



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

**Papel de la molécula Toll-Like Receptor 2 (TLR2)
en la susceptibilidad a la cisticercosis
experimental.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARISOL IBET GONZÁLEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2011



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.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 8 de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la FES-Iztacala, UNAM.

Durante la realización de este trabajo la alumna fue apoyada por una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), numero de becario 15440.

Durante la realización del mismo se contó con el apoyo de PAPIIT IN212909, CONACyT 60956-M y PAPCA-FES-Iztacala 2010-2011 Núm. 23.

Los avances de este proyecto se presentaron en el IV Simposium de Inmunoparasitología, Ixtapan de la Sal, Edo. de México; Noviembre de 2010.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Luis Ignacio Terrazas** por haberme aceptado en su equipo de trabajo y por el apoyo recibido durante la realización del mismo.

Al **Dr. José Luis Reyes Hernández** por su enseñanza durante todo el proyecto.

Al **Dr. Abhay Satoskar** por la donación de los animales transegenicos.

A la máxima casa de estudios **UNAM** y **FESI** por la oportunidad de realizarme profesionalmente.

A el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por la beca proporcionada.

A los programas **CONACyT**, **PAPIIT** y **PAPCA** por los apoyos recibidos.

A mis sinodales: **Dra. Miriam Rodriguez**, **Dr. Jose Rafael Jimenez**, **Dra. Elvia Gallegos** y **Dra. Julia Reyes** por sus valiosas sugerencias.

A la **M. en C. Irma Montoya** y **M. en C. Yadira Ledesma Soto** por su apoyo en el laboratorio.

A la **MVZ. Leticia Flores** y **Tomas Villamar** por el cuidado de los animales utilizados en este trabajo.

A todos **mis compañeros** del Laboratorio de Inmunoparasitología.

DEDICATORIAS

A mis Padres:

Mamá eres una parte fundamental en toda mi vida, te amo y respeto por todo lo que representas, te dedico este trabajo que ha sido fruto de mi esfuerzo, tú has sido siempre mi mejor amiga y mi fuerza para seguir adelante. Eres lo más grande que dios me dio porque no pude tener mejor madre que tú, la vida nos ha puesto a prueba varias veces pero siempre lo enfrentamos con gran fortaleza, gracias por todo.

Papá pese a todo lo que vivimos, ahora estamos bien y me siento muy orgullosa de todo lo que logramos, por fin llego la calma y lo más importante fue que lo hicimos juntos, te dedico este trabajo porque durante él tuvimos que vencer muchos obstáculos y esto es muestra de que salimos con éxito de todas la experiencias vividas, te amo. Siempre serás mi ejemplo a seguir, tú que nunca te cansas, tú que nunca te das por vencido.

A mis hermanos:

Verónica, Ulises, Noemí, Lázaro y Efrén les dedico este trabajo como muestra de agradecimiento por todo lo que me han dado y enseñado porque cada uno de ustedes junto con su estilo de vida representan el mejor ejemplo de confianza, éxito, respeto, bondad, valentía, fuerza e inteligencia, los amo.

A mis sobrinos:

Omar, Rafael, Eunice, Joceline, Karen, Ángel, Alan, los amo y les deseo éxito en todo lo que hagan.

A José Luis:

Tú me has enseñado mucho tanto en el ámbito profesional como en lo personal eres una gran persona, muy inteligente, te admiro y te respeto por todo lo que eres. Gracias por todo el apoyo, la amistad y el amor, gracias por ser esa persona especial en mi vida, gracias por reírte y divertirme junto conmigo.

A mis amigos:

Mónica tú fuiste la luz que me guio durante este largo camino gracias por escucharme cuando más lo necesitaba eres una gran persona. Te admiro

Marybel, Osvelia, Rocio, Yazmin gracias por compartir conmigo sus días buenos y malos las quiero mucho.

A todo el grupo 52 que vivimos muchos momentos divertidos.

Nora, Mario y Adair, nosotros vivimos una larga etapa de nuestras vidas juntos y compartimos mucho tiempo sólo haciendo “nada” son unas grandes personas, los quiero mucho.

