR 6	Diacil lipopéptidos Zyosan	Micoplasma Hongos
TLR 7	RNA monocatenario Imidazoquinoline	Virus Compuesto sintético
TLR 8	RNA monocatenario	Virus
TLR 9	DNA con contenido CpG	Bacteria y virus
TLR 10	N.D.	N.D.
TLR 11	Profilin N.D.	<i>Toxoplasma gondii</i> Bacteria uropatógena

**Tabla 1.** Ligandos para TLRs y su origen. Entre los ligandos conocidos a la fecha se encuentran productos de bacterias, virus, hongos y protozoarios, todos con la capacidad de polarizar hacia una respuesta tipo Th1 (Akira and Takeda, 2004). Hasta el momento no es claro si los helmintos contienen derivados que sirvan como ligandos para TLRs y que tengan la capacidad de polarizar a una respuesta Th2.

## **2.4 Respuesta de células dendríticas a parásitos protozoarios.**

La respuesta inducida por antígenos de diferentes protozoarios puede ser mediada a través del reconocimiento de estos por TLRs en las células dendríticas. La respuesta común en la señalización a través de los TLRs es la activación de NFκB y la activación de genes que codifican para la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, TNF-α e interferones tipo 1 (IFN-α, IFN-β).

En la respuesta innata a través de TLRs en infecciones por *Trypanosoma cruzi* ha sido caracterizado el reconocimiento de glicoproteínas a través de TLR2 y el reconocimiento de ácidos nucleicos por TLR9 (Tarleton, 2007). Por otro lado, la presencia de TLR2, TLR9 y TLR11 han sido implicados en una adecuada y rápida respuesta contra *Toxoplasma gondii*, esto es interesante ya que recientemente se ha demostrado que la señalización a través de dos TLRs simultáneamente tiene efecto sinérgico en la secreción de citocinas pro-inflamatorias. De manera interesante los ratones deficientes en MyD88, una molécula adaptadora clave en la señalización de los TLRs son altamente susceptibles a la infección con *T. gondii*, sin embargo, los ratones deficientes en alguno de los TLRs implicados en el reconocimiento del protozoario solo disminuye parcialmente la respuesta pro-inflamatoria (Khan, 2007). Esto indica que para patógenos estructuralmente más complejos como lo son los protozoarios, el sistema inmune ha desarrollado evolutivamente mecanismos de reconocimiento que pueden propiciar una respuesta mayor reconociendo varias moléculas al mismo tiempo en el mismo microorganismo.

## **2.5 Respuesta de células dendríticas a parásitos helmintos.**

Se ha reportado que la respuesta inmune asociada a diferentes infecciones por helmintos se caracteriza por una alta producción de IL-4, IL-5, IL-13, IgE y eosinofilia, que en conjunto se conoce como tipo Th2 (Maizels et al., 2004). En la cisticercosis experimental causada por *Taenia crassiceps* la respuesta inmune también es polarizada hacia Th2 cuando la infección se torna crónica, lo cual favorece la reproducción del parásito (Villa and Kuhn, 1996; Terrazas et al., 1998). Sin embargo, en la cisticercosis experimental, como en otras helmintosis, aun no hay evidencia de cual es el origen de la polarización de la respuesta inmune hacia un tipo Th2.

Las células dendríticas son claves en el reconocimiento de patógenos y en el inicio de la inmunidad adaptativa, hasta ahora no es claro si pueden reconocer moléculas asociadas a helmintos, y si las reconocen, no han sido descritos los cambios en la

expresión de moléculas co-estimuladoras y secreción de citocinas que puedan tener lugar después de la exposición a antígenos de helmintos (Maldonado-Lopez and Moser, 2001).

En recientes investigaciones se han utilizado células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón llamadas mieloides (bmDC) o derivadas de monocitos humanos llamadas plasmacitoides (pDC) Las CD<sub>s</sub> han sido expuestas a antígenos de diferentes helmintos, los resultados muestran distintos estados de maduración dependiendo del helminto del cual provienen los antígenos (Whelan et al., 2000; Thomas et al., 2003; Balic et al., 2004; Perona-Wright et al., 2006). La mayoría de los estudios son coherentes en mostrar como resultado que la exposición a los antígenos de los helmintos confieren a las células dendríticas la capacidad para polarizar células T vírgenes hacia un fenotipo Th<sub>2</sub>, pero se mantiene en duda las señales necesarias para esta polarización (MacDonald and Maizels, 2008). En la tabla 2 se muestra un resumen de las investigaciones a la fecha sobre la interacción de antígenos de helmintos y células dendríticas.

Clase	Especie	Antígeno	Respuesta de Célula Dendrítica
Tremátodo	<i>Schistosoma mansoni</i>	Antígeno soluble (SEA)  (0-3hRP)  LNFP III	<b>Humano:</b> Receptores: MR, MGL, DC-SIGN. Permanecen inmaduras. IL-6 (Van Die 2007). <b>Ratón:</b> Inmaduras, capaces de inducir Th2 <i>in vivo</i> (Pearce 2002). Estado modulado. IL-6, IL-12p40, Th2 <i>in vitro</i> . (Mountford 2005). Induce Th2, participación de TLR4 (Harn 2004).
Nemátodo	<i>Acanthocheilonema viteae</i>  <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>  <i>Heligmosomoides polygyrus</i>	ES-62  NES  AgSE	<b>Ratón:</b> Inmaduras, Th2 <i>in vitro</i> . (Rigley 2000); Receptor TLR4 (Harnett 2005). CD86, OX40L, IL-6, IL-12p40. Th2 <i>In vivo</i> (Maizels 2004). Inmaduras, inhibe CD80, CD40, MHC-II por TLR. CD25+ (Stevenson 2007)
Céstodo	<i>Echinococcus granulosus</i>  <b><i>Taenia crassiceps</i></b>	AgB SHF  <b>N.D.</b>	<b>Humano:</b> Expresan CD80, CD86, CD40, Modula TNF- $\alpha$ , IL-12, activa IRAKp y NF-kB (Rigano 2007).

**Tabla 2.** Interacción de células dendríticas y diferentes antígenos de helmintos. Los antígenos de helmintos no maduran completamente a las células dendríticas, pero el fenotipo de las CDs puede inducir la diferenciación de linfocitos a Th2 o Treg e inhibir la respuesta de las CDs a antígenos pro-inflamatorios. Hasta el momento no existen investigaciones de la interacción de las CDs con antígenos de *T. crassiceps*.

La exposición de CD4s derivadas de monocitos humanos (plasmacitoides) a antígenos solubles de huevo de *Schistosoma mansoni* (SEA), no muestran aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras, sin embargo inhibe la activación de las CD4s expuestas a LPS y Poly:c, esta investigación muestra que las CD4s internalizan a SEA mediante lectinas tipo C, como DC-SIGN, MGL y el receptor de manosa (MR). (van Liempt et al., 2007). En otro estudio utilizando los productos secretados por la larva de *S. mansoni* 3 horas después de transformarse (0-3hRP), reportaron que las CD4s derivadas de médula ósea (bmDC) incrementan la expresión de CD40, CD86 y MHC-II, y producen IL-12p70 e IL-6, pero siempre en cantidades menores a las CD4s estimuladas con LPS (Th1) o zymosan (Th2). Sin embargo, las CD4s expuestas a 0-3hRP y pulsadas con OVA exhiben la característica de polarizar hacia Th2 a células CD4+ de ratones Tg OVA. De manera interesante la unión del anticuerpo anti-CD40 suprime la habilidad de las CD4s 0-3hRP para polarizar un fenotipo Th2 (Jenkins and Mountford, 2005). El glicano lacto-*N*-fucopentosa III, del helminto *S. mansoni*, puede modificar las CD4s a un fenotipo capaz de inducir una respuesta Th2, preferencialmente activando ERK, para este efecto es necesaria la expresión de TLR4 funcional (Thomas et al., 2003).

La exposición de células dendríticas a los productos secretados/excretados por el nemátodo *Acanthocheilonema viteae* (ES-62), los cuales contienen fosforil-colina, confiere a las CD4s la capacidad de inducir una respuesta tipo Th2, incrementando los niveles de IL-4, y disminuyendo la secreción de IFN- $\gamma$  en un modelo que utiliza células CD4+ transgénicas que expresan un receptor específico para ovoalbúmina (OVA). El fenotipo resultante de la exposición a ES-62, muestra un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD40, CD86 y CD80 en niveles muy similares a aquellos observados en CD4s expuestas a LPS (Whelan et al., 2000). Los efectos moduladores se conservan en ratones con mutación en TLR4 (C3H/HeJ) y deficientes en TLR2; de manera interesante las CD4s deficientes en TLR4 no expresan CD40 en respuesta a ES-62, y pierden la capacidad de modular la respuesta a diferentes TLRs. Sin embargo, la expresión de CD80 y CD86 no se alteran (Goodridge et al., 2005). Esto sugiere que ES-62 es reconocido parcialmente por TLR4 y que este receptor no necesariamente debe ser funcional.

Las CD4s expuestas a productos secretados/excretados del nematodo gastrointestinal *Nippostrongylus brasiliensis* (NES) expresan CD40, OX40L y CD86. Además secretan IL-6 y expresan IL-12p40. Las CD4s tratadas con NES inhiben la producción de IL-12p70 inducida por LPS, finalmente las CD4s estimuladas con NES y

transferidas a ratones sanos llevan a la producción de IL-4, IL-5 e IL-10, un perfil tipo Th2 (Balic et al., 2004). Los productos secretados/excretados de *Heligmosomoides polygyrus*, no aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras en las CDs y no secretan citocinas. Las CDs expuestas a los ES de *H. polygyrus* modulan la secreción de IL-12, IL-10 y TNF- $\alpha$  inducidas por ligandos de TLRs. Este efecto no se modifica en CDs deficientes en TLR2 o TLR4. De manera interesante las CDs tratadas con ES de *H. polygyrus* inhiben respuesta de anticuerpos tipo 1 y 2 *in vivo* e inducen la diferenciación de células T reguladoras productoras de IL-10 (Segura et al., 2007).

El antígeno B (AgB) del céstodo *Echinococcus granulosus* induce un fenotipo de CDs derivadas de monocitos humanos que expresan CD80, CD40 y CD86, la exposición al AgB interfiere con la secreción de IL-12p70 y TNF- $\alpha$  inducido por LPS. En las CDs expuestas al AgB se encontró fosforilado IRAK, una molécula que media la señalización intracelular inducida por TLR4, también se observó que el factor nuclear kB (NFkB) se encontraba activado (Rigano et al., 2007). La activación de NFkB y la presencia de IRAK fosforilado sugieren la participación de TLRs en el reconocimiento del AgB.

## **2.6 Inmunidad adaptativa**

La inmunidad adaptativa es capaz de reconocer y eliminar específicamente microorganismos, moléculas extrañas y células infectadas o alteradas. Este tipo de inmunidad tiene como características principales: especificidad antigénica, diversidad, memoria inmunológica, reconocimiento de lo propio y extraño. Las principales células de la inmunidad adaptativa son los linfocitos T y linfocitos B, estas células son capaces de llevar a cabo recombinación somática en sus receptores (TCR y BCR respectivamente), mediante este mecanismo las células de la inmunidad adaptativa pueden reconocer una amplia diversidad de antígenos y aumentar la especificidad hacia estos (Abbas, 2003). Otras características de estas células es que mantienen memoria inmunológica, es decir, aún cuando el patógeno se ha eliminado, estas células específicas para reconocer un antígeno determinado pueden permanecer en el huésped durante años y reaccionar de manera más eficaz al entrar de nuevo en contacto con el antígeno. Estas células tienen la capacidad de influir en otros tipos celulares, mediante la expresión de moléculas de membrana y principalmente mediante la secreción de citocinas y quimiocinas. Para su estudio la respuesta generada por las células T, se ha dividido principalmente en dos tipos: Th1 y Th2, estas respuestas se caracterizan por el perfil de citocinas que predomina y ambas respuestas se regulan entre sí (Mosmann et al., 1986).

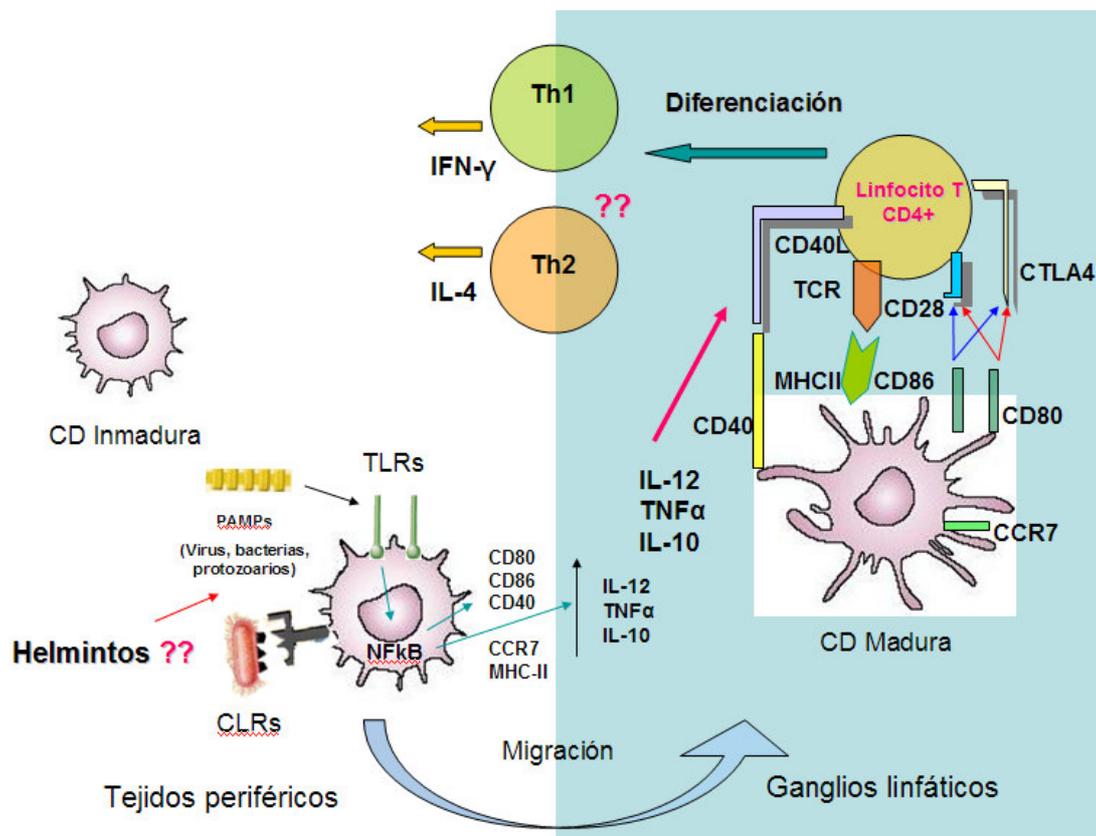
## 2.7 Respuesta tipo Th1

Esta respuesta es mediada principalmente por la activación de linfocitos CD4+ y CD8+. Estas subclases de linfocitos, cuentan con receptores específicos para el reconocimiento de péptidos (TCR), unidos al complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los linfocitos CD8+ reconocen péptidos unidos al complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), esta molécula la puede expresar cualquier tipo celular. Por otro lado, los linfocitos CD4+ reconocen péptidos unidos a MHC-II, el cual se expresa sólo en células presentadoras de antígeno profesionales, como células B, macrófagos y células dendríticas. La activación de los linfocitos Th1 y CD8+ se llevan a cabo mediante la estimulación conferida de células presentadoras de antígeno profesionales, las CD8 son las principales activadoras de los linfocitos Th1 (Maldonado-Lopez and Moser, 2001). Los mecanismos de activación provistas por las APCs aún se encuentran en estudio, pero hasta ahora los factores más importantes implicados en la activación del linfocito son: la afinidad por el péptido, la co-estimulación provista por la célula presentadora de antígeno y las citocinas presentes durante la presentación de antígeno, donde la presencia de IL-12 es importante para la activación de ambas subclases de linfocitos. Hasta ahora no se han identificado moléculas para determinar el fenotipo de un linfocito Th1 o Th2, sólo es posible identificarlos por la secreción de citocinas, IFN- $\gamma$  (Th1) e IL-4, IL-5 e IL-13 (Th2). El linfocito Th1 se expande clonalmente y se caracteriza por la secreción de IFN- $\gamma$ . Su función es reconocer péptidos por afinidad, y los puede reconocer en células B, macrófagos o células dendríticas. El IFN- $\gamma$  actúa de manera diferente en cada tipo celular. En las células B, aumenta la presentación de antígeno, además de activarlas para convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos, principalmente de inmunoglobulina G2a (IgG2a) en ratones (Abbas, 2003). El efecto del IFN- $\gamma$  en células presentadoras de antígenos como CD8 y macrófagos, es el aumento en la presentación de antígenos, aumento de expresión de moléculas co-estimuladoras, secreción de citocinas como IL-12, aumento de receptores de citocinas y quimiocinas. Además puede activarlas para la eliminación de parásitos intracelulares por medio de la liberación de especies oxidativas como óxido nítrico. Finalmente, los diferentes tipos celulares no inmunes también responden a la estimulación por IFN- $\gamma$  mediante la mayor expresión de antígeno unidos a moléculas MHC-I. Los linfocitos CD8+ requieren las mismas señales de activación que el linfocito Th1. La función del linfocito CD8+ es reconocer péptidos en células infectadas, cuando se lleva a cabo el reconocimiento de antígeno, el linfocito libera gránulos citolíticos que lisan a la célula

presentadora de antígeno (Abbas, 2003). Este tipo de respuesta inmune está involucrada en mantener inmunidad principalmente a patógenos intracelulares como virus y bacterias. En investigaciones recientes se ha demostrado que esta respuesta es eficiente para la lisis de células tumorales, sin embargo, las células tumorales han desarrollado mecanismos complejos para evadir esta respuesta inmune. Por otro lado, la RI Th1, está implicada en patologías autoinmunes como encefalomiелitis autoinmune, diabetes tipo I, artritis reumatoide, entre otras, donde la exacerbación de la inflamación resulta patológica para el huésped. En los últimos años se han estudiado nuevos mecanismos de inmunoregulación para combatir estas enfermedades, ya que los tratamientos disponibles hasta ahora resultan en la inmunosupresión del individuo haciéndolo más vulnerable a contraer infecciones secundarias (Abbas, 2003).