Brenda, Alfredo, Gustavo y Diana, gracias por esos inolvidables momentos, siempre serán parte de mi historia.

A ti que fuiste parte importante de mi vida por mucho tiempo te agradezco todo lo que en su momento me diste y te deseo todo el éxito del mundo. 12345 siempre serás un gran amigo. Y a toda tu familia que me permitieron compartir parte de su vida.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
I.I. Sistema inmune.....	5
I.II Respuesta inmune innata.....	5
I. III Respuesta inmune adaptativa	7
I. IV Receptores de reconocimiento de patrones (PRR).....	9
I.V. Receptores tipo Toll (TLR por Toll Like Receptor)	10
I.VI Respuesta inmune en helmintos parásitos	13
I.VII Activación diferencial de los macrófagos (Macrófagos clásicamente activados (CAM ϕ 's) y macrófagos alternativamente activados (AAM ϕ 's))	14
I.VIII Modelo de cisticercosis experimental (<i>Taenia crassiceps</i>)	16
II. HIPÓTESIS	22
III. OBJETIVOS.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos Particulares.....	23
Estrategia experimental.....	24
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	25
IV.I Animales experimentales.....	25
IV.II Determinación del genotipo de los animales experimentales utilizando PCR.....	25
Extracción de DNA.....	25
Cuantificación de DNA.....	26
Amplificación del gen.....	26
Electroforesis.....	27
IV.III. Infección y mantenimiento de la cepa del parásito <i>Taenia crassiceps</i> en el laboratorio	28
IV.IV. Determinación de susceptibilidad en ratones deficientes en TLR2.....	28
IV.V. Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (Sandwich).....	29
Obtención del suero.....	29
Sensibilización de la placa	29
Muestras y curva	30
Revelado del ELISA	30
IV. VI. Determinación de los niveles de anticuerpos específicos (IgG2a é IgG1) anti- <i>Taenia crassiceps</i> en el suero	31
Sensibilización de la placa con antígeno.....	31
Muestras y curva	31
Revelado del ELISA	32
IV. VII. Análisis de la respuesta celular en bazo.....	32
IV. VIII. Ensayo de RT-PCR para determinar el estado de activación de los macrófagos	

.....	34
Obtención de RNA total de células de peritoneo.....	34
Transcripción reversa para hacer DNA complementario (cDNA).....	35
Amplificación de cDNA.....	36
Electroforésis del gen amplificado.....	37
IV. IX. Citometría de flujo para caracterizar la población celular reclutada en el sitio de infección.....	37
IV. X. Análisis estadístico de los datos obtenidos	38
V. RESULTADOS.....	39
V.I. Genotipo de los ratones TLR2^{+/+} y TLR2^{-/-} utilizando PCR.....	39
V.II. Los ratones TLR2^{-/-} son mas susceptibles a la infección experimental con <i>T. crassiceps</i>.....	40
V.III. Los ratones TLR2^{-/-} presentan un perfil de citocinas tipo Th2 mayor que los ratones TLR2^{+/+}.....	42
V.IV. Los ratones TLR2^{-/-} sobre producen el isotipo IgG1 anti-<i>T. crassiceps</i> asociado a una respuesta tipo Th2.....	46
V. V. Análisis de la respuesta en células de bazo en la fase crónica de la infección en ambos grupos experimentales (TLR2^{+/+} vs. TLR2^{-/-})	48
V.VI. RT-PCR de macrófagos peritoneales adherentes	51
V.VII. Citometría de flujo de células peritoneales totales.....	52
VI. DISCUSIÓN	59
VII. CONCLUSIONES	65
VIII. REFERENCIAS.....	66
IX. APÉNDICE I (Soluciones).....	71
Buffer de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10 litros y pH 7.4	71
Buffer de lisis	71
Solución hemolizante.....	71
Buffer TBE 1x	72
Buffer de pegado (ELISA)	72
Solución de lavado (ELISA).....	72
Solución de bloqueo (ELISA).....	72
Sustrato ABTS para revelado (ELISA).....	73
Buffer para FACS.....	73
Bromuro de etidio	73
X. APÉNDICE II	74
Secuencias de primers	74

ABREVIATURAS

AAM ϕ	Macrófagos alternativamente activados (Alternatively activated macrophages)
ABTS	2,2'-azino-di [3-ethylbenziazoline-6-sulfónico] (2,2'-azino- di [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic])
Ac's	Anticuerpos
Ag	Antígeno
APC	Célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cells)
CAM ϕ	Macrófagos clásicamente activados (Classically Activated Macrophages)
ConA	Concavalina A (Concavalin A)
CTL	Linfocito T citotóxicos (Cytotoxic T lymphocyte)
DNA	Ácido desoxiribonucleíco (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato (Deoxynucleoside triphosphates)
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FACS	Técnica de citometría de flujo (Fluorescence activated cell sorting)
FITC	Fluoresceína isothiocianato (Fluorescein isothiocyanate)
i.p	Intraperitoneal
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
IFN γ	Interferón gama
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible (Inducible nitric oxide synthase)
MMR	Receptor de manosa de los macrófagos (Macrophage mannose receptor)
NK	Células asesinas naturales (Natural killer cells)
NO	Óxido nítrico (Nitric oxide)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen associated molecular patterns)
PBS	Amortiguador de fosfatos (Phosphate buffered saline)

PD1	Receptor de muerte programada (Programmed death receptor-1)
PDL	Ligando del receptor PD1 (Programmed death ligand)
PE	Ficoeritrina (Phycoeritrin)
PEC's	Células totales de exudado peritoneal (Peritoneal exudate cells)
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones (Pattern recognition receptor)
R. I.	Respuesta inmune
Relm α	Molécula similar a resistina (Resistin-like molecule alfa)
RNA	Ácido ribonucleico (Ribonucleic acid)
RT-PCR	Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (Reverse transcriptase polymerase chain reaction)
TcAg	Antígeno total soluble de <i>Taenia crassiceps</i>
Th	Linfocitos T cooperadores (T helper cell)
TLR	Receptores tipo Toll (Toll-like receptor)

RESUMEN

Una de las familias más importantes de Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR) son los Receptores tipo toll (TLR), que primero fueron caracterizados en *Drosophila melanogaster* y ahora no solo se estudian en insectos, sino en mamíferos también. Estos TLR's se localizan en superficie celular o en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas de varias células de la inmunidad innata principalmente en macrófagos y células dendríticas, ellos reconocen un amplio rango de microorganismos patógenos y tienen un papel relevante en infecciones causadas por bacterias, protozoos y hongos pero su participación en infecciones por helmintos aún es desconocida.

Para determinar el papel de la molécula Toll-like Receptor 2 (TLR2) en la regulación de la respuesta inmune durante la cisticercosis murina causada por el helminto parásito *Taenia crassiceps*, se analizó el curso de la infección en ratones funcionales para la molécula TLR2 (TLR2^{+/+}) y ratones deficientes de la misma (TLR2^{-/-}). Estos últimos fueron altamente susceptibles ante la infección con *T. crassiceps* y desarrollaron hasta cuatro veces más parásitos con respecto a los ratones TLR2^{+/+} igualmente infectados, estos datos sugieren que TLR2 podría estar involucrado en el mecanismo de resistencia contra este parásito. A lo largo de la infección fue cuantificada la producción de citocinas.

Los ratones TLR2^{-/-} presentaron una mayor producción de IFN γ y menor de IL-12 que los ratones TLR2^{+/+}. Mientras que se observó una alta producción de IL-4 e IL-10 en ratones

TLR2^{-/-} con respecto a los ratones TLR2^{+/+}. De manera interesante, en la producción de anticuerpos específicos anti-*T. crassiceps* se observaron niveles significativamente más altos de IgG1 en los ratones TLR2^{-/-} con respecto a los ratones TLR2^{+/+} mientras que en los niveles de IgG2a no se observaron diferencias significativas en ambos grupos. El análisis de la respuesta proliferativa de los esplenocitos estimulados con antígeno total de *T. crassiceps* (TcAg) mostró una incapacidad de responder a dicho estímulo por parte de las células provenientes de ratones TLR2^{-/-}. Por el contrario, los ratones TLR2^{+/+} mostraron una respuesta proliferativa significativamente más alta ante el mismo estímulo. En estos cultivos fue cuantificada la producción de citocinas antígeno-específica. En donde se encontró un perfil predominante tipo Th2 en los ratones TLR2^{-/-}.