## **2.8 Respuesta tipo Th2**

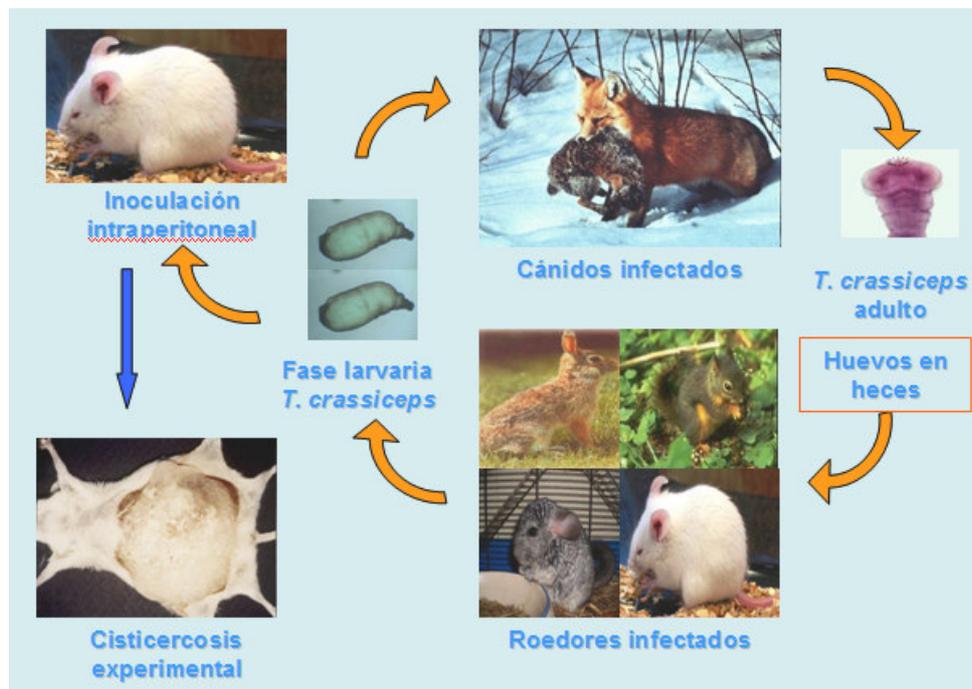
La respuesta tipo Th2 se caracteriza por la activación de linfocitos CD4+ que producen IL-4, IL-5 e IL-13. En esta respuesta participan diferentes células como eosinófilos, linfocitos B y mastocitos. Los mecanismos involucrados en la diferenciación a Th2 no son claros, y se desconocen las señales tempranas para inducir esta diferenciación. Estudios han demostrado que la polarización hacia Th2 se puede llevar a cabo en la ausencia de linfocitos B y eosinófilos (Holland et al., 2005). Por otro lado, células dendríticas expuestas a diferentes antígenos de helmintos son capaces de inducir una respuesta Th2 *in vivo* e *in vitro*. Hasta ahora no han sido identificadas las moléculas necesarias en las CDs para inducir la diferenciación hacia Th2. Las citocinas predominantes en un perfil Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) tienen efecto sobre diversas células del sistema inmune. IL-4 participa en la expansión clonal de linfocitos B y su activación a células plasmáticas principalmente productoras de IgG1 e IgE. Los eosinófilos son activados por IL-5, y principalmente son atraídos por histamina, además tienen alta afinidad por IgE. Los eosinófilos activados liberan gránulos los cuales son tóxicos para parásitos extracelulares, principalmente del tracto intestinal. Los mastocitos responden con liberación de histamina al fijar en su membrana IgE (Abbas, 2003). La respuesta tipo Th2 participa en la eliminación de parásitos extracelulares como helmintos del tracto intestinal (Maizels et al., 2004). Sin embargo, se ha demostrado que esta respuesta se correlaciona con el aumento de parásitos en la cisticercosis experimental (Terrazas et al., 1998). Por otro lado, la respuesta Th2 es característica de reacciones de hipersensibilidad inmediata, reaccionando contra moléculas inocuas llamadas alérgenos (Abbas, 2003).



**Figura 2.** Activación, migración de células dendríticas, factores que influyen en la activación de células CD4+. Las CDs inmaduras se encuentran en tejidos periféricos con alta actividad fagocítica, las CDs cuentan con PRRs los cuales pueden reconocer PAMPs. Las CDs al reconocer un antígeno por medio de los TLRs, una familia de PRRs, llevan a cabo de señalización intracelular que activa la translocación al núcleo de NFκB el cual inicia la transcripción de genes que codifican para citocinas pro inflamatorias como IL-12, IL1β, TNF-α, y aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras de membrana como CD80, CD86, CD40L y el receptor de quimiocinas CCR7, este proceso es llamado maduración y se lleva a cabo durante la migración a los ganglios linfáticos. Finalmente la CD madura puede inducir la diferenciación de linfocitos vírgenes CD4+ a linfocitos Th1. Aún se desconoce cuales son la señales necesarias para la diferenciación de linfocitos T a linfocitos Th2 (MacDonald and Maizels, 2008).

## 2.9 Cisticercosis experimental

El modelo experimental de cisticercosis, se basa en la infección con la fase larvaria de *T. crassiceps* en ratón, mediante la inoculación intraperitoneal de cisticercos. La cisticercosis experimental causada por *T. crassiceps* ha resultado muy útil en la investigación básica de la interacción huésped-parásito en la cisticercosis en general, por su relativo bajo costo de mantenimiento en ratón, la alta capacidad reproductiva del parásito, y la antigenicidad cruzada que comparte con *Taenia solium*.



**Figura 3.** Ciclo de vida del helminto *Taenia crassiceps*. El cestodo en su fase adulta infecta cánidos, alojándose en el intestino delgado. La fase adulta libera proglótidos gravídeos en las heces, las cuales al ser ingeridas por roedores se desarrolla en estos la fase larvaria del parásito (cisticercos). El metacestodo puede alojarse en músculos o en el tejido subcutáneo, la fase larvaria tiene la característica de reproducirse asexualmente a través de gemación. Cuando los cánidos se alimentan de roedores infectados, el ciclo vital de *T. crassiceps* se completa al desarrollarse nuevamente el parásito adulto. En el laboratorio infectamos a ratones BALB/c con 10 cisticercos en la cavidad peritoneal.

Las investigaciones en este modelo de cisticercosis se han enfocado al entendimiento de la relación huésped-parásito. Principalmente en los mecanismos inmunes y endocrinos asociados a la infección, el conocimiento generado en la investigación básica en el modelo experimental ha podido ser extrapolado a la infección real, logrando el desarrollo de posibles vacunas en cerdos, la identificación de antígenos para uso diagnóstico de cisticercosis en humanos y llevando a un mejor entendimiento de la respuesta inmune hacia el parásito (Sciutto et al., 2007).

El conocimiento básico para generar vacunas contra diferentes patógenos está basado en conocimientos inmunológicos, implicados en las respuestas que median inmunidad al patógeno. Hasta el momento no han sido desarrolladas vacunas 100% eficaces en la prevención de la infección contra algún helminto. Esto sugiere que los helmintos poseen moléculas que pueden alterar la respuesta inmune favoreciendo su establecimiento. Contrario a las infecciones intestinales causadas por helmintos donde la RI Th2 participa en la eliminación de los parásitos, el Dr. Terrazas demostró que esta respuesta no se asocia con la eliminación del cisticerco de *T. crassiceps* en una infección extraintestinal (Terrazas et al., 1998), en esta investigación sucede una asociación entre la respuesta Th2 y la reproducción del parásito, sugiriendo que el parásito preferencialmente induce una RI Th2. Por otro lado, se ha demostrado que la infección previa con *T. crassiceps* modifica la inmunidad contra patógenos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* (Rodríguez et al., 1999) y *Vaccinia virus* (Spolski et al., 2002), así como disminuir la eficacia de la vacunación contra *Salmonella typhimurium* (Rubio et al., 1998).

Las investigaciones de nuestro grupo se han enfocado en caracterizar poblaciones involucradas en esta polarización, hasta el momento los resultados muestran poblaciones de macrófagos alternativamente activados (MAA) que suprimen la proliferación de células T de manera contacto dependiente donde están involucrada la interacción PD1/PD-Ls (Terrazas et al., 2005). Estos MAA, están presentes también en otras infecciones por helmintos, como *S. mansoni* entre otros, sin embargo son escasos en patologías como alergias, donde la respuesta inmune es tipo Th2 (Reyes and Terrazas, 2007). Esto sugiere que la activación alternativa de los macrófagos podría involucrar el reconocimiento de moléculas presentes en los helmintos, ya que las citocinas Th2 presentes en alergias no son suficientes para la activación alternativa de los macrófagos.

Hasta ahora no han sido identificadas las moléculas que están involucradas con la inmunomodulación causada por *T. crassiceps*, pero existen investigaciones que demuestran que los antígenos secretados/excretados y los antígenos solubles ricos en carbohidratos participan en estos fenómenos (Spolski et al., 2000), (Gomez-Garcia et al., 2006).

Spolski R.J. et al 2000, demostraron que los antígenos secretados/excretados de *T. crassiceps* tienen la característica de suprimir la proliferación de células T activadas policlonalmente en experimentos *in vitro*. Estos antígenos también tienen la capacidad de reducir la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4, pero no de IL-10 en células de bazo estimuladas con Con-A (Spolski et al., 2000). Por otro lado, nuestro grupo ha utilizado antígenos solubles del cisticerco *T. crassiceps*, los cuales pueden reclutar células mieloides supresoras en el sitio del inóculo y pueden inducir una respuesta Th2 a antígenos heterólogos, este efecto es dependiente de los glicanos presentes en los antígenos (Gomez-Garcia et al., 2006).

### **3. Justificación**

Hasta el momento no existe información sobre la interacción de antígenos de *Taenia crassiceps* o de alguna otra *Taenia* con células dendríticas, se desconoce la importancia que podría tener esta interacción para el desarrollo de una respuesta inmune contra el parásito. Las células dendríticas pueden potencialmente reconocer los antígenos de *T. crassiceps* y estos podrían alterar su función, modulando la respuesta inmune a través de las CDs y llevando hacia una respuesta facilitadora de la infección. Así información derivada de esta investigación generará conocimiento nuevo sobre aspectos básicos en la inmunología y sobre la modulación de la respuesta inmune característica de la infección con *T. crassiceps*, lo cual puede derivar en el desarrollo de diseños mas racionales para vacunas o para inmunomoduladores.

### **4. Hipótesis**

Dadas las observaciones previas, en donde la infección experimental por *Taenia crassiceps* polariza una respuesta inmune a un perfil Th2 se propone que los antígenos derivados de este parásito afecten el funcionamiento de las células dendríticas, lo que podría conferirles la capacidad de favorecer una respuesta Th2 y afectar la respuesta a estímulos pro-inflamatorios mediados por TLRs.

## **5. Objetivo general**

Determinar el efecto de los antígenos secretados excretados (TcES) y totales (TcAg) de *Taenia crassiceps* sobre células dendríticas derivadas de médula ósea.

### **Objetivos particulares**

**V.1.1** Evaluar la expresión de moléculas co-estimuladoras en células dendríticas expuestas a TcES o TcAg.

**V.1.2** Determinar el efecto de TcES o TcAg sobre la producción de citocinas de las células dendríticas.

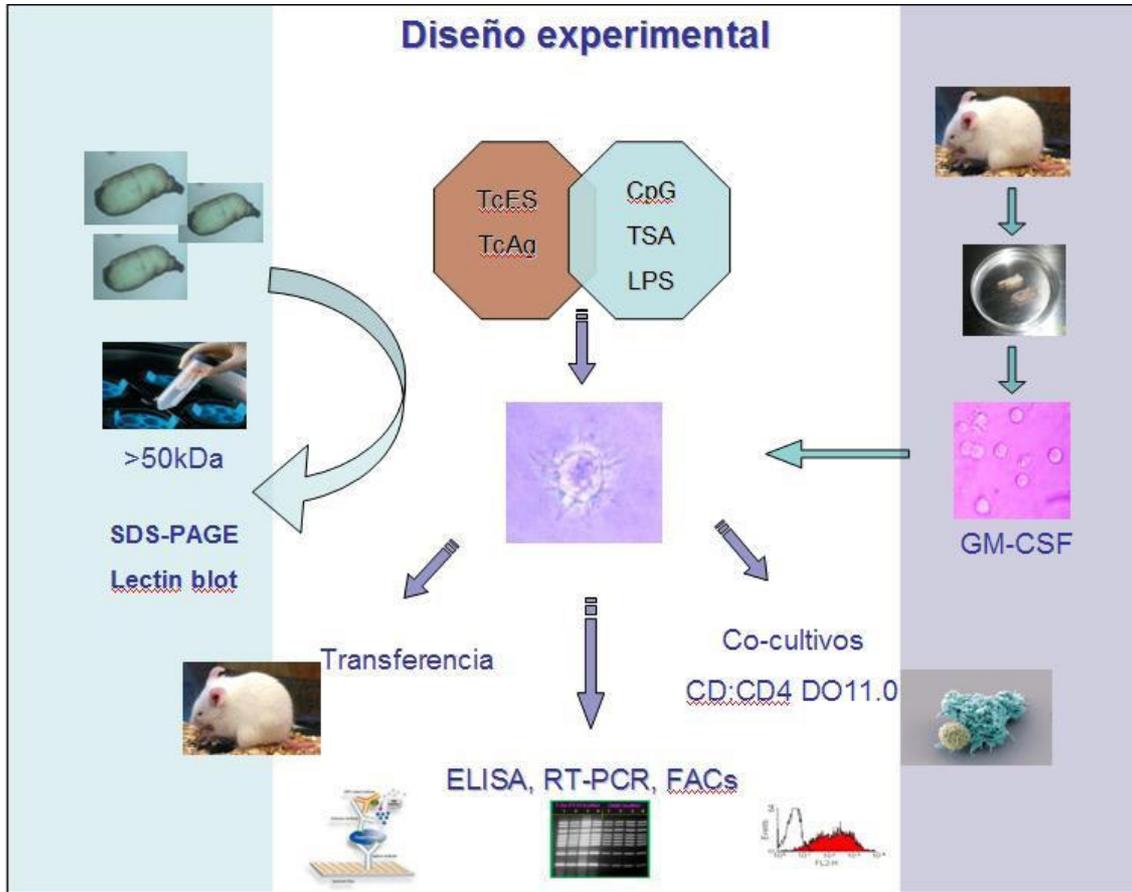
**V.1.3** Evaluar el efecto modulador de los antígenos de *T. crassiceps* sobre células dendríticas expuestas a ligandos pro inflamatorios.

**V.1.4** Evaluar a las células dendríticas expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* como presentadoras de antígeno en presencia de un antígeno no relacionado (OVA).

**V.1.5** Determinar la polarización de la respuesta de linfocitos CD4+ (OVA-específicos) en presencia de células dendríticas expuestas a los antígenos de *T. crassiceps*.

**V.1.6** Determinar si la exposición de células dendríticas a los antígenos de *T. crassiceps* en presencia de un antígeno pro-inflamatorio modifican la respuesta Th1 de linfocitos CD4+ (OVA-específicos).

## 6. Metodología



**Figura 4.** Diseño experimental. Antígenos excretados/secretados y solubles fueron recuperados de cultivos de cisticercos. Células dendríticas fueron diferenciadas a partir de médula ósea y cultivadas durante 5 días. Las CDs fueron estimuladas en el día 5 con antígenos TLR dependientes y/o con antígenos de *Taenia crassiceps*. Los cultivos se mantuvieron 24 horas con los diferentes estímulos, en algunos experimentos las CDs fueron co cultivadas con células CD4+ purificadas de bazo de ratones DO11.10 o transferidas a ratones DO11.10. Los sobrenadantes de los cultivos fueron analizados por ELISA sándwich, mientras que las células se analizaron por RT-PCR o citometría de flujo.

## **6.1 Obtención de antígenos.**

### **6.1.2 Antígeno excretado/secretado de *Taenia crassiceps* (TcES).**

Se utilizaron metacestodos de 2 a 3 mm de diámetro de *T. crassiceps*, cepa ORF, mantenidos mediante inoculaciones intraperitoneales según Freeman (1962), fueron extraídos de la cavidad peritoneal de hembras BALB/c infectadas durante 8 semanas. Las fases larvarias de *T. crassiceps* fueron lavadas tres veces con solución salina estéril y posteriormente se mantuvieron en cultivo D-MEM con 5% estreptomina y sin suero fetal en proporción 1:3 v/v, los cultivos de cisticercos fueron incubados en estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C durante 24 horas. Al tiempo indicado el cultivo fue recuperado en tubos de 15 ml y fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado en un tubo concentrador con membrana de corte 50 kDa (Millipore), se centrifugó a 5000 g por 30 minutos, la fase concentrada con peso molecular mayor a 50 kDa fue recuperada y filtrada en esterilidad (0.2 µm) y congelado en alícuotas a -20°C. La concentración de proteínas fue determinada por Bradford y el peso molecular por SDS-PAGE.

### **6.1.3 Antígeno soluble de *Taenia crassiceps* (TcAg).**

Los antígenos totales (TcAg) fueron obtenidos por homogenización de 10 ml de metacestodos de *T. crassiceps* obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones hembra BALB/c después de 2 a 4 semanas de infección, fueron lavados previamente con solución salina estéril. Se usó un homogenizador (Polytron, Kinematica, Newark, NJ, USA) en el cual se usaron 2 ciclos de 3 s cada uno. Los homogenizados fueron centrifugados a 20 000 g durante 20 minutos a 4°C, los sobrenadantes conteniendo los antígenos solubles fueron congelados a -70°C para su uso posterior. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y el contenido de carbohidratos se midió por el método de antrona.

### **6.1.4 Deglicosilación de antígenos solubles de *Taenia crassiceps*.**

La modificación de los glicanos del antígeno total, mediada por metaperiodato de sodio, fue realizada usando una modificación de Tawill *et al.* 2004. 2 mg/ml de antígeno total fueron incubados durante pocos segundos (v/v) con 50 mM de acetato de sodio pH 4.5 (buffer de acetato de Na) a temperatura ambiente. La muestra fue dividida en dos para producir un tratamiento con periyodato del antígeno soluble de *T. crassiceps* (meta) y un control (mock) del tratamiento con periyodato del antígeno soluble de *T.*

*crassiceps*. 20 mM de metaperyodato de sodio (v/v) se añadió al antígeno (meta), mientras que el mock se agregó buffer de acetato sin metaperyodato de sodio, ambos tubos se incubaron 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente con agitación suave. La reacción se completó con la incubación de los tubos con 100 mM de boro hidróxido de sodio en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de sales se removió usando Amicon Ultra Filter Units (Millipore, Billerica, MA, USA), y la concentración de proteína fue determinada por Bradford.

#### **6.1.5 Antígeno soluble de *Toxoplasma gondii* (TSA).**

La cepa RH de *Toxoplasma gondii* fue mantenida por pasajes seriales en la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6. Para la preparación del antígeno del parásito, se obtuvieron taquizoitos de cultivos *in vitro* en células Vero como previamente se describió (Saavedra R., 1991). Un billón de taquizoitos fueron suspendidos en 5 ml de PBS, fueron sonicados en hielo por 5 minutos a 40 W con el homogenizador ultrasónico serie 4710 (Cole-Parmer, Chicago, Ill) y fue centrifugado a 10,000 g a 48°C por 30 minutos. El sobrenadante fue recuperado, filtrado en esterilidad (0.22 mm) y congelado en alícuotas a -20° C. La concentración proteica fue determinada por el ensayo de proteína Bio-Rad, con albúmina usada como estándar.

#### **6.1.6 Antígenos TLR dependientes.**

Para estimular a las células dendríticas con estímulos pro inflamatorios se usó lipolisacárido (LPS) (Sigma), CpG y antígenos de *Toxoplasma gondii* (TSA). La unión de estos antígenos a la célula dendrítica es mediada por TLR4, TLR9 respectivamente. El TLR que reconoce TSA aún está en controversia, pero podrían estar involucrados TLR2 y TLR11, experimentos recientes muestran que la vía de señalización por la cual TSA induce la producción de IL-12 por las CD es MyD88 dependiente, una característica de señalización que comparten la mayoría de los TLRs.

#### **6.1.7 Cuantificación de proteínas.**

Se preparó una curva estándar de soluciones de albúmina de suero bovino en los límites de 0.1 a 1 mg/ml. Después se distribuyeron alícuotas de 95 µl del reactivo de ensayo de proteína en los pozos de una placa de fondo plano. Se añadieron 50 µl de la muestra de proteína (por duplicado) o 50 µl del estándar de albúmina de suero bovino (por duplicado) en cada pozo y se adicionaron 50 µl del reactivo de Bradford. Luego se mezcló

la solución en cada pozo con micropipeta y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Por último se determinó la absorbancia a 570 nm con un lector de placas (Termo Labsystems, Multiskan Ascent). Se calculó una curva de regresión lineal y se calculó la concentración de las muestras desconocidas. (Bradford, 1976).

### 6.1.8 Cuantificación de carbohidratos.

Para determinar la concentración de carbohidratos presentes en los TcAg se utilizó el método de antrona. En tubos de ensayo se preparó la curva patrón con una solución de azúcares de 200 µg/ml de la siguiente manera:

Tubo	Concentración (µg/ml)	Solución de Glucosa 200 µg/ml	H <sub>2</sub> O (µl)
1	200	1000	25
2	150	750	500
3	100	500	625
4	75	375	750
5	50	250	875
6	25	125	1000
7	0	0	750
8	Problema	.25	

Posteriormente se enfriaron los tubos durante 15 minutos a 4°C y transcurrido este tiempo se adicionaron 2 ml de la solución de antrona y se agitó en el vórtex con precaución.

Al terminar la agitación, se incubó a ebullición (92° C) durante 8 minutos tapando los tubos con esferas de vidrio. Al finalizar se detuvo la reacción enfriando los tubos en baño de hielo y se dejaron en reposo alejados de la luz durante 30 minutos. Por último se midió la densidad óptica a 585 nm de la curva, se realizó la gráfica de regresión lineal y se calculó la concentración de las muestras desconocidas con la curva.

### 6.1.9 SDS-PAGE

Para determinar el peso molecular (PM) de los antígenos TcES, y para determinar si el tratamiento con metaperyodato afecta las proteínas en TcES, se realizó electroforesis desnaturizante en gel discontinuo. Para preparar los geles se vertieron los siguientes volúmenes de reactivos en un tubo de 15 ml.

Gel separador 10ml 7.5%		Gel concentrador 5ml	
Acrilamida-bis 30%	2.5 ml	Acrilamida-bis 30%	0.67 ml
Tris base pH 8.8	2.5 ml	Tris base pH 8.8	1.25 ml
SDS 20%	50 µl	SDS 20%	25 µl
Agua bidestilada	4.86 ml	Agua bidestilada	3 ml
Temed	6.5 µl	Temed	5 µl
Persulfato NH <sub>4</sub> 10%	100 µl	Persulfato NH <sub>4</sub> 10%	80 µl

Se vertieron 5 ml de gel separador en el cassette de electroforesis (Biorad), para homogenizar la superficie del gel se añadió 1 ml de isopropanol. Después de la polimerización se retiró el isopropanol y se vertió el gel concentrador hasta llenar el cassette, finalmente se colocaron los peines. Después de polimerizar, los cassettes se colocaron en la cámara electroforética. Se vertió buffer de corrida (Apéndice I) hasta llenar el interior de la cámara. Posteriormente se añadió 30 µl de muestra en cada pozo y 5 µl de indicador de peso molecular (Fermentas). Las muestras fueron previamente mezcladas con buffer de muestra 1 x, y hervidas durante 5 minutos. Finalmente la electroforesis se llevó a cabo con una carga de 90 v durante 90 minutos.

La tinción se realizó con azul de Coomassie en un gel durante 20 minutos, el gel restante se utilizó para realizar lectin blot. El primer gel se lavó con solución desteñidora durante toda la noche. La imagen fue digitalizada mediante un escáner.

### 6.2 Generación de células dendríticas derivadas de médula ósea.

Para obtener células de médula ósea se utilizaron ratones hembras sanas de la cepa BALB/c o STAT 6-/- de 8 a 15 semanas de edad, mantenidos en condiciones estériles en el bioterio de la FES-Iztacala, UNAM. Fueron sacrificadas en una cámara de cloroformo, se disecaron tibia y fémur de ambas extremidades, fueron mantenidas 5 minutos en etanol al 75% en una caja Petri para su desinfección, después los huesos

disecados se lavaron con solución salina en otra caja Petri. Se obtuvo la médula ósea inyectando solución salina en uno de los extremos del hueso con una jeringa y la solución se recuperó en una caja Petri estéril. Las células en suspensión fueron colectadas en tubos de 15 ml y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente, la pastilla se resuspendió y posteriormente se trató con 3 ml de solución hemolizante durante 10 minutos para eliminar los eritrocitos. Se centrifugaron por 5 minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida en un 1 ml de medio D-MEM (Gibco, suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10% SFB y estreptomina) para realizar el conteo celular. Se tomaron 20  $\mu$ l de muestra y 20  $\mu$ l de azul tripano (Sigma Chemical Co.), se homogeneizó la suspensión y se tomaron 10  $\mu$ l para colocarlos en la cámara de Neubauer, fueron contados 5 cuadrantes y se consideraron como viables células azul tripano negativas, para obtener la concentración de células/ml. Posteriormente se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml, después de ser ajustadas, se agregaron 20 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos (GM-CSF), y se procedió a colocar 5 ml en placas de 6 pozos (B.D. Falcon), se mantuvieron en cultivo durante 8 días en un incubador a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub>. El día 3 se agregaron 5 ml de medio D-MEM suplementado y 20 ng/ml GM-CSF (R10), en el día 6, se obtuvo la mitad del sobrenadante, fue centrifugado 2500 rpm por 5 minutos, se resuspendió la pastilla en 5 ml D-MEM con 20 ng/ml de GM-CSF y fueron regresados a su pozo original. En el día 8, se colectaron las células no adherentes de los cultivos, fueron lavadas y utilizadas como células dendríticas inmaduras para los experimentos.

### **6.2.1 Purificación de células dendríticas (CD11c+)**

En el día 5 a 8 de cultivo, fueron colectadas las células no adherentes de los cultivos de médula ósea, y fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos, al finalizar la pastilla fue resuspendida en 1ml de buffer de separación y se agregó 10  $\mu$ l de esferas magnéticas anti CD11c (MACS, Miltenyi Bistec, CA, USA) por  $10^7$  células y se incubaron a 4° C durante 20 min. Al tiempo cumplido se aforo a 5 ml con buffer de separación (Apéndice I), posteriormente se centrifugó para eliminar las esferas que no se adhirieron y para concentrar las células. La pastilla se resuspendió en 2 ml de buffer de separación.

La columna magnética de separación MACS se limpió con 2 ml de buffer de separación, al pasar completamente el buffer, se hizo pasar la suspensión de células derivadas de médula ósea por la columna, se recuperó el eluido en un tubo de 15 ml

estéril y nuevamente se pasó por la columna, al finalizar la columna se retiró del magneto y se lavó con 4 ml de medio D-MEM para recuperar las células CD11c+ en un tubo de 15 ml. Las células viables se contaron por exclusión con azul tripano en una cámara de Neubauer.

### **6.2.2 Estimulación de células dendríticas *in vitro*.**

Las CDs fueron colectadas en el día 8, se ajustaron a  $1 \times 10^6$  cel/ml en medio completo suplementado con 10 ng/ml de GM-CSF (R10), se colocaron 50  $\mu$ l de la suspensión por pozo, en una placa de 96 pozos (B.D. Falcon) y fueron estimuladas con CpG 1  $\mu$ g/ml, LPS 1  $\mu$ g/ml, Antígeno de *Toxoplasma gondii* (TSA) 5  $\mu$ g/ml, solos o en combinación con antígeno secretado/excretado (TcES), antígeno total (TcAg), antígeno total tratado con metaperyodato (pTcAg), o el control del antígeno total tratado con metaperyodato (mTcAg). Como control se usaron CDs sin estimular. En algunos experimentos se utilizó ovoalbúmina (OVA), como antígeno no relacionado a una concentración de 1  $\mu$ g/ml. 24 horas después, los sobrenadantes fueron colectados para la cuantificación de citocinas por ELISA y las células fueron cosechadas para el análisis de expresión de moléculas co-estimuladoras por FACS.

### **6.3 Co-cultivos células dendríticas y linfocitos CD4 DO11.10**

Para la evaluación de activación de células T por las CDs, se obtuvieron células CD4+ de bazo de ratones sanos transgénicos DO11.10, los cuales están diseñados con un TCR específico para OVA (DO11.10). Las células fueron seleccionadas positivamente usando esferas magnéticas anti CD4. Las células purificadas fueron ajustadas a  $1.5 \times 10^6$  cel/ml en medio completo. Las CDs fueron resuspendidas a  $5 \times 10^5$  cel/ml en R10 (Apéndice I) con TcES (20  $\mu$ g/ml), TcAg (20  $\mu$ g/ml), pTcAg (20  $\mu$ g/ml) y/o LPS (1  $\mu$ g/ml), TSA (2  $\mu$ g/ml). Todos los tratamientos fueron estimulados con 1  $\mu$ g/ml de OVA al mismo tiempo. 24 horas después, las CDs fueron lavadas 2 veces y sembradas 100  $\mu$ l en una placa de 96 pozos ( $5 \times 10^5$  cel/ml), a continuación se adicionaron las células CD4+ en una proporción 1:4 CD:CD4+.

#### **6.3.1 Obtención células de bazo.**

Se obtuvo el bazo de ratones hembras BALB/c DO11.10. Se perfundieron con 5 ml de solución salina fría a través del bazo recuperando las células en una caja Petri. Los eritrocitos fueron eliminados por choque osmótico inducido por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  durante 5 minutos,

las células fueron centrifugadas 10 minutos a 2500 rpm, entonces fueron resuspendidas en 2 ml de solución salina, para el posterior análisis de proliferación celular se marcaron con 1  $\mu$ l de CFSE por  $1 \times 10^7$  células y se mantuvieron durante 15 minutos a 4 ° C, después fueron lavadas dos veces con solución salina, contadas y seleccionadas las CD4+ por esferas magnéticas. Después de 24 horas de la estimulación de las CDs, fueron añadidas células CD4+ en relación 1:4, y se mantuvieron en cultivo por 3 días.

### **6.3.2 Selección de CD4+ y proliferación celular.**

Mediante columnas magnéticas de separación, se purificaron células CD11c+ del cultivo de médula ósea de ratones BALB/c y células CD4+ de bazo de ratones DO11.10. Fueron separadas por medio de anticuerpos con esferas magnéticas dirigidos hacia estos marcadores específicos de células dendríticas y linfocitos T respectivamente.

La evaluación de proliferación celular se llevó a cabo adicionando carboxifluoresceína diacetato succimidyl ester (CFSE) a las células CD4+ en una concentración de 0.5  $\mu$ M de CFSE (Apéndice II).

## **6.4 Transferencia de células dendríticas a ratones DO11.10**

Para investigar si el fenotipo de las CDs estimuladas con los antígenos de *T. crassiceps* eran capaces de iniciar una respuesta adaptativa *in vivo*, las CDs se cargaron con OVA y con antígeno total de *T. crassiceps* o LPS, después de 24 horas del tratamiento, las CDs fueron lavadas 3 veces en solución salina centrifugándolas a 2500 rpm por 5 minutos, al finalizar las células se ajustaron a  $1 \times 10^5$  CDs/ml en solución salina estéril, y posteriormente fueron inyectadas en el cojinete plantar de ratones hembras DO11.10.

### **6.4.1 Obtención de suero.**

Seis días después de la transferencia de las CDs, los ratones fueron anestesiados en cámara de cloroformo, y por medio de punción cardiaca se extrajo la cantidad de sangre necesaria, se colectó en tubos eppendorf y se dejó coagular por 5 horas, se centrifugó y finalmente se recuperó el plasma y se almacenó – 70° C hasta su posterior análisis.

### **6.5 Análisis de moléculas co-estimuladoras por citometría de flujo**

Al tiempo indicado las CDs y/o CD4+, fueron obtenidas de los cultivos, concentrándolas por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos, se ajustaron en 1 ml de buffer para FACs (Apéndice ), las células fueron contadas en cámara de Neubauer y ajustadas a  $1 \times 10^6$ /ml y se centrifugaron nuevamente, la pastilla se resuspendió en 200  $\mu$ l del mismo buffer. Se agregaron los anticuerpos conjugados con distintos marcadores de fluorescencia y un anticuerpo isotipo (IgG2a) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2  $\mu$ g/ml, se mantuvo en incubación durante 30 minutos a 4° C, las células fueron lavadas dos veces con buffer para FACs. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500  $\mu$ l de Facs Flow, y se analizaron en el citómetro. (FACs Calibur).

### **6.6 Análisis de citocinas por RT-PCR**

En los cultivos celulares de células dendríticas, de co-cultivos o de células de ganglio linfático, al finalizar el tiempo indicado de tratamiento, se obtuvieron las células y se agregaron 100  $\mu$ l de trizol por pozo, se mantuvieron a -70°C hasta la extracción de RNA.

La extracción de RNA se llevó a cabo en una campana para PCR en condiciones estériles y con material libre de DNAsas. Para la extracción de RNA se descongelaron las muestras y se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml. de trizol, se agitaron en el vórtex y se mantuvieron en reposo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 13500 rpm durante 12 minutos, al finalizar el sobrenadante fue recuperado y se puso en tubos eppendorf con 500  $\mu$ l de isopropanol frío. Se agitó en el vórtex y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente, después se centrifugó 13500 rpm durante 15 minutos y se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 75% a 13500 rpm durante 5 minutos, al terminar se dejó evaporar en la campana durante 20 minutos, al final se agregaron 20  $\mu$ l de agua mQ y las muestras se congelaron a -70° C para su posterior uso.

### **Cuantificación de RNA**

La cuantificación se realizó utilizando una dilución 1:200 de muestra de RNA en H<sub>2</sub>O mQ (irradiada, filtrada a 0.022 micras, sin sales y libre de nucleasas). Previamente el espectrofotómetro se calibró con agua grado molecular (mQ) a una longitud de onda de 260-280nm, posteriormente se leyeron las muestras, la concentración final se obtuvo con el factor 1 D.O. = 40  $\mu$ g.

### **Transcripción reversa para obtener DNA complementario (cDNA).**

Se utilizó el kit First Strand Synthesis Superscript II (In vitrogen), se utilizaron 3 µg de RNA total ajustados a 10 µl con agua mQ, el procedimiento se llevó a cabo en condiciones estériles en campana para PCR.

Se realizó la mezcla de los componentes del kit en tubos libres de RNAsas de 0.2 ml con los siguientes volúmenes:

10 mM dNTP mix                      1 µl

Oligo (dT) (0.5 µg/µl)                1µl

Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 65°C en el termociclador (Corbett Research), al finalizar, los tubos se colocaron 1 minuto en hielo. Después de este periodo a cada tubo se le adicionó los siguientes componentes con el volumen indicado:

Buffer 10X RT                              .1µl                              0.1 M DTT                              1 µl

25 mM MgCl                                2 µl                                Inhibidor de RNAsa                    0.5µl

H<sub>2</sub>O (Sigma)                                4.5µl

Los tubos se agitaron en el vórtex brevemente y se incubaron 2 minutos a 42°C, para posteriormente adicionar a cada reacción 1 µl de enzima Superscript II RT (50 unidades), se incubó por 50 minutos a 42°C. Para finalizar la reacción los tubos se incubaron a 70 °C durante 15 minutos al terminar este periodo se colocaron en hielo por 5 minutos. Para finalizar, se agregó a cada tubo 1 µl de enzima degradadora de RNA (RNase H) y se incubó a 37°C por 20 minutos. Finalmente los tubos se almacenaron a -70°C para su uso posterior.

### **Cuantificación de cDNA**

El cDNA obtenido se cuantificó realizando una dilución 1:200 de la muestra en agua grado molecular, fue leído en un espectrofotómetro (Jenway) a una longitud de onda de 260 – 280 nm y se almacenó a –70° C hasta su posterior análisis.

## Amplificación de cDNA

La concentración de cDNA se ajustó a 50 ng/ml, para realizar un análisis de las diferencias entre los diferentes tratamientos, se amplificaron los genes IL-4, IFN- $\gamma$ , GAPDH.

Las reacciones se prepararon en tubos nuevos y libres de DNAsas con 0.2 ml de capacidad. Las mezclas se llevaron a un volumen final de 25  $\mu$ l con las siguientes concentraciones:

Buffer 10x	2.5 $\mu$ l
MgCl (25mM)	1 $\mu$ l
DNTP mix (2mM)	2 $\mu$ l
Primer F (15pM)	1 $\mu$ l
Primer R (15pM)	1 $\mu$ l
cDNA (50ng/ml)	1 $\mu$ l
Taq polimerasa (5u/ $\mu$ l) (Platinum, In vitrogen)	0.2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O mQ (Sigma)	16.3 $\mu$ l

### 6.6.1 Electroforesis en gel de agarosa.

Se utilizó un Agarosa (ICN Biochemicals) 1.5 % en Buffer TBE 1x (Apéndice 1). Se colocó por pozo 3  $\mu$ l de muestra previamente diluida en 3  $\mu$ l buffer de carga blue juice y 1  $\mu$ l de Sybr-Green (In vitrogen) a partir del segundo pozo. En el primer pozo se colocó 2  $\mu$ l del marcador de peso molecular de 100pb (In Vitrogen).

Las muestras se colocaron en la cámara hacia el extremo positivo y la electroforesis se llevo a cabo a 90 Volts durante 45 minutos. El gel se observó en un transiluminador con luz UV (FujiFilm FLA-5000) y se capturó la imagen utilizando el programa ImageReader FLA-5000 V 2.1.

## **6.7 Determinación de citocinas por ELISA**

Los sobrenadantes de los cultivo celulares fueron analizados por medio de ELISA Sándwich para la detección de citocinas secretadas, se utilizaron kits Peptotech para la detección de IL-1b, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, IL-12, IL-15 y TNF- $\alpha$ .

### **Sensibilización de la Placa.**

El anticuerpo de captura se diluyó a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  en 10 ml de PBS (Apéndice I). Se agregó 100  $\mu\text{l}$  de la dilución del anticuerpo a cada pozo de una placa para ELISA de 90 pozos (Maxisorb), la placa se cubrió para prevenir la evaporación y se mantuvo en incubación toda la noche a 4° C.

### **Bloqueo.**

La placa se llevó a temperatura ambiente y se removió el anticuerpo de captura, para bloquear las uniones no específicas se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de buffer de bloqueo (Apéndice I) por pozo. Se cubrió la placa y se mantuvo a temperatura ambiente 2 horas, al tiempo cumplido la placa se lavó 3 veces con PBS/Tween (Apéndice I).

### **Curva y Muestras**

Se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de sobrenadante de los diferentes cultivos celulares en cada pozo. Para extrapolar los valores de densidad óptica se realizó una curva patrón con la correspondiente citocina recombinante murina, con diluciones al doble para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras líneas de cada placa, diluidas en solución de bloqueo. Las curvas se iniciaron de una concentración de 50 ng hasta 0.01 ng. Finalmente la placa se incubó toda la noche a 4° C. Finalmente se lavó 4 veces con PBS/Tween.

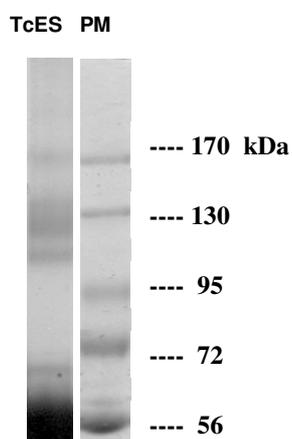
### **Detección**

El anticuerpo biotinilado se diluyó a 1  $\mu\text{g/ml}$  en buffer de bloqueo. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la dilución a cada pozo, la placa se cubrió y se incubo durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó 4 veces con PBS/Tween. La avidin-peroxidasa se diluyó 1:4000 en buffer de bloqueo, y se agregaron 100  $\mu\text{l}$  por pozo. La placa se cubrió y se incubo durante 30 minutos, se lavó 5 veces con PBS/Tween. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3%) a 11 ml. de ABTS y se mezcló. Inmediatamente se colocó 100  $\mu\text{l}$  de la mezcla a cada pozo. Se mantuvo a temperatura ambiente hasta desarrollar color (5-30 minutos). Finalmente la placa fue leída a una longitud de onda de 405 nm.

## 7. Resultados

### Antígenos secretados/excretados de *Taenia crassiceps* (TcES).

Previamente se ha demostrado un efecto de supresión de proliferación celular de los antígenos secretados/excretados de *T. crassiceps* (Spolski, et al. 2000). Sin embargo, no existen datos que indiquen los mecanismos que influyen en este efecto. En reportes recientes se han estudiado los efectos de los productos secretados/excretados de diferentes helmintos sobre la modulación de las CDs (Whelan et al., 2000; Balic et al., 2004). En este trabajo, se decidió investigar si los productos secretados/excretados por la fase larvaria del helminto *Taenia crassiceps* (TcES) pueden modificar el fenotipo de las células dendríticas. Se cuantificó la concentración de proteínas y se determinó el peso molecular del contenido proteico.

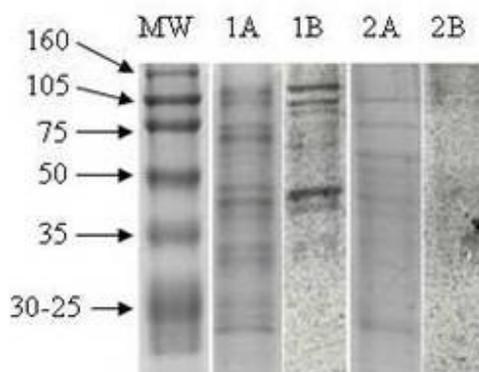


**Figura 5.** SDS-PAGE de antígenos secretados/excretados de *T. crassiceps* (TcES). PM, marcador de peso molecular. Los TcES fueron obtenidos después de 24 horas de cultivo, los antígenos fueron concentrados en tubos con membrana de corte de 50kDa, en la figura se muestran las proteínas con PM mayor de 50 kDa.