Por otro lado los macrófagos peritoneales adherentes sobreexpresaron marcadores de activación alternativa como Relm α , Ym-1, Arg-1, PD-L1, PD-L2 en los ratones TLR2^{-/-} infectados pero ninguno de estos marcadores se encontraron elevados en los ratones TLR2^{+/+}. Los macrófagos provenientes de ratones TLR2^{-/-} expresan más moléculas de MMR, PDL-1, PDL-2 y OX40L en su membrana, con respecto a los ratones TLR2^{+/+} estas diferencias fueron más evidentes en la fase crónica de la infección. Estos hallazgos sugieren que TLR2 tiene un papel importante para mediar la protección contra *T. crassiceps in vivo*. Además sugieren que la ausencia de este receptor ocasiona un desequilibrio de la respuesta inmune, teniendo como resultado la polarización hacia Th2 y la presencia de macrófagos alternativamente activados, respuesta previamente asociada con susceptibilidad en este modelo.

I. INTRODUCCIÓN

I.I. Sistema inmune

La función fisiológica del sistema inmune consiste en la defensa contra organismos infecciosos o potencialmente patógenos. Sin embargo, incluso una sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso puede despertar una respuesta inmune. Las células, órganos especializados y moléculas responsables de su ejecución constituyen dicho sistema, su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas se denomina “respuesta inmune”. La respuesta inmune tradicionalmente se ha dividido en respuesta inmune innata y adaptativa cada una con diferente función (Abbas *et al.*, 2008; Medzhitov y Janeway, 2000).

I.II Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata representa la primera línea de defensa contra las infecciones. Es un sistema rápido, universal, antiguo pero con una especificidad limitada, carente de memoria, basado en mecanismos físicos, bioquímicos y celulares de defensa, que constituyen una barrera física como superficies epiteliales, como ejemplo: la piel, el revestimiento del tubo digestivo y de las vías respiratorias, que impiden la entrada de microorganismos. Su principal mecanismo efector es la producción de una gran variedad de sustancias antimicrobianas incluyendo los miembros del sistema del complemento el cual tiene como función básica eliminar a través de la lisis a los posibles patógenos. Otros componentes de estas proteínas sanguíneas son las citocinas y quimiocinas que llevan acabo su función a través de receptores y diferentes cascadas de señalización que se

encargan de coordinar las actividades celulares induciendo la expresión de genes o inhibiéndola (Abbas *et al.*, 2008; Janeway *et al.*, 1999).

En la respuesta inmune innata también participan diferentes tipos de células o poblaciones celulares, las fagocíticas como macrófagos, citotóxicas como las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés Natural Killer), granulocíticas como eosinófilos, basófilos, neutrófilos y mastocitos y las células dendríticas consideradas como centinelas y parte fundamental de la unión de la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa ya que son las encargadas de procesar y presentar antígenos a las células T (Abbas *et al.*, 2008; Paul, 1999).

Todas estas poblaciones celulares están equipadas con receptores codificados en la línea germinal y no requieren de re-arreglo genético, el cual es esencial para el reconocimiento mediado por la respuesta inmune adaptativa. Estos en conjunto se conocen como Receptores de Reconocimiento de Patrones (PRR por sus siglas en inglés Pattern recognition receptors) y pueden estar expresados en la superficie celular, en compartimientos intracelulares o pueden ser secretados al torrente sanguíneo y fluidos tisulares (Janeway y Medzhitov, 2002).

De estos PRRs existen distintas clases, los mejor caracterizados son los Toll Like Receptors (por sus siglas en inglés TLRs) y las Lectinas. Las funciones de los PRRs incluyen opsonización, activación de la vía del complemento, cascadas de coagulación, fagocitosis,

activación de cascadas de señalización proinflamatorias y la inducción de apoptosis (Medzhitov, 2007).