Los TcES obtenidos de *T. crassiceps* muestran al menos cinco bandas proteicas bien definidas. La banda más evidente tiene un peso aproximado de 64 kDa, de acuerdo con el grupo del Dr. Kuhn esta banda es positiva en Western blot para albúmina (Aldridge et al., 2006); sin embargo no excluimos la posibilidad de que se encuentren otras moléculas en el mismo rango de peso molecular para lo cual es necesario realizar una electroforesis de doble dimensión. Por otro lado, después de la concentración del antígeno observamos tres bandas con PM > 100 kDa.

### Los antígenos solubles de *Taenia crassiceps* contienen carbohidratos.

Se ha demostrado que los helmintos parásitos poseen una gran cantidad de glicoproteínas, con la finalidad de conocer la proporción de carbohidratos presentes en la fracción soluble obtenida a partir de los metacéstodos de *T. crassiceps*, se realizó un análisis de estas moléculas por el método de antrona paralelo a la determinación de proteínas. Se encontró que los carbohidratos en los antígenos de *T. crassiceps* son más abundantes que las proteínas, en una proporción 4:1 (carbohidratos:proteínas) como lo reportó Gómez-García *et al* en el 2005.

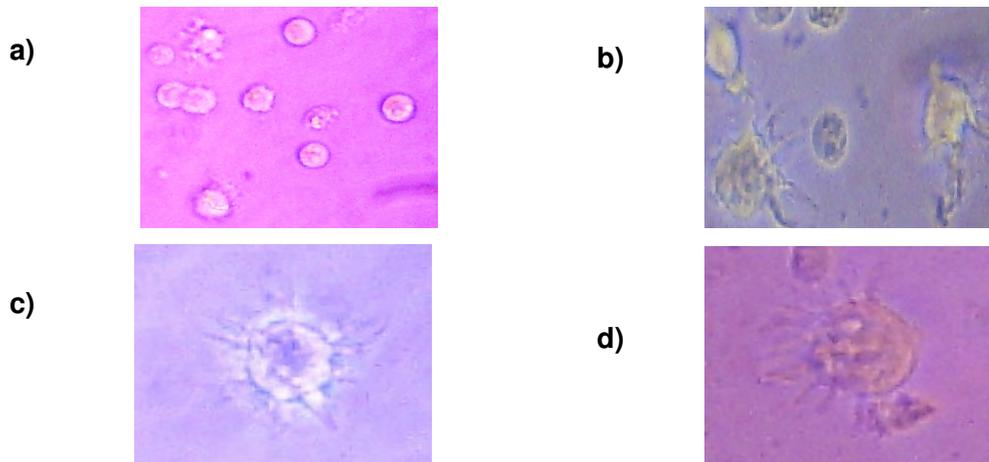


**Figura 6.** Los antígenos solubles de *Taenia crassiceps* contienen glicoproteínas. Análisis SDS-PAGE (1A, 2A) y lectin-blot (1B, 2B) de los extractos solubles de *T. crassiceps* tratados con mock (mTcAg); con peryodato de sodio (pTcAg) y antígeno intacto (TcAg). Los antígenos fueron separados por SDS-PAGE y transferidos a hojas de nitrocelulosa que fueron usadas para detectar glicanos N-linked con peroxidasa (HRP) conjugada con Con-A (Gomez-Garcia et al., 2006).

Para alterar la estructura conformacional de los glicanos de TcAg, se realizó tratamiento con peryodato de sodio (Okano et al., 1999; Tawill et al., 2004). En la figura 1 se muestra un análisis PAGE (Línea 1A) y lectin-blot (Línea 1B) de los antígenos solubles de los metacéstodos de *T. crassiceps* antes del tratamiento con peryodato, donde se puede observar la presencia de proteínas y glicanos respectivamente. Para comprobar la alteración de los glicanos después de llevar a cabo el tratamiento con peryodato se realizó nuevamente SDS-PAGE y lectin-blot. De acuerdo al análisis SDS-PAGE (Línea 2A) se observa que el tratamiento con peryodato no desnaturalizó la columna proteica de las glicoproteínas del parásito. En el lectin-blot (Línea 2B), se muestra la alteración de la estructura de los glicanos ya que es negativo para Lectin blot.

### Diferenciación de células dendríticas de médula ósea.

Las CDs pueden diferenciarse a partir de linajes mieloides y linfoides de células madres pluripotenciales de médula ósea (Steinman, 1991). En los últimos años estas células han retomado gran importancia debido a su capacidad de activar a células T vírgenes. Sin embargo, los estudios con CDs son difíciles ya que son una población rara en los tejidos del cuerpo y los procedimientos para aislarlas llevan mucho tiempo (Williams et al., 1994). En ratón solo es posible obtener alrededor de  $6 \times 10^4$  células de Langerhans de una oreja (Ortner et al., 1996). Para la obtención de mayor cantidad de CDs, nosotros diferenciamos CDs *in vitro* a partir de precursores de médula ósea agregando al medio de cultivo GM-CSF recombinante murino de acuerdo a lo reportado por Lutz *et al.*, 1999.



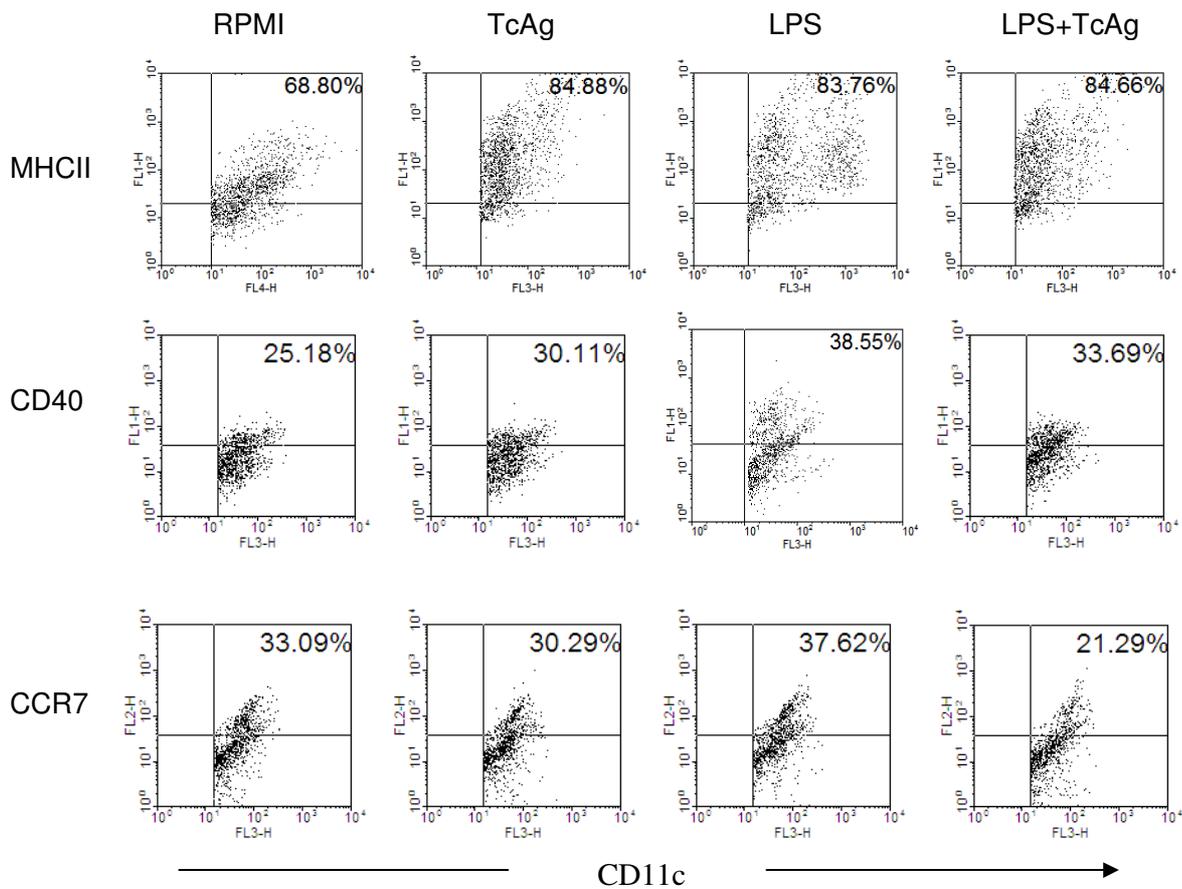
**Figura 7.** Diferenciación de células dendríticas. Células pluripotenciales de médula ósea (a) fueron obtenidas de ratones BALB/c de 8-12 semanas de edad, para diferenciarlas a células dendríticas se utilizó medio R10, después de 5 días de cultivo (fig. 1 b,c,d).

Después de 5 días de cultivo se obtuvieron  $5 \times 10^6$  células por cada ratón, las células mostraron cambios en su fenotipo, se aprecia el aumento de tamaño y el desarrollo de prolongaciones citoplasmáticas como se muestran en la figura 3b. Para confirmar la presencia de células dendríticas se analizaron por citometría de flujo marcadores para identificar CDs como CD11c y MHC-II. El resultado muestra 60% de células CD11c+, con baja expresión de MHC-II, esto indica que las CDs de los cultivos se encuentran en estado inmaduro. En algunos experimentos se purificaron las células CD11c+ obteniendo  $2 \times 10^6$  CDs inmaduras (CD11c+ MHC-II<sub>low</sub>).

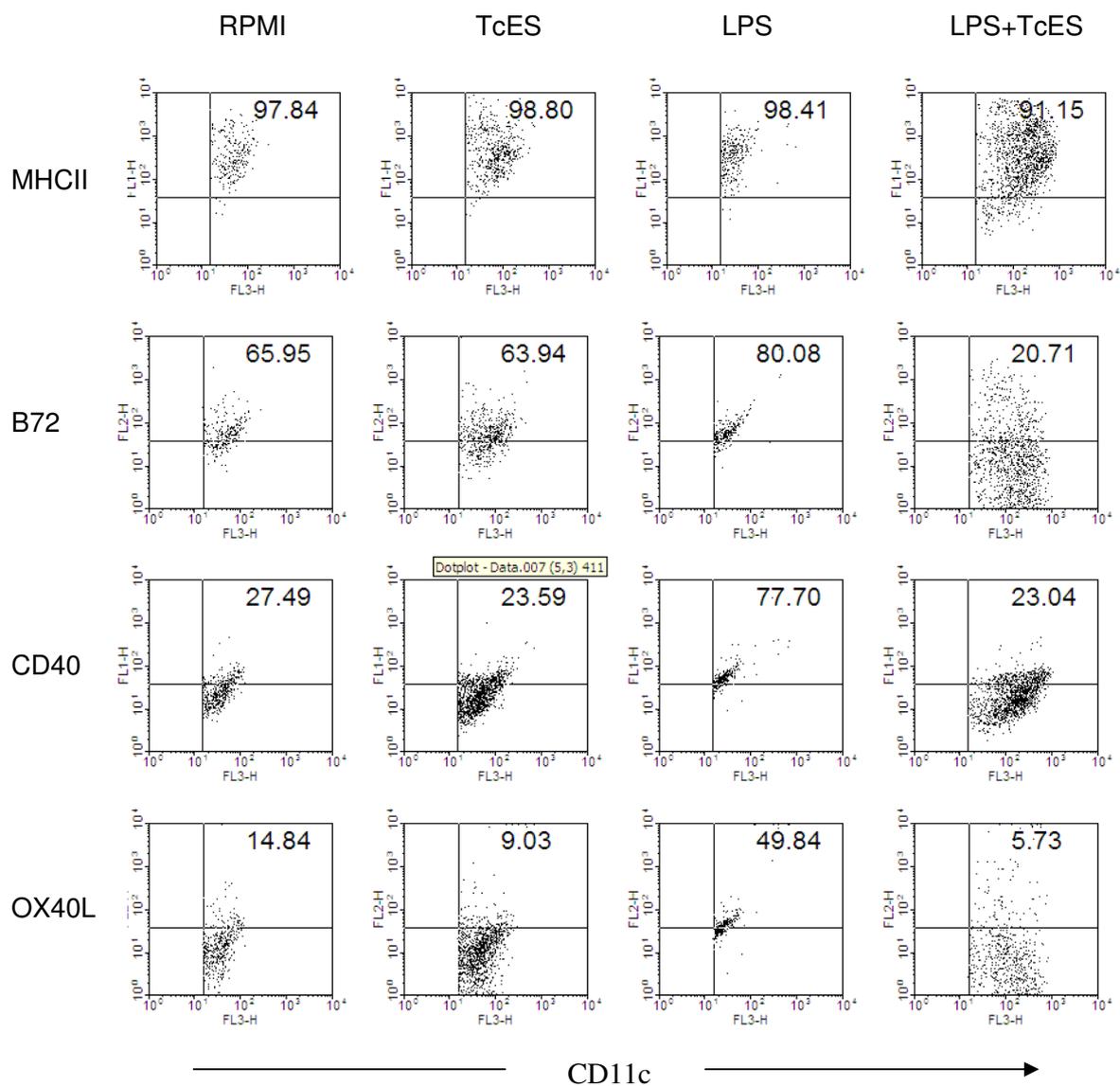
**Las células dendríticas expuestas a TcES expresan de manera selectiva marcadores de activación y modulan la expresión de CD86, CD40 y CCR7 inducida por LPS.**

En el día 5 las células de los cultivos fueron ajustadas a  $10^6$  cel/ml sembrando 100  $\mu$ l por pozo en una placa de 96 pozos, en algunos tratamientos los cultivos fueron enriquecidos por medio de microbeads (Macs) para CD11c. Diferentes moléculas de membrana fueron marcadas en las CDs, posteriormente se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo para identificar cambios en la expresión de moléculas co-estimuladoras.

Para caracterizar el fenotipo de las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia*, analizamos la expresión de moléculas co-estimuladoras de membrana asociados con maduración, en los dotplot se muestran las células limitadas en la región 1 que corresponde a granularidad y tamaño adecuado de células dendríticas y de la región 2, la cual corresponde a células CD11c+.



**Figura 8.** Citometría de flujo de CDs expuestas a antígenos totales de *Taenia* y/o LPS. Las células fueron estimuladas durante 24 horas con medio (RPMI), TcAg (20µg/ml) y/o LPS (1 µg/ml). Los antígenos de *Taenia* no inducen alta expresión de moléculas co-estimuladoras, y modulan la expresión de estas inducidas por LPS.



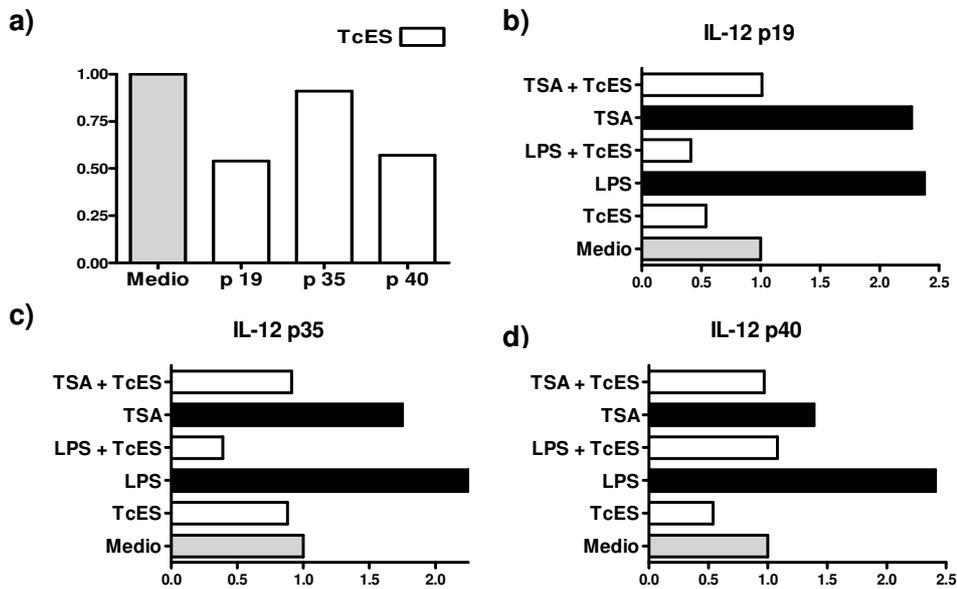
**Figura 9.** Citometría de flujo de CDs expuestas a antígenos secretados/excretados de *Taenia* y/o LPS. Las células fueron estimuladas durante 24 horas con medio (RPMI), TcAg (20µg/ml) y/o LPS (1 µg/ml).

Las células dendríticas expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* expresan niveles basales de CD86 la cual es una molécula co-estimuladora que puede unirse a CD28 en la célula T y señalar para el proceso de activación, y CCR7 el cual es un receptor de quimiocinas y promueve la migración a los ganglios linfáticos. Por otro lado, las CD:TcES expresan CD40, pero no en la manera en que la expresan las CD:LPS. Esta

molécula es necesaria en CDs expuestas a antígenos secretados/excretados por *S. mansoni* para la polarización a Th2 (Jenkins and Mountford, 2005). Además en la infección con *T. crassiceps* los ratones deficientes en CD40 no generan citocinas Th1 o Th2 (Rodríguez-Sosa et al., 2003). Finalmente las CDs expuestas a TcES expresan mayores niveles de MHCII lo cual es una señal de maduración (Sher et al., 2003). Los resultados muestran que los TcES alteran la maduración de las células dendríticas y además pueden modular la expresión de moléculas co-estimuladoras inducidas por LPS.

**Las células dendríticas expuestas a TcES no inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias e inhiben su producción en respuesta a antígenos TLR dependientes.**

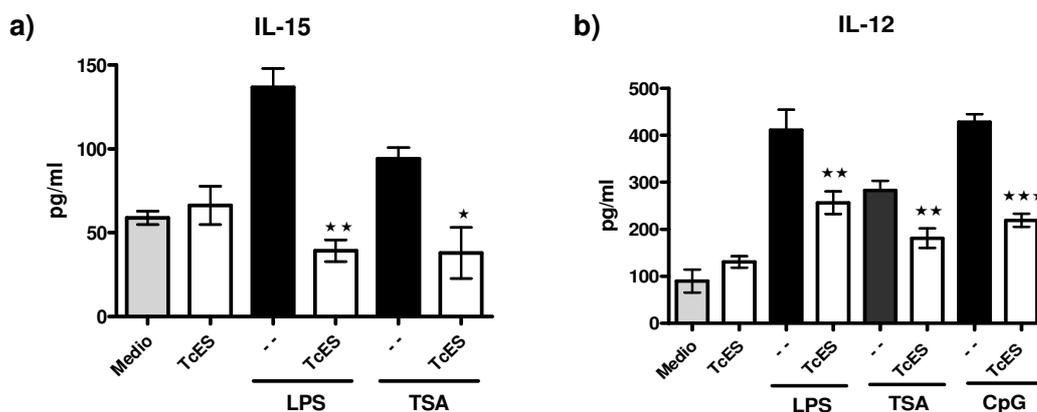
La polarización de una respuesta Th2 por medio de CDs expuestas a antígenos de helmintos se ha atribuido a la deficiencia en la producción de IL-12. Para estudiar la producción de IL-12 de CDs expuestas a TcES se analizaron por RT-PCR en tiempo real las diferentes subunidades de la familia IL-12.



**Figura 10.** RT-PCR en tiempo real de células dendríticas 24 horas después de los estímulos antigénicos. Los TcES no inducen la expresión de ninguna de las subunidades para conformar IL-12 o IL-23 (a). La expresión de subunidades de IL-12 inducida por LPS y TSA es regulada en presencia de TcES (b,d).

Las CD's estimuladas con antígenos de *Taenia* disminuyen la síntesis de mRNA de las diferentes unidades de IL-12 (p19, p35 y p40). El ligando para TLR4 (LPS) y el antígeno MyD88 dependiente (TSA), amplifican la síntesis de IL-12p19, la cual forma con IL-12p40 la molécula IL-23, una citocina conocida por inducir linfocitos Th17 (McKenzie et al., 2006; Yen et al., 2006); también aumenta la síntesis de IL-12p35 la cual se asocia con IL-12p40 para formar la citocina inductora de Th1, IL-12p70 y sobre-expresan IL-12p40. De manera interesante, los antígenos de *Taenia* suprimen la síntesis de IL-12p40, IL-12p35 e IL-12p19 inducida por los antígenos TLR dependientes en las CD's. Estos datos demuestran que los antígenos de *Taenia* pueden interactuar con las CD's para inhibir respuestas inflamatorias dañinas para el parásito, como lo sería una respuesta Th1.

Investigaciones recientes muestran que la secreción de IL-12 es dependiente de la secreción temprana de IL-15 en las CD's ya que IL-15 puede actuar de manera autócrina para estimular a las CD's a producir IL-12 (Ohteki et al., 2006). Por esta razón analizamos la presencia de IL-15 en los sobrenadantes de cultivos de CD's por el método de ELISA.

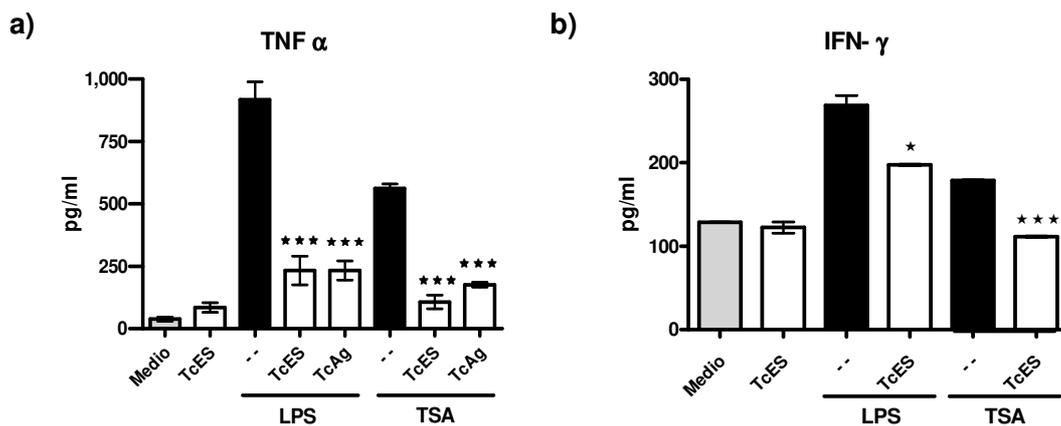


**Figura 11.** Análisis de IL-15 e IL-12p70 en sobrenadantes de cultivos de CD's 24 horas después de la estimulación con los antígenos TLR dependientes (LPS 1, TSA 2.5 o CpG 1  $\mu\text{g/ml}$ ) solos o en combinación con antígenos de *Taenia* (20  $\mu\text{g/ml}$ ). \*,  $p < 0.02$ , \*\*,  $p < 0.005$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ .

En los cultivos de CD's tratadas con TcES los niveles de IL-15 e IL-12p70 no muestran diferencias significativas en comparación con las CD's sin estimular. La secreción de IL-15 inducida por LPS o TSA es inhibida en presencia de TcES, indicando que posiblemente la ausencia temprana de IL-15 resulte en una menor secreción de IL-12.

Los resultados de la prueba de ELISA son consistentes con los resultados obtenidos en el análisis por RT-PCR, donde los TcES no estimulan la producción de IL-12 por las CDs e interfieren, en cambio, con la secreción de IL-12 en respuesta a LPS, CpG y TSA. Esto sugiere que el parásito selectivamente inhibe moléculas que están relacionadas con la eliminación de *T. crassiceps*, posiblemente la carencia de IL-12 sea un factor en el desarrollo de una respuesta Th2.

La señalización por medio de diferentes ligandos para TLRs, tiene como resultado una cascada de señalización intracelular que finaliza con la activación del factor nuclear kB (NFkB) y su subsecuente translocación al núcleo, lo cual permite la transcripción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Para probar si los antígenos de *T. crassiceps* alteran la respuesta de los TLRs en respuesta a LPS o TSA, analizamos sobrenadantes de cultivos de CDs por método de ELISA para TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .



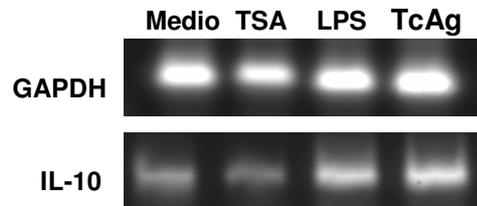
**Figura 12.** Los sobrenadantes de cultivos de CD:TcES muestran niveles basales de producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Los niveles de citocinas pro-inflamatorias inducidos por los antígenos TLR dependientes son reducidos significativamente en presencia de TcES o TcAg. Los sobrenadantes fueron analizados 24 horas después de los estímulos con TcES (20  $\mu$ g/ml) solo o en combinación con LPS (1  $\mu$ g/ml), TSA (5  $\mu$ g/ml) o CpG (1  $\mu$ g/ml) por la técnica de ELISA sándwich. \*,  $p < 0.02$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Los antígenos de *T. crassiceps* no inducen la secreción de citocinas mediadas por la activación de NFkB, esto sugiere que los antígenos de *T. crassiceps* no son reconocidos por TLRs. Por otro lado, la presencia de TcES inhiben la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inducidos por LPS y TSA, lo que sugiere una alteración en la vía de

señalización de los TLRs en presencia de TcES e indican que los antígenos de *Taenia* son reconocidos por las CDs y pueden alterar de alguna forma su funcionamiento, principalmente inhibiendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias.

### Los antígenos de *Taenia* no inducen expresión significativa de IL-10

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina involucrada en la regulación del sistema inmune, funciona inhibiendo la proliferación celular de células del sistema inmune y puede suprimir la síntesis de citocinas pro-inflamatorias. Por ello decidimos investigar el efecto de los antígenos de *Taenia* sobre la producción de esta citocina en las CDs. Sin embargo, no se detectaron niveles de IL-10 por la técnica de ELISA, por lo cual evaluamos la expresión de IL-10 por RT-PCR.

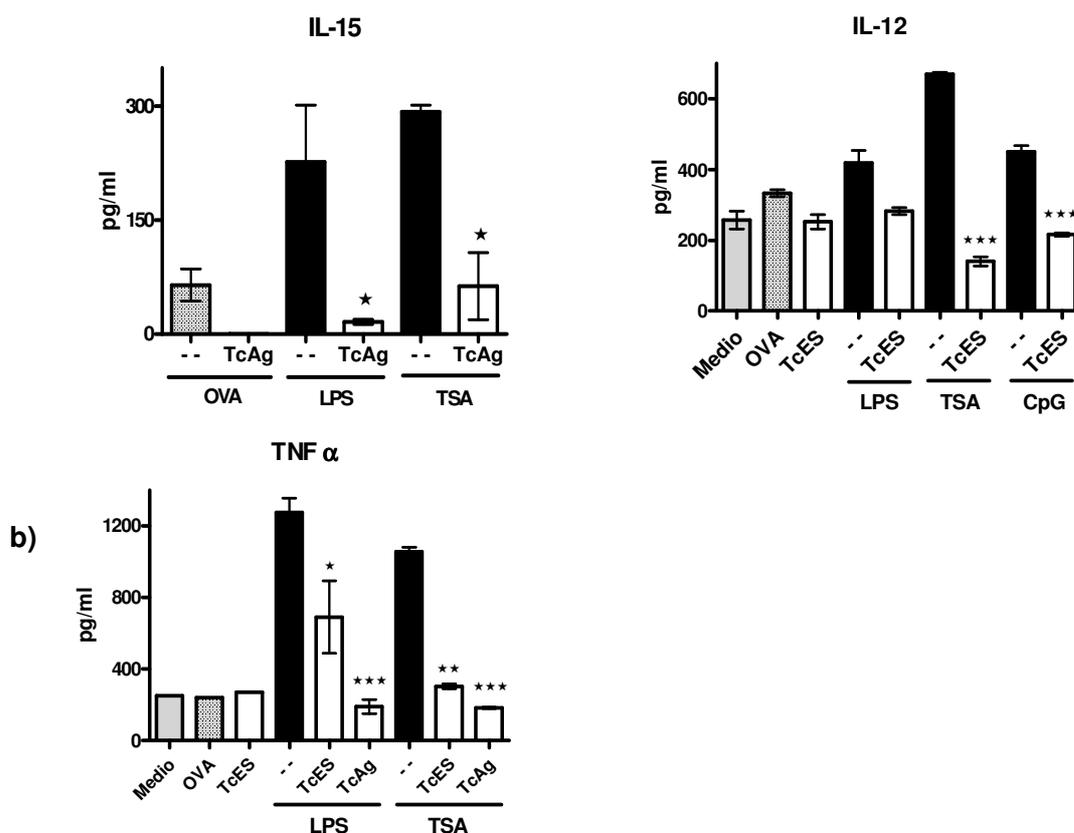


**Figura 13.** RT-PCR de IL-10 de células dendríticas 24 horas después de los diferentes estímulos antigénicos. TcAg aumenta la expresión de IL-10 de manera similar que lo hace el estímulo con LPS.

Los niveles de expresión detectados por RT-PCR muestran un incremento en la expresión de IL-10 en las CDs cultivadas en presencias de TcAg comparadas con CDs sin estímulo. Por otro lado, los niveles de expresión inducidos por TcAg son similares a los inducidos por LPS, el cual es un antígeno pro inflamatorio. Estos datos muestran que la expresión de IL-10 no es exclusiva de las CDs expuestas a TcAg y posiblemente el papel de IL-10 en la inhibición de la secreción de citocinas pro inflamatorias es limitado.

**La presencia de un tercer antígeno no altera el efecto de los antígenos de *Taenia* sobre las células dendríticas.**

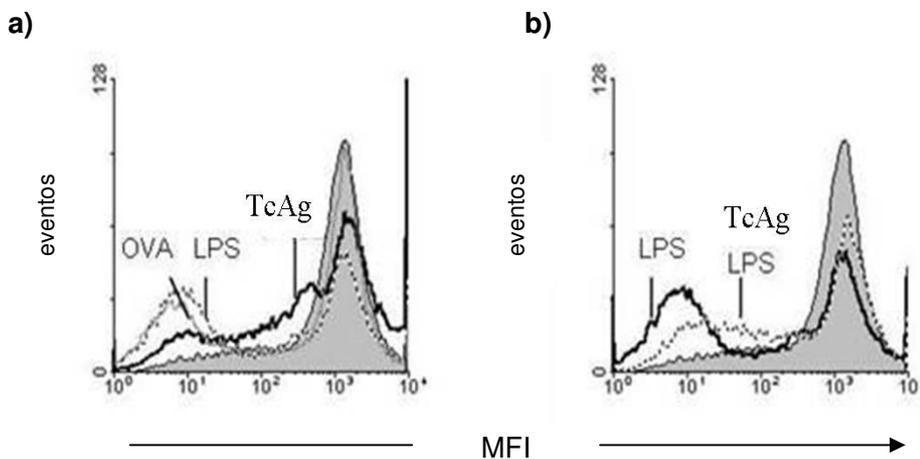
El siguiente paso en nuestra investigación fue estudiar los efectos que tienen las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia* sobre los linfocitos T, para ello utilizamos ratones transgénicos para ovoalbúmina (OVA). Pero antes de iniciar los experimentos determinamos si el efecto de los antígenos se mantenía en las CDs en presencia de OVA.



**Figura 14.** Determinación de concentración de citocinas en sobrenadantes de CDs 24 horas después de los estímulos. TcES (20  $\mu\text{g/ml}$ ), TSA (2.5  $\mu\text{g/ml}$ ), CpG (1  $\mu\text{g/ml}$ ) y OVA (5  $\mu\text{g/ml}$ ). \*,  $p > 0.05$ , \*\*,  $p > 0.005$ , \*\*\*,  $p > 0.0002$ . El efecto modulador de los antígenos de *Taenia* sobre la secreción de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a antígenos TLR dependientes se conserva cuando se estimulan con ovoalbúmina.

### Los antígenos de *T. crassiceps* modifican la proliferación celular inducida por antígenos heterólogos.

Debido a las diferencias en la secreción de citocinas y en la expresión de moléculas co-estimuladoras en respuesta a los diferentes estímulos en las CDs, investigamos si esas diferencias influían en la proliferación celular de linfocitos CD4+. Las CDs fueron cultivadas durante 24 horas con los diferentes estímulos, después fueron lavadas y cultivadas con células CD4+ purificadas de bazo de ratones transgénicos para OVA. Las células CD4+ fueron marcadas con CFSE previamente. Después de 5 días los cultivos fueron analizados por citometría de flujo.



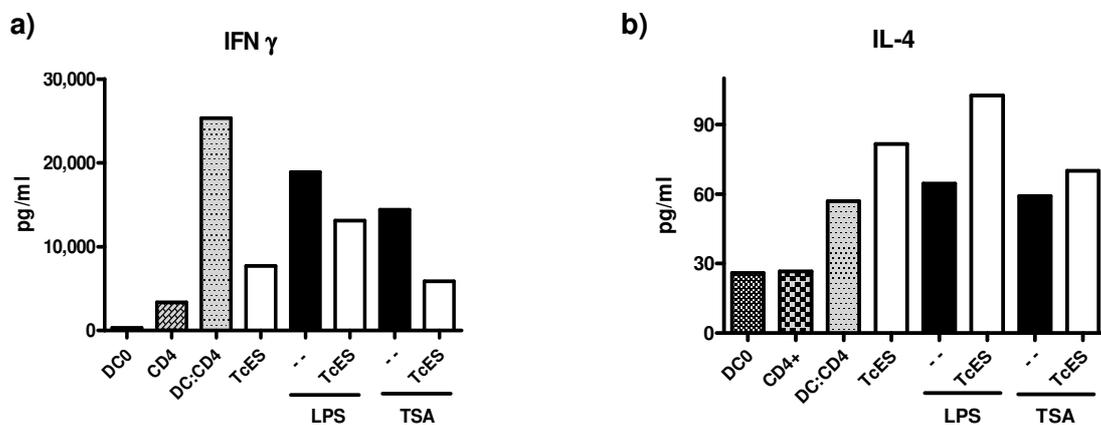
**Figura 15.** Proliferación celular determinada por marcaje de células CD4+ con CFSE. Las CDs fueron estimuladas durante 24 horas, posteriormente se agregó al cultivo células CD4+ purificadas de bazo de ratones DO11.10, 4 días después se analizó la proliferación celular por citometría de flujo. Línea sombreada isotipo.

Conforme a lo esperado, las CDs cultivadas en presencia de OVA fueron eficientes presentadoras de antígeno ya que las células CD4+ poseen un TCR transgénico que reconoce péptidos de OVA y esa afinidad resulta en la proliferación celular de los linfocitos CD4+, la proliferación celular la podemos observar por la pérdida de fluorescencia de las células CD4+, ya que la fluorescencia se pierde en cada división debido a que el CFSE se une al citoesqueleto de la célula. Las CDs estimuladas con LPS y OVA aumentaron su capacidad de presentación de antígeno reflejado en el aumento de proliferación y debido a las citocinas presentes en los cultivos como IL-12 y a la alta

expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86. Las CDs expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* disminuyeron la presentación de antígeno (Fig. 13 b). De manera interesante los TcES interfieren con la capacidad de presentación de antígeno de las CDs estimuladas con LPS (Fig. 13 a). Estos resultados se asocian con la baja expresión de moléculas co-estimuladoras en los TcES y con la característica de estos antígenos para modular la expresión de moléculas co-estimuladoras y citocinas en respuesta a LPS.

**Las células dendríticas expuestas a los antígenos de *Taenia* inhiben la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  pero mantienen la producción de IL-4 e IL-5 en linfocitos CD4+.**

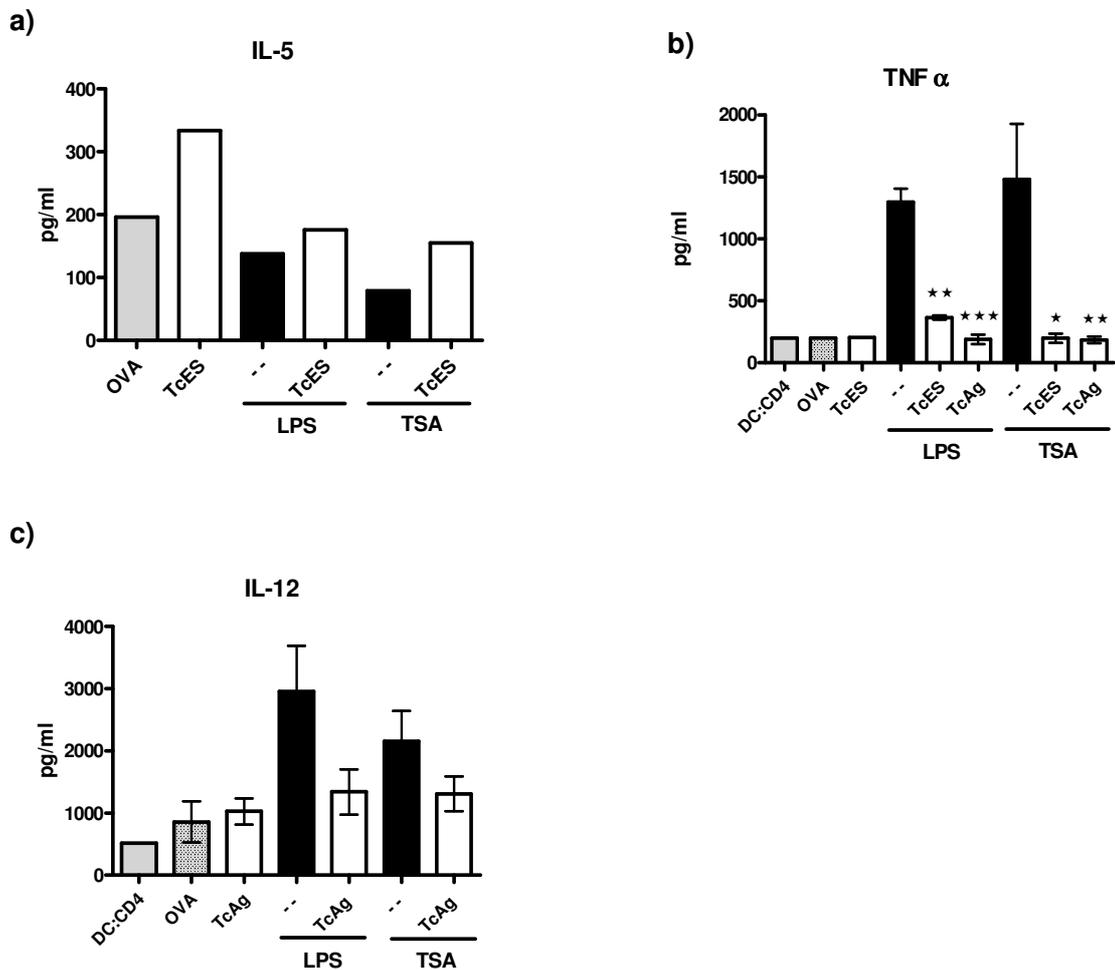
El estado de activación y las citocinas secretadas por las células dendríticas puede determinar el tipo de respuesta de linfocitos T. Para investigar si las características de las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia* tienen la capacidad de polarizar la respuesta de los linfocitos T, utilizamos linfocitos T con TCR transgénico para reconocer OVA. Cuando estas células CD4+ vírgenes fueron cultivadas en presencia de CDs derivadas de médula ósea en presencia del péptido OVA, ellas secretan IFN- $\gamma$  e IL-4 (Hosken et al., 1995). Esto refleja la capacidad de estas células para generar una respuesta Th1 o Th2 y esto nos proporciona un modelo de inmunoregulación.



**Figura 16.** Detección de citocinas en sobrenadantes de co-cultivos de DC:CD4+ (1:4). Las CDs fueron estimuladas durante 24 horas, fueron lavadas 3 veces y sembradas con células CD4+ obtenidas de ratones DO11.10. Los sobrenadantes fueron recuperados después de 4 días de co cultivo y analizados por ELISA.

Las CDs cultivadas en presencia de TcES disminuyen la secreción de IFN- $\gamma$  inducida por OVA, LPS y TSA. Por otro lado son capaces de estimular a las células CD4+ para la producción de IL-4. Estos resultados muestran que las características inducidas por TcES en las CDs son suficientes para polarizar una respuesta Th2 *in vitro*, además estas señales son suficientes para inhibir la polarización a una respuesta Th1 mediada por estímulos inflamatorios como LPS.