Este tipo de respuesta se caracteriza por estar presente aun sin un estímulo y por reaccionar solo a microorganismos y no a sustancias no infecciosas (alérgenos) las cuales si tienen la capacidad de despertar una respuesta inmune adaptativa. Además siempre responde de igual forma a repetidas infecciones (Abbas *et al.*, 2008).

I. III Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa recibe este nombre debido a que tiene la capacidad de responder adaptándose al tipo de infección y distinguir diferentes microorganismos y moléculas, dicha capacidad se llama especificidad. Otra característica sobresaliente es: la memoria inmunológica ya que después de la eliminación o contacto con un antígeno, se mantienen circulantes o se almacenan en los órganos especializados un grupo de células adaptadas para dicho estímulo ya conocido. Al igual que la respuesta innata esta constituida por moléculas y células. Las primeras son una variedad de citocinas y quimiocinas aunque no son específicas porque también pueden ser secretadas por células de la inmunidad innata. Sin embargo las moléculas características de este tipo de respuesta son las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC tipo II) y los anticuerpos que son secretados únicamente por células plasmáticas. Existen dos tipos de linfocitos específicos de esta respuesta que expresan receptores para los antígenos (Roitt, 2000).

Los linfocitos T que a pesar de ser generados en la médula ósea requieren de un proceso de maduración llevado a cabo en el timo a diferencia de los linfocitos B que se generan y maduran en la médula ósea en ambas poblaciones celulares el reconocimiento está mediado por los receptores específicos de antígeno, los cuales son: receptor de la célula T (TCR) por T Cell Receptor y receptor de la célula B (BCR) por B Cell Receptor, respectivamente (Medzhitov, 2007; Paul, 1999).

Además los linfocitos T tienen una subdivisión ya que hay linfocitos T citotóxicos (CTL por Cytotoxic T Lymphocyte) con el marcador de membrana CD8 y linfocitos T cooperadores (Th por T Helper) con el marcador de membrana CD4 (Roitt, 2000).

El primer grupo es el encargado de eliminar células infectadas o posibles células tumorigénicas (células transformadas) así como de la producción de citocinas. Por otro lado, las células T cooperadoras se encargan de coordinar la respuesta celular a través de la producción de citocinas. En la década de los 90's este grupo de células cooperadoras se subdividió en: células Th1 caracterizadas por la alta secreción de interferón gamma ($IFN\gamma$) mientras que las células cooperadoras Th2 producen altos niveles de IL-4 e IL-13 (Mosmann y Sad, 1996). Recientemente se han caracterizado más subgrupos de células T cooperadoras tales como las Th17 y las T reguladoras (McGeachy y Cua, 2008).

Como ya se mencionó los linfocitos B son la única población capaz de secretar diferentes isotipos de inmunoglobulinas, pero además poseen la capacidad de presentar antígeno.

I. IV Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)

El sistema inmune innato reconoce patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que son expresados por microorganismos de diversas clases como virus, bacterias, hongos, etc. y los receptores que unen a estas estructuras conservadas se llaman receptores para el reconocimiento de patrones (PRR) (Janeway y Medzhitov, 2002).

Una amplia gama de tipos celulares como: neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, células epiteliales, linfocitos y otros tipos de células no inmunes expresan PRR. Estos receptores están presentes sobre su superficie, en las vesículas endosomales y en el citoplasma, listos para reconocer los microbios, ellos pueden ejercer dos funciones principales: transmitir señales para activar funciones antimicrobianas y proinflamatorias en aquellas células donde se expresen y/o facilitar la captación de los microbios por las células (Uematsu y Akira, 2008).

Los PRRs se encuentran vinculados a las vías de transmisión de señales intracelulares que activan diversas respuestas, como la producción de moléculas que favorecen la inflamación y defienden contra los microbios. Los TLRs forman la familia mas importante entre los PRRs, que se encargan de reconocer una gran variedad de ligandos, como ácidos nucleicos microbianos, azúcares, glicolípidos, y proteínas (Kawai y Akira, 2009).