La respuesta Th1 implica la secreción de otras citocinas además de IFN- $\gamma$ , para probar si otras citocinas pro-inflamatorias son alteradas por la presencia de TcES, evaluamos la presencia de TNF- $\alpha$ , una citocina inducida por la ligación de TLRs (Fig. 17). Por otro lado la activación de linfocitos Th1 conlleva a la expresión de CD40L y a la producción principalmente de IFN- $\gamma$ , estos dos factores resultan en un aumento de la activación de las células presentadoras de antígeno (APC), y subsecuente a ello las APCs secretan cantidades mayores de IL-12. Finalmente estudiamos si IL-5, una citocina característica de linfocitos Th2, puede ser inducida por las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia* y co-cultivadas con células CD4+ DO11.10 (Fig. 17).

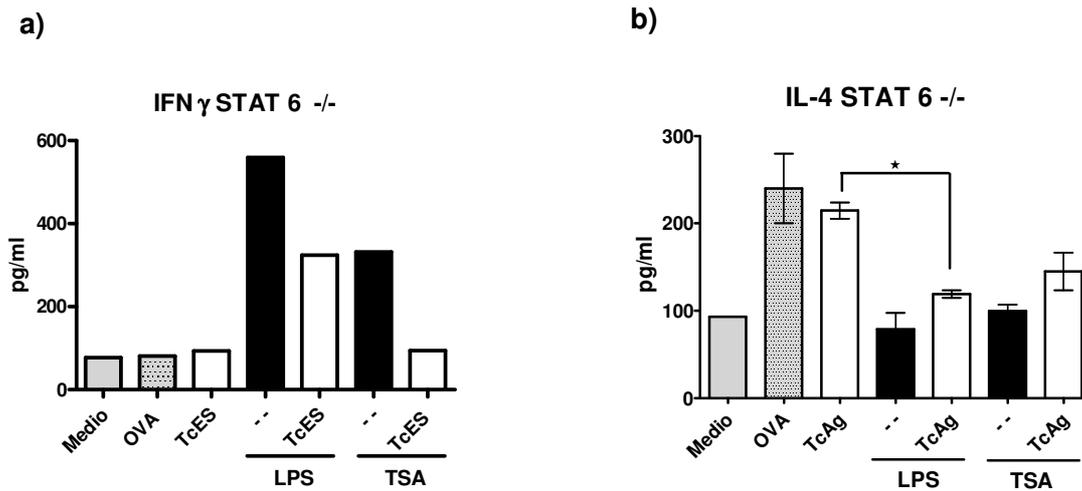


**Figura 17.** Detección de citocinas en sobrenadantes de co-cultivos CD:CD4+ (1:4). Las CDs fueron estimuladas durante 24 horas con los diferentes antígenos con la adición de 5  $\mu$ g de OVA. Fueron lavadas 3 veces y cultivadas con células CD4+ de ratones DO11.10 4 días después los sobrenadantes se analizaron por ELISA. \*,  $p > 0.01$ , \*\*,  $p > 0.007$ , \*\*\* $p > 0.0001$ .

Las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia* no inducen la producción de TNF- $\alpha$  en las células CD4+. Por otro lado las CDs:*Taenia* inducen la producción de IL-5, una citocina característica en las infecciones por helmintos e involucrada en la activación de eosinófilos. Las CDs expuestas a *Taenia* y a TSA o LPS no inducen producción significativa de citocinas características de Th2 o Th1. Los nulos niveles de IL-12 en los co-cultivos se pueden atribuir a la carencia de IFN- $\gamma$  en los cultivos en presencia de

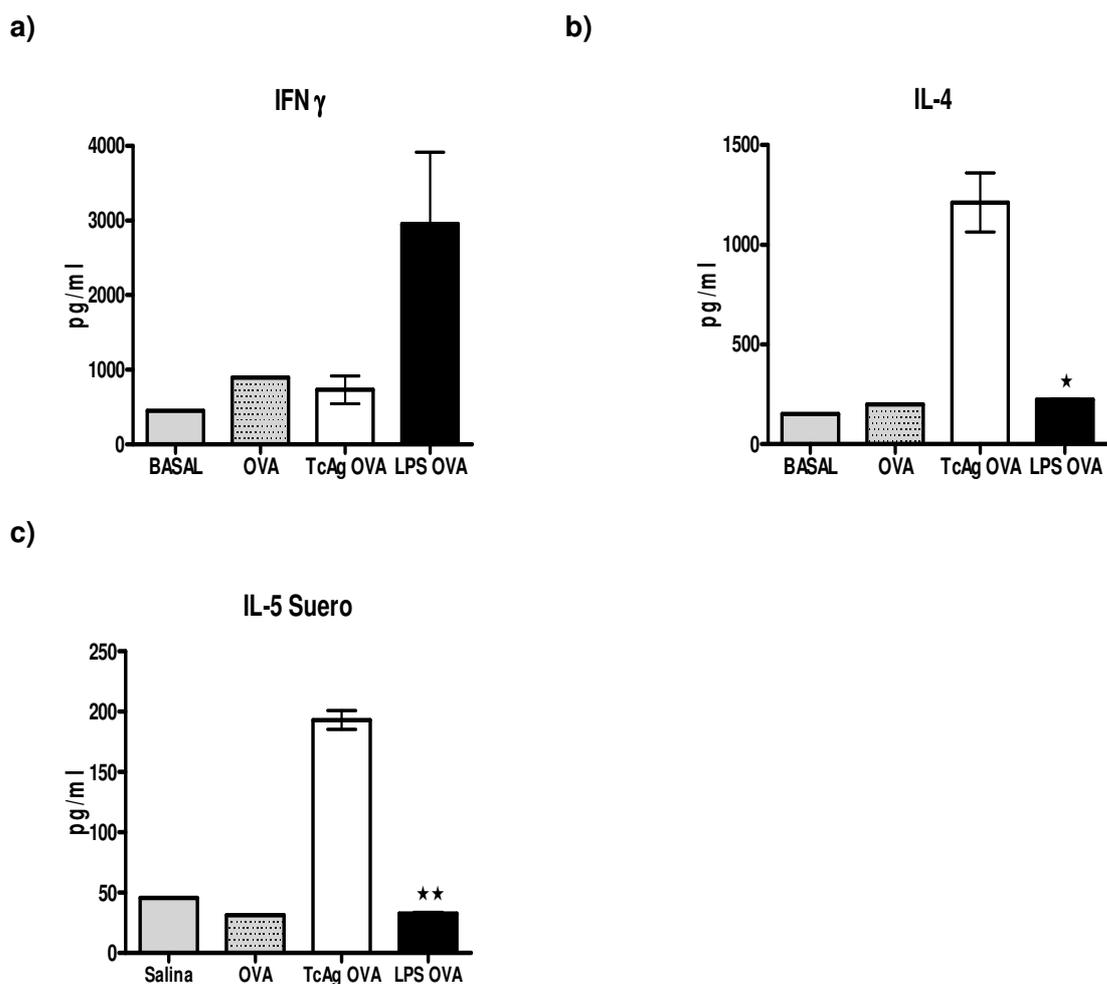
antígenos de *Taenia*. Sin embargo, la ligación CD40:CD40L puede inducir la producción de IL-12 en las CDs, esto sugiere que las células CD4+ activadas en presencia de los antígenos de *Taenia* no expresan los niveles adecuados de CD40L para inducir la secreción de IL-12 en las CDs.

Una de las preguntas para el inicio de una respuesta Th2 dirigida por las células dendríticas, es si necesitan una fuente temprana de IL-4 para inducir la diferenciación de linfocitos T vírgenes a Th2. Las células que produce IL-4 de manera temprana pueden ser las células asesinas naturales T (NK-T). Si la IL-4 puede inducir el fenotipo de células dendríticas para iniciar una respuesta Th2 aún está en duda. Para probar si las CDs estimuladas con antígenos de *Taenia* necesitan un estímulo temprano de IL-4, utilizamos ratones con fondo genético BALB/c deficientes en la molécula STAT 6, la cual funciona en la señalización intracelular del receptor de IL-4, las células que no poseen esta molécula no responden al estímulo con IL-4.



**Figura 18.** Detección de IFN- $\gamma$  e IL-4 en sobrenadantes de co-cultivos de CD:CD4. Las CDs fueron diferenciadas a partir de médula ósea de ratones deficientes en STAT 6. Fueron estimuladas durante 24 horas, lavadas exhaustivamente y sembradas con células CD4+ de ratones DO11.10. Después de 72 horas los sobrenadantes fueron recuperados y analizados por la técnica de ELISA. \*,  $p < 0.05$ .

Para investigar la funcionalidad de las CD's diferenciadas *in vitro*, y para observar si la polarización a una respuesta Th2 dirigida por las CD's expuestas a antígenos de *Taenia* se mantienen *in vivo*, realizamos transferencia adoptiva de CD's estimuladas con OVA y LPS o TcAg a ratones transgénicos para OVA.



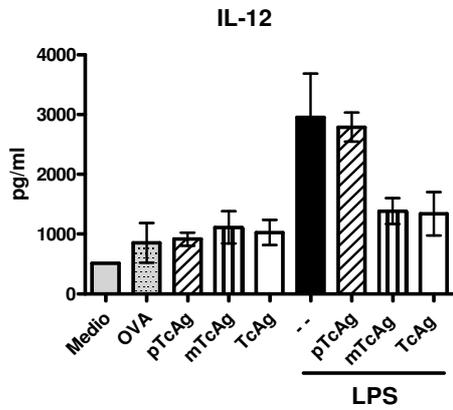
**Figura 19.** Determinación de citocinas en suero de ratones DO11.10 después de 5 días de recibir células dendríticas estimuladas con OVA (5) y LPS(1) o TcAg (20). \*,  $p > 0.02$ , \*\*,  $p > 0.005$ .

Los ratones que recibieron CDs estimuladas con TcAg muestran niveles elevados de IL-4 e IL-5 en suero después de 5 días de la transferencia. Por otro lado, los niveles de IFN- $\gamma$  no muestran cambios respecto al grupo control. Los ratones que recibieron CDs estimuladas con LPS muestran niveles elevados de IFN- $\gamma$  pero no de IL-4 o IL-5. Estos resultados demuestran que los antígenos de *Taenia* activan de manera diferente a las CDs, este estado de activación resulta en la activación de linfocitos T a un fenotipo Th2 *in vitro* e *in vivo*.

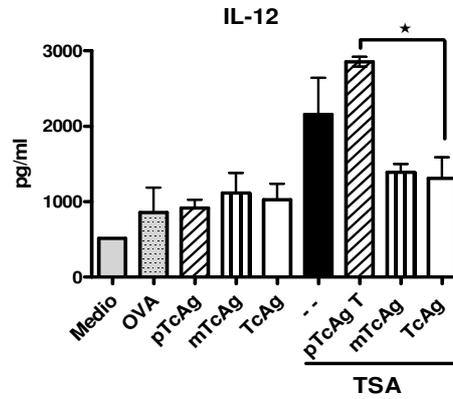
**Los carbohidratos presentes en los antígenos de *Taenia* son necesarios para la inducción de Th2 y para regular las citocinas pro-inflamatorias inducidas por estímulos TLR dependientes por las células dendríticas.**

La presencia de carbohidratos en los antígenos de helmintos como *Schistosoma mansoni* y *Taenia crassiceps* son esenciales para el desarrollo de una respuesta Th2 *in vivo* (Okano et al., 1999; Gomez-Garcia et al., 2006). Sin embargo, hasta el momento no es claro cuales son las células que reconocen esos carbohidratos y que células influyen en la polarización a una respuesta Th2. Es probable que las células que reconocen los glicanos estén involucradas en la polarización a una respuesta Th2. Las CDs cuentan con diferentes tipos de receptores, entre los más estudiados están los TLRs, en investigaciones recientes se ha demostrado que TLR4 puede funcionar como receptor para carbohidratos de *S. mansoni* (Thomas et al., 2003). Las CDs cuentan también con receptores tipo lectinas (CLRs), en experimentos con CDs derivadas de monocitos humanos, las CDs pueden reconocer moléculas de *S. mansoni*, principalmente a través de DC-SIGN, MR y MGL (van Liempt et al., 2007). Para probar si los carbohidratos tienen un papel en la modulación de la función de las CDs, utilizamos antígeno soluble de *T. crassiceps* intacto (TcAg), y TcAg tratado con metaperyodato (pTcAg), el cual altera la estructura conformacional de los glicanos sin afectar las proteínas (Okano et al., 1999).

a)

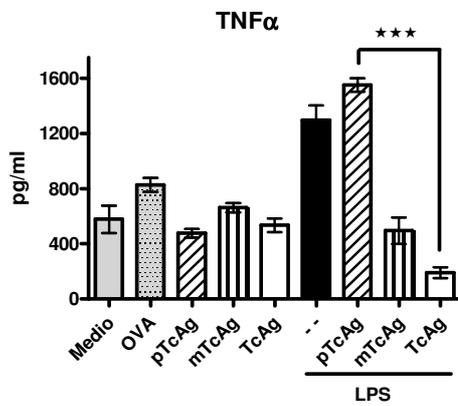


b)

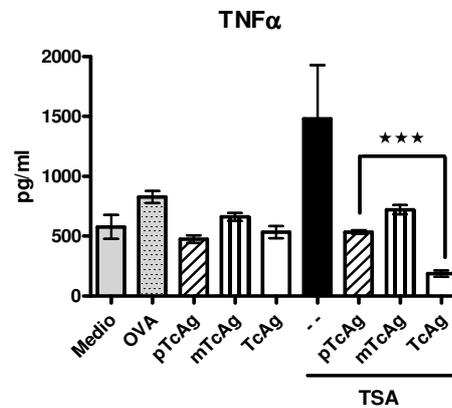


**Figura 20.** Determinación de IL-12 en sobrenadantes de CDs expuestas a antígenos pro-inflamatorios y/o de *T. crassiceps*. Las células dendríticas tratadas con los antígenos de *T. crassiceps* no son capaces de producir IL-12 en respuesta al estímulo pro-inflamatorio (a y b), Los carbohidratos presentes en los antígenos de *Taenia* son necesarios para inhibir la producción de IL-12 en respuesta a los antígenos pro-inflamatorios. \*,  $p > 0.05$ .

a)

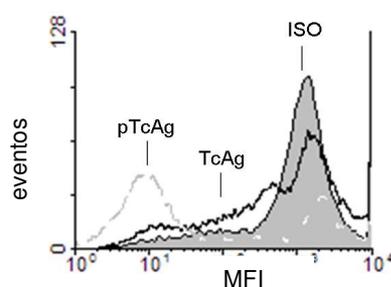


b)



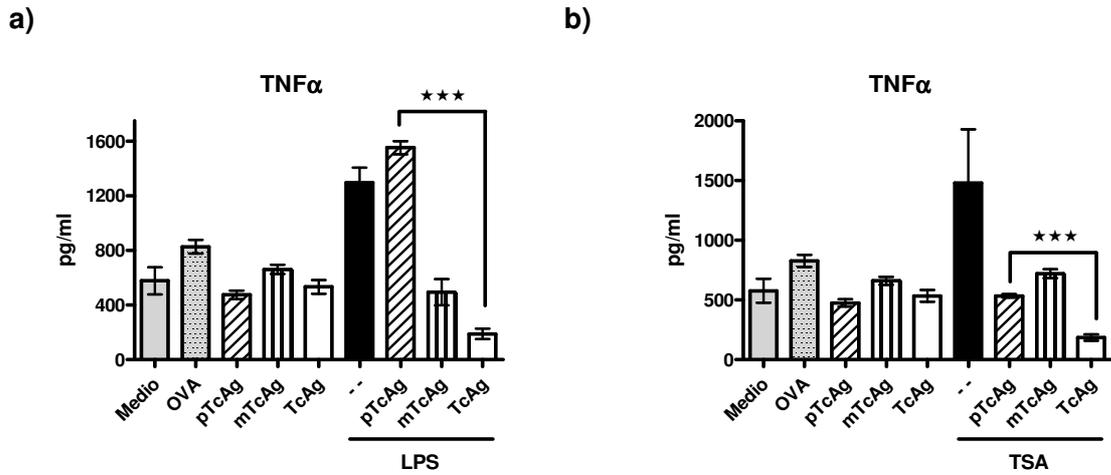
**Figura 21.** Determinación de concentración de TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de CDs expuestas a antígenos pro-inflamatorios y/o de *T. crassiceps*. Las células dendríticas tratadas con TSA o LPS no producen TNF- $\alpha$  en presencia de antígenos de *T. crassiceps*. Los antígenos deglicosilados no interfieren con la producción de TNF- $\alpha$  por LPS (a) pero si interfieren con la producción de TNF- $\alpha$  por TSA (b). \*\*\* $p > 0.001$

Los glicanos presentes en los antígenos de *Taenia* son necesarios para la inhibición de IL-12 y TNF- $\alpha$  inducido por LPS. Sin embargo sólo pueden inhibir la producción de IL-12 en las células dendríticas expuestas a TSA y no interfieren con la producción de TNF- $\alpha$ . Los carbohidratos presentes en antígenos de *T. crassiceps* reclutan células con actividad supresora en el sitio del inóculo (Gomez-Garcia et al., 2006), decidimos probar si los carbohidratos presentes en los antígenos de *Taenia* tienen efecto sobre las células dendríticas para inducir o inhibir la proliferación celular de células CD4+ de ratones DO11.10.

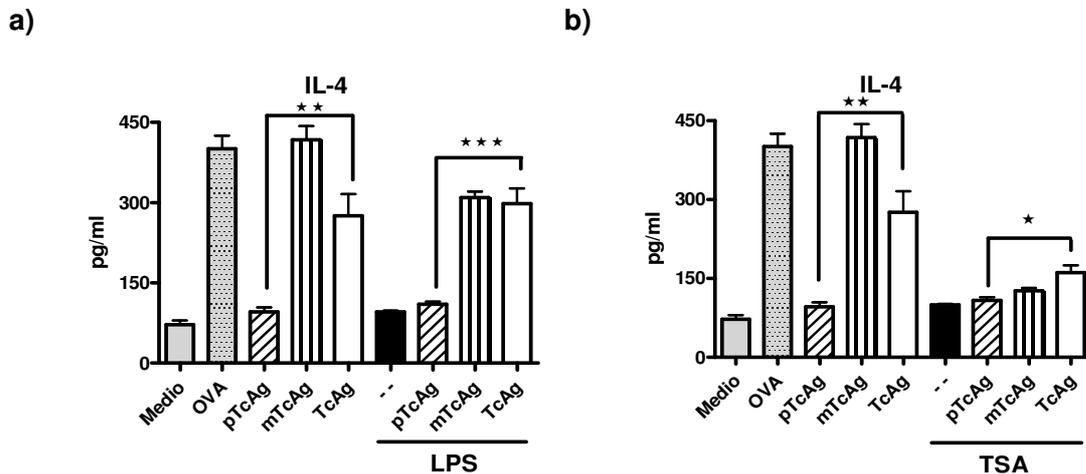


**Figura 22.** Histograma que muestra la proliferación celular de células CD4+ de ratones DO11.10 cultivadas con células dendríticas durante 72 horas. Las CDs fueron estimuladas 24 horas antes del co-cultivo de la siguiente manera, en presencia de OVA (5  $\mu$ g/ml) y en presencia de TcAg o pTcAg.

Debido a que los carbohidratos son necesarios para inhibir la producción de citocinas inducidas por LPS en las CDs, investigamos si este efecto se mantiene en co-cultivos con células CD4+.



**Figura 23.** Determinación de concentración de TNF- $\alpha$  en co-cultivos CD:CD4+. Las CDs cargadas con OVA (1  $\mu$ g/ml) fueron estimuladas durante 24 horas con los diferentes antígenos, los linfocitos CD4+ fueron obtenidos de bazo de ratones DO11.10 y purificados por microbeads. El co-cultivo se realizó en proporción 1:4 (CD:CD4), después de 72 horas los sobrenadantes fueron analizados por ELISA sándwich.  $p^{***} > 0.001$  comparando el efecto de los antígenos deglicosilados pTcAg con el antígeno intacto TcAg sobre la producción inducida por LPS (a) y TSA (b).  $***, p > 0.001$



**Figura 24.** Detección de IL-4 en sobrenadantes de co-cultivos CD:CD4+ (1:4). Los glicanos presentes en los antígenos de *Taenia* son necesarios para mantener los niveles de IL-4 producidos por las células CD4+. Los antígenos TLR dependientes inhiben la inducción de IL-4 por los antígenos de *Taenia*. \*,  $p > 0.01$ , \*\*,  $p > 0.002$ ,  $***, p > 0.0001$ .

Las CDs estimuladas con pTcAg no inducen la producción de TNF- $\alpha$  en células CD4+. Por otro lado los carbohidratos presentes en los TcAg son necesarios para mantener la producción de IL-4 y para inhibir la producción TNF- $\alpha$  inducidas por LPS y TSA. Los antígenos tratados con metaperyodato inhibieron la producción de IL-4 de células CD4 D11O.10 estimuladas con OVA. Estos experimentos demuestran que los glicanos presentes en *T. crassiceps* confieren las señales necesarias a las CDs para estimular a las células CD4+ y favorecer la producción de IL-4. Sin embargo otros componentes del antígeno de *Taenia* funcionan como inhibidores de respuestas Th1 y Th2, ya que las CDs que fueron expuestas a los antígenos de *Taenia* sin los glicanos (pTcAg) reducen los niveles de IL-4 y TNF- $\alpha$ . Por otro lado, las CDs tratadas con pTcAg no inhibieron la producción de TNF- $\alpha$  por LPS, probablemente es necesaria la presencia de los glicanos para interferir con la producción de TNF- $\alpha$ . Estos resultados muestran que diferentes componentes de los antígenos de *Taenia* pueden actuar de manera sinérgica para modular el sistema inmune, preferencialmente inhibiendo respuestas pro-inflamatorias y probablemente polarizando la respuesta inmune a un tipo Th2.

## 8. Discusión

Durante los últimos años, numerosas investigaciones se han enfocado a estudiar la respuesta inmune que provocan los parásitos helmintos en diferentes hospederos (Maizels et al., 2004). La manera interesante en la cual los helmintos pueden modificar la RI del huésped es un punto en el cual el interés de los investigadores ha incrementado (Rook, 2007). Las investigaciones se realizan con el interés de desarrollar nuevos fármacos o vacunas para el tratamiento o prevención de las helmintosis (Flisser and Gyorkos, 2007). Investigaciones recientes enfocan su interés a los mecanismos por los cuales los helmintos pueden modificar la RI inmune del huésped, a sus antígenos y además a antígenos no relacionados, el conocimiento generado es de gran interés para los inmunólogos, ya que aporta información esencial del funcionamiento del sistema inmune (Maizels et al., 2004). Este conocimiento puede ser aplicado en el campo clínico, para el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, las cuales se caracterizan por respuestas inflamatorias exacerbadas (Rook, 2007). Las células dendríticas, las cuales forman parte del sistema inmune adaptativo y unen la inmunidad innata y adaptativa por medio de la activación de linfocitos T, son claves en el reconocimiento de antígenos y en el inicio de una RI adecuada, en los últimos años nuevas investigaciones se han enfocado a su estudio y se ha probado su capacidad de inducir inmunidad y tolerancia (Sher et al., 2003). Las CD4s tienen diferentes receptores, los cuales reconocen principalmente moléculas compartidas por patógenos (PAMPs), además las CD4s pueden expresar altos niveles de moléculas co-estimuladoras, las cuales son necesarias para la activación adecuada de los linfocitos T, y para dirigir una respuesta eficiente contra el patógeno (Medzhitov and Janeway, 2000). Esto nos indica que las CD4s pueden decodificar señales en su medio y traducirlas para la activación adecuada del SI (Banchereau and Steinman, 1998). Las CD4s son capaces de iniciar una respuesta tipo Th1, Th2 y Treg, hasta el momento no se ha demostrado cuales son las señales presentes en las CD4s para la diferenciación del linfocito a un fenotipo Th2 (Diaz and Allen, 2007).

Los helmintos parásitos provocan generalmente una respuesta Th2 en el hospedero (Maizels et al., 2004), el origen de esta respuesta y el papel que tienen las células dendríticas en este tipo de respuesta aún se encuentra en investigación (MacDonald and Maizels, 2008). Las investigaciones a la fecha difieren en el fenotipo resultante de la exposición a diferentes antígenos de helmintos. CD4s expuestas a los antígenos de *S. mansoni* mantiene un fenotipo inmaduro (Cervi et al., 2004) esto

contrasta con la característica de los antígenos de *N. brasiliensis*, los cuales aumentan la expresión de CD80, CD86 y CD40 (Balic et al., 2004), en ambos casos las CDs expuestas a los antígenos son capaces de polarizar una respuesta Th2 *in vitro*. La cisticercosis experimental causada por el céstodo *Taenia crassiceps*, al igual que otras infecciones por helmintos, se caracteriza por inducir una respuesta Th2 con las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 (Terrazas et al., 1998). Los antígenos solubles de *Taenia crassiceps* pueden también inducir este tipo de respuesta *in vivo*, sin necesidad de infección, lo que sugiere que moléculas derivadas de éste parásito podrían interactuar con las células presentadoras de antígeno e influir en el desarrollo de una respuesta tipo Th2 (Gomez-Garcia et al., 2006). Para investigar si las CDs pueden reconocer antígenos de *Taenia*, y para estudiar su fenotipo y respuesta al entrar en contacto con los antígenos, decidimos en estudios *in vitro*, exponer CDs derivadas de médula ósea con antígenos solubles (TcAg) o secretados/excretados (TcES) de *Taenia crassiceps*.

Las CDs expuestas a los TcES o TcAg aumentan la expresión de MHCII lo que sugiere que los antígenos de *T. crassiceps* pueden ser presentados de manera eficiente, además la expresión de MHCII es considerada como una característica de las CDs maduras (Kelsall et al., 2002). Por otro lado, los resultados muestran niveles basales de expresión de moléculas co-estimuladoras como CD86, una molécula implicada en activación celular y proliferación (Tan and O'Neill, 2005).

En infecciones crónicas con *T. crassiceps* se ha demostrado que los macrófagos expresan CD40, y que la deficiencia de CD40 se asocia con mayor resistencia a la infección por *T. crassiceps* (Rodríguez-Sosa et al., 2003), esto sugiere que la presencia de CD40 es necesaria en una respuesta Th2. Sin embargo nuestros resultados muestran que los antígenos de *Taenia* no inducen alta expresión de CD40 en las células dendríticas, esto coincide con recientes investigaciones con el antígeno SEA de *S. mansoni* en el cual las células dendríticas no expresan CD40 (MacDonald et al., 2002), de manera interesante el bloqueo de CD40 con anticuerpos en las CDs expuestas a SEA inhibe la capacidad de las CDs de inducir una respuesta Th2 en co-cultivos con células CD4+ (MacDonald et al., 2002), por ello no descartamos una participación de CD40 en la inducción de un perfil de citocinas Th2 en los co-cultivos de CDs tratadas con antígenos de *Taenia*.

Por otro lado la exposición de las CDs a LPS lleva a la expresión de CD40, y ha sido demostrado que participa principalmente en el desarrollo de una respuesta Th1, después de la señalización a través de TLRs (Akira and Takeda, 2004). De manera

interesante la expresión de CD40 inducida por LPS es regulada en presencia de los antígenos de *Taenia*. Esto sugiere que CD40 esta implicada en ambas respuestas y que una alta expresión en las CDs puede asociarse a una respuesta Th1 y una baja expresión de CD40 puede estar involucrada en el desarrollo de una respuesta Th2, tomando esto en cuenta la modulación de esta molécula puede resultar en el establecimiento o eliminación de *T. crassiceps*. Otro punto que se debe considerar es que la unión de CD40 a su ligando (CD40L) incrementa la producción de IL-12 en las APCs (MacDonald et al., 2002), es posible que las CDs expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* no estimulen la expresión de CD40L en las células CD4+ y por ello no se pueda llevar a cabo una señalización reversa que resultaría en la secreción de IL-12 en las CDs. La deficiencia en la producción de IL-12 en la CDs puede ser un factor que promueva el desarrollo de una respuesta Th2, ya que en ratones deficientes en IL-12p35 los niveles de IL-4, IL-5 e IL-13 son más altos que en ratones silvestres, y esta polarización al perfil Th2 se asocia con alta susceptibilidad a la infección por *T. crassiceps* (Rodríguez-Sosa et al., 2003). Investigamos si la expresión de OX40L una molécula asociada con Th2 (Blazquez and Berin, 2008), se modificaba en las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia*. Los resultados muestran baja expresión de OX40L comparada con CDs sin estímulo, las CDs expuestas a LPS aumentan la expresión de OX40L y dicha expresión esta disminuida en presencia de los antígenos de *Taenia*. Finalmente investigamos la expresión de CCR7 en las CDs, el cual es un receptor de la quimiocinas CCL19 y CCL21 producidas en los órganos linfáticos (Ohl et al., 2004). De manera interesante los antígenos de *Taenia* inducen baja expresión de CCR7 y la presencia de los antígenos de *Taenia* modula la expresión de este receptor en CDs tratadas con LPS. Se ha demostrado que la presencia de CCR7 es necesaria para la migración de la dermis a los ganglios linfáticos de CDs en estado maduro e inmaduro (Ohl et al., 2004), la modulación de este receptor puede ser otro mecanismo por el cual *Taenia crassiceps* puede afectar la respuesta inmune del huésped, previniendo la migración adecuada de las CDs a los ganglios linfáticos y a las zonas de presentación de antígeno donde pueden activar y presentar antígeno a los linfocitos T, afectando su activación y subsecuente proliferación. En resumen, las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia* no expresan moléculas co-estimuladoras, con excepción de TcAg el cual aumenta la expresión de CD40 pero sin alcanzar los niveles inducidos por LPS. Ambos antígenos tienen la característica de aumentar la expresión de MHCII. Los antígenos de *Taenia* selectivamente regulan la expresión de moléculas de

membrana en las CD<sub>s</sub>; sin embargo no podemos concluir la asociación de estos marcadores con la polarización a un perfil Th2 en los co-cultivos.

La activación de las CD<sub>s</sub> esta ligada a producción de citocinas, hasta ahora se ha estudiado principalmente la producción de citocinas pro-inflamatorias, por otro lado no se han identificado factores solubles que promuevan el desarrollo de una respuesta Th2 inducida por las CD<sub>s</sub> (MacDonald and Maizels, 2008). En este proyecto investigamos si los antígenos de *Taenia* pueden inducir la secreción de citocinas en las CD<sub>s</sub>, los resultados muestran que las CD<sub>s</sub> expuestas a los antígenos de *Taenia* no secretan niveles detectables de IL-15, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , sólo detectamos la expresión de mRNA de IL-10, de manera interesante los niveles de mRNA de IL-10 de las CD<sub>s</sub> expuestas a los antígenos de *Taenia* son similares a los inducidos por LPS. Por otro lado los antígenos de *Taenia* tienen la capacidad de inhibir la secreción de IL-15, IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en respuesta a antígenos TLR dependientes, esto demuestra que *T. crassiceps* puede modular la respuesta de las CD<sub>s</sub>, inhibiendo una respuesta pro-inflamatoria contra antígenos no relacionados, principalmente de ligandos para TLRs. Estos resultados pueden explicar la susceptibilidad de ratones infectados con *T. crassiceps* a una subsecuente infección con el protozooario intracelular *Trypanosoma cruzi* (Rodríguez et al., 1999). En tripanosomiosis la respuesta asociada con resistencia es un perfil tipo Th1, y se ha demostrado que las CD<sub>s</sub> pueden reconocer antígenos de *T. cruzi* por medio de TLR2 y TLR9 (Bafica et al., 2006), activando una respuesta pro-inflamatoria con altos niveles de IL-12p70 lo cual es necesario para la producción de IFN- $\gamma$ . Por otro lado en esta investigación mostramos que la presencia de *T. crassiceps* puede inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias inducidas por la ligación de TLR9 en las CD<sub>s</sub>, esto resultaría en una baja respuesta inflamatoria contra *T. cruzi* y en el aumento de parasitemia comparado con ratones infectados solo con *T. cruzi* (Rodríguez et al., 1999). Finalmente el conjunto de señales que se llevan a cabo durante la presentación de antígeno por las CD<sub>s</sub> determina la diferenciación de las células T hacia las diferentes poblaciones. Para investigar si los antígenos de *Taenia* pueden conferir las características necesarias para la diferenciación de las células T, realizamos estudios *in vitro* con co-cultivos con células CD4<sup>+</sup>. Las CD<sub>s</sub> estimuladas con los antígenos de *Taenia* tienen la capacidad de inducir un fenotipo Th2 en las células CD4<sup>+</sup> vírgenes, de manera interesante la modulación de los antígenos de *Taenia* en las CD<sub>s</sub> expuestas a antígenos TLR dependientes se mantiene en los co-cultivos, demostrando que los antígenos de *Taenia* pueden controlar la respuesta inmune modulando la actividad de las células dendríticas. Estos efectos son

dependientes de los carbohidratos y coincide con los experimentos *in vivo* en los cuales los carbohidratos presentes en los antígenos de *Taenia* son necesarios para una respuesta Th2 (Gomez-Garcia et al., 2006). Por otro lado esta respuesta es independiente de STAT 6, ya que CD4s de ratones STAT6 *-/-* responden de manera similar a los antígenos de *Taenia*, esto sugiere que las CD4s no necesitan un estímulo temprano de IL-4 para ser inductoras de una respuesta Th2 y que posiblemente la alta resistencia de ratones STAT6 *-/-* a la infección por *T. crassiceps* (Rodriguez-Sosa et al., 2004) se deba a la deficiencia en la transducción de señales de IL-4 en las células T, inhibiendo un efecto autócrino de la IL-4 y en consecuencia inhibiendo la amplificación de una respuesta Th2. Finalmente la funcionalidad de las CD4s fue probada *in vivo*, donde las CD4s expuestas a los antígenos de *Taenia* inducen una respuesta Th2 *in vivo*, mientras que las tratadas con LPS inducen una respuesta Th1. Esto demuestra que las características inducidas por los antígenos de *Taenia* en las CD4s son suficientes para el inicio de una respuesta Th2 *in vivo*.

La posibilidad de que los antígenos secretados/excretados (TcES) de *T. crassiceps* puedan entrar en contacto con las CD4s es mayor que la de los antígenos estructurales, ya que las CD4s permanecen en los tejidos periféricos donde muestrean el ambiente, en este proyecto mostramos que ambos antígenos pueden alterar el funcionamiento de las CD4s, principalmente disminuyendo la expresión de moléculas co-estimuladoras, expresando de manera modulada CD40 y aumentando la expresión de MHCII, por otro lado solo observamos mRNA de IL-10, pero no descartamos la presencia de factores que pueden inducir una respuesta Th2 como TGF $\beta$  o IL-6. Este fenotipo de CD4 es capaz de inducir una respuesta Th2 *in vivo* e *in vitro*, y es independiente de STAT 6 $-/-$ . Las moléculas presentes en los antígenos de *Taenia* de las cuales dependen la modulación de las CD4s y la respuesta Th2 son los carbohidratos. Esto coincide con recientes investigaciones donde los carbohidratos de *S. mansoni* pueden ser reconocidos por las CD4s, principalmente a través de los CLR (van Liempt et al., 2007). Debido a que los carbohidratos son las moléculas responsables de la regulación de la respuesta de las CD4s es posible que receptores tipo lectinas puedan estar involucradas en su reconocimiento, en los últimos años ha surgido evidencia que estos receptores pueden ser moduladores de la respuesta inmune (van Vliet et al., 2007). Por otro lado existe la posibilidad que los antígenos de *Taenia* puedan ser reconocidos por TLRs, hasta ahora no es claro que la señalización a través de los TLRs pueda inducir una respuesta Th2. Sin embargo ha sido propuesto que los carbohidratos de *T. crassiceps* pueden señalar a

través de TLR4 y estimular la secreción de IL-6 en macrófagos peritoneales (Dissanayake et al., 2004). Este proyecto demuestra que los antígenos de *Taenia* pueden ser reconocidos por las CDs, inducir una respuesta Th2 mediada por las CDs e inhibir estímulos TLR dependientes.

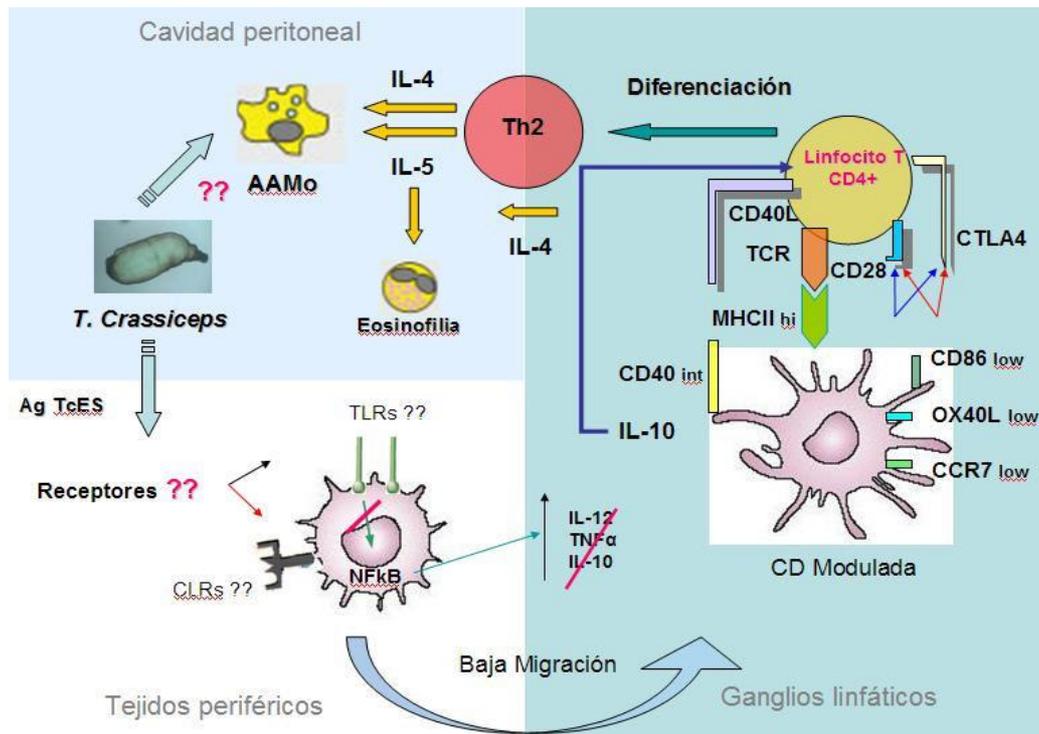
Para probar si las características conferidas por los antígenos de *Taenia* a las CDs son suficientes para polarizar una respuesta Th2, cultivamos las CDs tratadas con células CD4+ de ratones DO11.10 los cuales poseen un TCR transgénico que reconoce el péptido OVA. Nuestros resultados indican que la polarización a un perfil Th2 se obtiene en los co-cultivos con CDs tratadas con los antígenos de *Taenia* aumentando la concentración de IL-4 y disminución de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes. Las CDs tratadas con LPS muestran un perfil Th1 con el aumento de la concentración de IFN- $\gamma$  y disminución de IL-4. De manera similar cuando transferimos CDs tratadas con el antígeno de *Taenia* a ratones DO11.10 observamos el aumento de IL-4 en suero, en contraste con las CDs tratadas con LPS en donde los niveles de IFN- $\gamma$  son predominantes. Estos resultados demuestran que las CDs son capaces de iniciar una respuesta Th2 después de la exposición a antígenos de *T. crassiceps*.

Finalmente analizamos la capacidad de estimulación de las CDs a linfocitos CD4+, midiendo la proliferación de linfocitos CD4+ por la pérdida de CFSE. La baja expresión de CD86 puede influir en la baja inducción de proliferación que indujeron las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia* cuando fueron cultivadas con células CD4+ DO11.10. Por otro lado, la proliferación inducida por CDs sin estímulo en los co-cultivos es mayor comparada con la inducida por las CDs expuestas a los antígenos de *Taenia*. Ya que las CDs inmaduras muestran también niveles basales de CD86, y la proliferación que inducen es debido a la afinidad del TCR por el péptido de OVA (Hosken et al., 1995), existe la probabilidad de que los antígenos de *Taenia* puedan inducir la expresión de moléculas asociadas a la inhibición de la proliferación celular. De acuerdo con esto, las CDs estimuladas con LPS aumentan la proliferación celular, pero cuando estas CDs son estimuladas con LPS y antígeno de *Taenia*, la proliferación celular es inhibida. Sin embargo, las moléculas asociadas con la inhibición de proliferación celular PD-L1 y PD-L2, las cuales son inducidas en macrófagos durante la infección con *T. crassiceps* (Terrazas et al., 2005) no son inducidas por los antígenos de *Taenia* en las CDs, esto puede deberse al tiempo de exposición con los antígenos, ya que los macrófagos que expresan PD-L1 y PD-L2 aparecen a partir de la semana 4 post-infección (Terrazas et al., 2005). Por otro lado la inhibición de CD86 que resulta en las CDs tratadas con LPS y

expuestas a los antígenos de *Taenia* puede resultar en la disminución de una adecuada estimulación afectando la proliferación celular en los co-cultivos con células CD4+ DO11.10. De manera interesante las CDs tratadas con los antígenos de *Taenia* muestran niveles inferiores a las CDs cultivadas sin tratamiento. Estos resultados sugieren que la presencia de los antígenos de *Taenia* selectivamente interfiere con la expresión de moléculas co-estimuladoras en las CDs. Este mecanismo de inhibición de expresión de CD86 en las CDs puede explicar la baja proliferación de células de ratones DO11.10 cultivadas con CDs expuestas a LPS y antígenos de *Taenia*, ya que la exposición de las CDs a LPS resulta en alta expresión de CD86, y en presencia de los antígenos de *Taenia* la expresión de CD86 se reduce significativamente.

Por otro lado la estimulación mediante anti CD3/CD28 resulta en baja proliferación de células de bazo de ratones infectados con *T. crassiceps* (Terrazas et al., 1998), esto demuestra que en presencia de señales co-estimuladoras adecuadas, la proliferación celular aún se encuentra suprimida. Esto abre la posibilidad que las CDs tratadas con los antígenos de *Taenia* puedan expresar moléculas inhibitoras de proliferación celular.

En conjunto nuestros resultados demuestran una activación no clásica de las CDs como resultado de la exposición a los antígenos de *Taenia*, la cual tiene como característica la expresión modulada de moléculas co-estimuladoras y sólo la secreción de IL-10. De manera interesante los antígenos de *Taenia* pueden disminuir la respuesta pro-inflamatoria a estímulos TLR dependientes, lo cual sugiere receptores antagónicos para la señalización a través de TLRs. Y finalmente demostramos que las CDs son capaces de iniciar una respuesta Th2 *in vivo* e *in vitro* al ser expuestas a los antígenos de *T. crassiceps*. Estos resultados abren nuevas líneas investigación para la elucidación de los mecanismos implicados que llevan a la diferenciación a linfocitos Th2 inducida por CDs, a la inhibición de respuestas pro-inflamatorias mediadas por TLRs y a la investigación de moléculas contenidas en los antígenos de *Taenia* responsables de los efectos en las CDs así como receptores involucrados en este reconocimiento. Estos resultados son importantes ya que hasta el momento se desconocen moduladores de la activación de las CDs mediante TLRs, por otro lado los TLRs se han usado como adyuvantes en la generación de nuevas vacunas, sin embargo un punto importante a considerar es que las poblaciones expuestas a infecciones por helmintos pueden responder de manera ineficiente a estas vacunas.



**Figura 25.** Efecto de la interacción entre antígenos de *Taenia crassiceps* y células dendríticas.

Aún desconocemos los receptores implicados en el reconocimiento de los antígenos de *Taenia*, debido a la pérdida de las características moduladoras del TcAg al ser modificados los carbohidratos es posible que puedan ser reconocidos por receptores tipo lectinas (CLRs) pero no descartamos la participación de otro receptor como los TLRs. Un punto importante es la modulación por los antígenos de *Taenia* de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a antígenos TLR dependientes, hasta el momento desconocemos los mecanismos implicados en esta regulación pero podría estar implicados la deficiencia en fosforilaciones en la cascada de señalización para activar NFκB. Finalmente la baja expresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de IL-10 por CDs expuestas a antígenos de *Taenia* llevan a la diferenciación hacia Th2, el ambiente de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) generado y los antígenos presentes en la cavidad peritoneal podrían llevar a la activación alternativa de los macrófagos, presentes durante la infección crónica de cisticercosis experimental e importantes en supresión de proliferación celular.

## 9. Conclusiones

Los antígenos solubles derivados de *Taenia crassiceps* modulan el fenotipo de las células dendríticas, disminuyen la expresión de CD86 y CCR7, expresan de manera modulada CD40 mientras aumentan la expresión de MHC-II.

Los antígenos excretados/secretados de *T. crassiceps* modifican el fenotipo de las células dendríticas, disminuyen la expresión de CD86, CCR7, CD40 y aumentan la expresión de MHCII.

Las células dendríticas expuestas a los antígenos del cestodo *T. crassiceps*, aumentan los transcritos de RNAm de IL-10.

Los antígenos de *T. crassiceps* inhiben la producción de IL-15, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  inducidas por ligandos TLR dependientes en las células dendríticas.

Las células dendríticas expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* promueven la diferenciación a un tipo Th2 de células CD4+.

Los carbohidratos presentes en los antígenos de *T. crassiceps* tienen un papel fundamental en la modulación de la respuesta de las células dendríticas y son fundamentales para la inducción de una respuesta Th2.

Los efectos de los antígenos de *T. crassiceps* son independientes de la presencia de STAT 6 en las células dendríticas.

Las células dendríticas expuestas a los antígenos de *T. crassiceps* pueden favorecer un perfil Th2 en respuesta a antígenos heterólogos *in vivo*.

## 10. Referencias

- Abbas Abul K., Lichman Andrew H. Cellular and Molecular Immunology. 5ta edición, Saunders, 2003.
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
- Aldridge, J.R., Jr., Jennette, M.A., Kuhn, R.E., 2006. Uptake and secretion of host proteins by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol* 92, 1101-1102.
- Ardavin, C., 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3, 582-590.
- Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 2006. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177, 3515-3519.
- Balic, A., Harcus, Y., Holland, M.J., Maizels, R.M., 2004. Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses. *Eur J Immunol* 34, 3047-3059.
- Banchereau, J., Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Blazquez, A.B., Berin, M.C., 2008. Gastrointestinal dendritic cells promote Th2 skewing via OX40L. *J Immunol* 180, 4441-4450.
- Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y.J., O'Garra, A., 2003. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 197, 101-109.
- Cervi, L., MacDonald, A.S., Kane, C., Dzierszynski, F., Pearce, E.J., 2004. Cutting edge: dendritic cells copulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *J Immunol* 172, 2016-2020.
- Cooke, A., Zaccane, P., Raine, T., Phillips, J.M., Dunne, D.W., 2004. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol* 20, 316-321.
- Diaz, A., Allen, J.E., 2007. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *Eur J Immunol* 37, 3319-3326.
- Dissanayake, S., Amith, R.S., Shahin, A., 2004. *Taenia crassiceps* carbohydrates stimulate IL-6 expression in naive murine macrophages via Toll-like receptors (TLRs). *Mol Immunol* 41, 391-398.
- Flisser, A., Gyorkos, T.W., 2007. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. *Parasite Immunol* 29, 637-649.
- Gomez-Garcia, L., Rivera-Montoya, I., Rodriguez-Sosa, M., Terrazas, L.I., 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res* 99, 440-448.
- Goodridge, H.S., Marshall, F.A., Else, K.J., Houston, K.M., Egan, C., Al-Riyami, L., Liew, F.Y., Harnett, W., Harnett, M.M., 2005. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol* 174, 284-293.
- Grohmann, U., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Vacca, C., Silla, S., Ayroldi, E., Fioretti, M.C., Puccetti, P., 1999. IL-12 acts selectively on CD8 alpha- dendritic cells to enhance presentation of a tumor peptide in vivo. *J Immunol* 163, 3100-3105.

- Holland, M.J., Harcus, Y.M., Balic, A., Maizels, R.M., 2005. Th2 induction by *Nippostrongylus* secreted antigens in mice deficient in B cells, eosinophils or MHC Class I-related receptors. *Immunol Lett* 96, 93-101.
- Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M., O'Garra, A., 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J Exp Med* 182, 1579-1584.
- Jenkins, S.J., Mountford, A.P., 2005. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. *Infect Immun* 73, 395-402.
- Kelsall, B.L., Biron, C.A., Sharma, O., Kaye, P.M., 2002. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat Immunol* 3, 699-702.
- Khan, I.A., 2007. Toll road for *Toxoplasma gondii*: the mystery continues. *Trends Parasitol* 23, 1-3.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N., Schuler, G., 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223, 77-92.
- MacDonald, A.S., Pearce, E.J., 2002. Cutting edge: polarized Th cell response induction by transferred antigen-pulsed dendritic cells is dependent on IL-4 or IL-12 production by recipient cells. *J Immunol* 168, 3127-3130.
- MacDonald, A.S., Straw, A.D., Dalton, N.M., Pearce, E.J., 2002. Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40. *J Immunol* 168, 537-540.
- MacDonald, A.S., Maizels, R.M., 2008. Alarming dendritic cells for Th2 induction. *J Exp Med* 205, 13-17.
- Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M.D., Allen, J.E., 2004. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 201, 89-116.
- Maldonado-Lopez, R., Moser, M., 2001. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* 13, 275-282.
- McKenzie, B.S., Kastelein, R.A., Cua, D.J., 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27, 17-23.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr., 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., Forster, R., 2004. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 21, 279-288.
- Ohteki, T., Tada, H., Ishida, K., Sato, T., Maki, C., Yamada, T., Hamuro, J., Koyasu, S., 2006. Essential roles of DC-derived IL-15 as a mediator of inflammatory responses in vivo. *J Exp Med* 203, 2329-2338.
- Okano, M., Satoskar, A.R., Nishizaki, K., Abe, M., Harn, D.A., Jr., 1999. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163, 6712-6717.
- Ortner, U., Inaba, K., Koch, F., Heine, M., Miwa, M., Schuler, G., Romani, N., 1996. An improved isolation method for murine migratory cutaneous dendritic cells. *J Immunol Methods* 193, 71-79.
- Perona-Wright, G., Jenkins, S.J., MacDonald, A.S., 2006. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol* 36, 711-721.
- Reyes, J.L., Terrazas, L.I., 2007. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol* 29, 609-619.

- Rigano, R., Buttari, B., Profumo, E., Ortona, E., Delunardo, F., Margutti, P., Mattei, V., Teggi, A., Sorice, M., Siracusano, A., 2007. Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun* 75, 1667-1678.
- Rodriguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., David, J.R., Terrazas, L.I., 2003. Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol* 33, 703-711.
- Rodriguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E.P., Rosas, L.E., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I., 2004. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 72, 4552-4560.
- Rodriguez, M., Terrazas, L.I., Marquez, R., Bojalil, R., 1999. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol* 21, 177-185.
- Rook, G.A., 2007. The hygiene hypothesis and the increasing prevalence of chronic inflammatory disorders. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101, 1072-1074.
- Rubio, M., Tato, P., Govezensky, T., Molinari, J.L., 1998. Depressed immunity to a *Salmonella typhimurium* vaccine in mice experimentally parasitized by *Taenia crassiceps*. *Vet Parasitol* 74, 179-189.
- Sciutto, E., Chavarria, A., Fragoso, G., Fleury, A., Larralde, C., 2007. The immune response in *Taenia solium* cysticercosis: protection and injury. *Parasite Immunol* 29, 621-636.
- Segura, M., Su, Z., Piccirillo, C., Stevenson, M.M., 2007. Impairment of dendritic cell function by excretory-secretory products: a potential mechanism for nematode-induced immunosuppression. *Eur J Immunol* 37, 1887-1904.
- Sher, A., Pearce, E., Kaye, P., 2003. Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 15, 421-429.
- Shortman, K., Heath, W.R., 2001. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat Immunol* 2, 988-989.
- Spolski, R.J., Corson, J., Thomas, P.G., Kuhn, R.E., 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol* 22, 297-305.
- Spolski, R.J., Alexander-Miller, M.A., Kuhn, R.E., 2002. Suppressed cytotoxic T lymphocyte responses in experimental cysticercosis. *Vet Parasitol* 106, 325-330.
- Steinman, R.M., 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9, 271-296.
- Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C., 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 351-358.
- Tan, J.K., O'Neill, H.C., 2005. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. *J Leukoc Biol* 78, 319-324.
- Tarleton, R.L., 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19, 430-434.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84, 74-81.
- Terrazas, L.I., Montero, D., Terrazas, C.A., Reyes, J.L., Rodriguez-Sosa, M., 2005. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol* 35, 1349-1358.

- Thomas, P.G., Carter, M.R., Atochina, O., Da'Dara, A.A., Piskorska, D., McGuire, E., Harn, D.A., 2003. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 171, 5837-5841.
- van Liempt, E., van Vliet, S.J., Engering, A., Garcia Vallejo, J.J., Bank, C.M., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y., van Die, I., 2007. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. *Mol Immunol* 44, 2605-2615.
- van Vliet, S.J., den Dunnen, J., Gringhuis, S.I., Geijtenbeek, T.B., van Kooyk, Y., 2007. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 19, 435-440.
- Villa, O.F., Kuhn, R.E., 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112 ( Pt 6), 561-570.
- Whelan, M., Harnett, M.M., Houston, K.M., Patel, V., Harnett, W., Rigley, K.P., 2000. A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 164, 6453-6460.
- Yen, D., Cheung, J., Scheerens, H., Poulet, F., McClanahan, T., McKenzie, B., Kleinschek, M.A., Owyang, A., Mattson, J., Blumenschein, W., Murphy, E., Sathe, M., Cua, D.J., Kastelein, R.A., Rennick, D., 2006. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest* 116, 1310-1316.

## Apéndice I

### Medio de cultivo de células dendríticas R10:

RPMI 1640 (Gibco)  
10% Suero fetal bovino  
1% Antibióticos  
10 ng/ml GM-CSF (Preprotech)

### Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) 1x :

10 L, pH 7.4  
80 g NaCl (J.T. Baker)  
11.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (J.T. Baker)  
2 g KCl (ICN Biomedicals Inc.)

### PBS/Tween:

0.5 ml Tween 20 (Promega Co.)  
1 L PBS 1x.

### Solución de bloqueo:

1x PBS  
1% BSA (ICN Biomedicals Inc.)

### Solución hemolizante

Tris base 0.17 M (ICN Biomedicals Inc.)  
NH<sub>4</sub>Cl 0.16 M (J.T. Baker)  
Para 300 ml

### Sustrato ABTS (ELISA):

Agregar 150 mg de 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ICN Biomedicals Inc.) en 500 ml de ácido cítrico 0.1 M (Teqcsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a pH 4.35. Alicuotas de 11 ml mantenidos a -70°C.

### Solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%:

Agregar 10 ml de 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 90 ml de H<sub>2</sub>O. Proteger de la exposición de la luz.

**Buffer de Separación:**

PBS 1x suplementado con 2 mM EDTA y 0.5% BSA.

**Buffer para FACs**

0.1% de azida de sodio  $\text{NaN}_3$  (Sigma Chemicals), 1% de suero fetal bovino SFB (Gibco) en 1 lt PBS.

**Buffer TBE 10x**

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals)

Ácido bórico (890mM) (J.T. Baker)

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

Ajustar a pH 8 y aforar a 500 ml con agua destilada.

**Solución de poliacrilamida 100ml**

Acrilamida 30g

Bisacrilamida 0.8g

Disolver en agua bidestilada y aforar, almacenar en frasco ámbar 4 °C.

**Solución Tris Base (1.57M) pH 8.8 100ml**

Tris base 18.15g

Disolver en agua bidestilada y aforar, almacenar a 4 °C.

**Solución Tris Base (0.5M) pH 6.8 100ml**

Tris Base 6g

Disolver en agua bidestilada y aforar, almacenar a 4 °C.

**SDS 20%**

SDS 1g

Persulfato de  $\text{NH}_4$  (APS) 10%

Agua bidestilada 1ml

Disolver y aforar a 50 ml con agua bidestilada.

<b>Buffer de muestra</b>	<b>10ml</b>
Tris pH 6.8	1.2 ml
SDS 10%	2 ml
Glicerol	1 ml
2 mercaptoetanol	0.1 ml
Azul bromofenol	.05 g

Disolver en agua bidestilada y aforar a la cantidad correspondiente. Dividir en alícuotas de 1ml y almacenar a -4 °C.

#### **Solución desteñidora**

5% metanol

7% ácido acético

Agua bidestilada.

## Apéndice II.

### CFSE

La tinción con CFSE permite hacer un seguimiento de la proliferación celular (Parish, 1999). El CFDASE (carboxifluoresceindiacetato succinimidil éster) es una molécula no fluorescente que atraviesa la membrana plasmática por transporte pasivo y se acumula en el citoplasma. Las esterasas citoplasmáticas presentes en las células procesan los grupos carboxilo del CFDASE, convirtiéndolo en CFSE (carboxifluorescein succinimidil éster) que es una molécula fluorescente por la acción de las esterasas intracelulares. El CFSE es una molécula fluorescente que no puede atravesar la membrana plasmática, permaneciendo en el interior de la célula. Cuando las células teñidas con CFSE se dividen, el colorante es heredado de manera equitativa a las células hijas, por lo que, la intensidad de fluorescencia se reduce a la mitad en cada generación como consecuencia de la proliferación celular, así es posible analizar la fluorescencia en un citómetro de flujo.

Avances preliminares de este proyecto fueron presentados en los siguientes congresos:

Impaired pro-inflammatory cytokine production and Th1 biased ability of DCs exposed to Taenia antigens. LI. Terrazas, CA. Terrazas, I. Rivera and M. Rodríguez. Immunology 2007, 94<sup>th</sup> Annual Meeting, Miami Beach, FL May 18-22, 2007.

Impaired pro-inflammatory cytokine production and Th1 biased ability of DCs exposed to Taenia antigens. LI. Terrazas, CA. Terrazas, I. Rivera and M. Rodríguez. From Alaska to Chiapas: The First North American Parasitology Congress, Mérida, México Junio 21-25, 2007.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis el autor contó con beca otorgada por:

\*Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 49812

\*PAPIIT IN20870

## Abreviaturas

Acm	Anticuerpo monoclonal
Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígeno
BCR	Receptor de célula B
BMDC	Células dendríticas derivadas de médula ósea
CD11c	Integrina $\alpha$ x
CD40	Proteína integral de membrana ligando para CD40L
CD86	Molécula co-estimuladora B7-2 ligando para CD28/CTLA-4
CD80	Molécula co-estimuladora B7-1 ligando para CD28/CTLA-4
CLR	Receptor lectina tipo C
CSFE	Carboxifluorescein succimidil éster
DC-SIGN	CD209
DO11.10	Ratones con TCR transgénico para reconocer OVA
Dx-FITC	Dextran conjugado a ficoeritrina
FITC	Isocianato de ficoeritrina
FSC	Tamaño
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
MAA	Macrófagos alternativamente activados
MFI	Intensidad media de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MR	Receptor de manosa
MyD88	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NES	Antígeno secretado/excretado de <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
NFkB	Factor nuclear k B
OVA	Ovoalbúmina
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PE	Ficoeritrina
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones

RI	Respuesta inmune
SEA	Antígeno soluble de huevo de <i>Schistosoma mansoni</i>
SFB	Suero fetal bovino
SI	Sistema inmune
SSC	Granularidad
STAT	Señal transductora y activadora de transcripción
TCR	Receptor de célula T.
TcAg	Antígenos solubles de <i>Taenia crassiceps</i>
pTcAg	Antígenos solubles de <i>T. crassiceps</i> tratados con metaperyodato
TcES	Antígenos secretados/excretados de <i>Taenia crassiceps</i>
Th	Linfocitos T cooperadores
Treg	Linfocitos T reguladores
TLR	Receptor tipo toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TSA	Antígeno soluble de <i>Toxoplasma gondii</i>