Los neutrófilos y los macrófagos son fagocitos que destruyen los microbios ingeridos mediante la producción de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y enzimas en los

fagolisosomas. Los macrófagos también fabrican citocinas que estimulan la inflamación y favorecen la remodelación tisular en los focos de infección (Gordon y Martinez, 2010).

Los fagocitos también reconocen los productos microbianos y responden mediante diversos tipos de receptores, como los: TLR, las lectinas tipo C, los receptores fagocíticos, y los receptores de N-formil Met-Leu-Phe (Abbas *et al.*, 2008).

I.V. Receptores tipo Toll (TLR por Toll Like Receptor)

Una de las familias más importantes de PRR son los TLRs, que primero fueron caracterizados en *Drosophila melanogaster* y participan durante la embriogenia de la mosca en el establecimiento de su eje dorso-ventral, pero más tarde se descubrió que la proteína toll también intervenía en las respuestas antimicrobianas (Abbas *et al.*, 2008). Desde entonces, el papel de los TLRs en la respuesta inmune innata ha sido estudiado intensivamente, esto ha llevado a la identificación de receptores toll en insectos y también en mamíferos por sus importantes funciones en el reconocimiento de microorganismos. La familia de los TLRs consiste en diez miembros en humanos (TLR1- TLR10) y 12 miembros en ratones (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) (Takeda y Akira, 2007).

Los TLRs son una proteína transmembranal de tipo I (debido a que su porción N-terminal se encuentra fuera de la membrana), estos receptores tienen ectodominios que contienen repeticiones ricas en leucina que son mediadoras para el reconocimiento de los PAMPs; un dominio transmembranal; y un dominio intracelular el cual contiene una región conservada llamada receptor toll-interleucina 1 (TIR), que muestra homología con el receptor de IL-1.

Este dominio es requerido para la interacción y reclutamiento de moléculas adaptadoras, para activar la vía de señalización de citocinas inflamatorias e IFN de tipo I (Kawai y Akira, 2009, 2010).

Los TLRs son expresados en varias células del sistema inmune, como son macrófagos y células dendríticas, permitiendo a estas células responder a los agonistas de los TLRs. Estos receptores son divididos en dos grupos dependiendo de su localización celular. Un grupo esta compuesto por TLR1 TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11, que son expresados en la superficie celular y reconocen componentes microbiales membranales como lípidos, lipoproteínas y proteínas; el otro grupo esta compuesto por TLR3, TLR7, TLR8, y TLR9 los cuales son expresados en vesículas intracelulares como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, ellos reconocen RNA y DNA microbiales de cadena simple y de cadena doble (Gay *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2011).

Todos los TLR están involucrados en el reconocimiento de un amplio ámbito de PAMPs derivados de virus, bacterias, protozoos y hongos (Ver tabla 1), sin embargo, el estudio de estos receptores en respuesta a parásitos helmintos ha sido pobremente descrito (Kawai y Akira, 2010).

Tabla 1. Descripción y ligandos de TLRs (Kumar *et al.*, 2009)

TLR	Ubicación	PAMPs	Coo-receptor	Molécula Adaptadora	Factor de transcripción	Citocinas inducidas
TLR1/2	Superficie celular	Triacyl lipopéptido (bacteria y micobacteria)	Heterodimero de TLR1/2 forma un receptor funcional	TIRAP, MyD88	NfκB	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.)
TLR2	Superficie celular	Peptidoglicano (bacterias Gram-positiva), LAM (micobacteria), Hemaglutinina (Measles virus), Fosfolipomananos (<i>Candida</i>) Glycosylfosfatidil inositol mucin (<i>Trypanosoma</i>)	CD36, RP105	TIRAP, MyD88	NfκB	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.)
TLR3	Endosoma	ssRNA virus (VON), ds RNA virus (retrovirus), VSR, VCMM		TRIF	NfκB, IRF3.7	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.) e INF tipo 1
TLR4	Superficie celular	LPS (bacterias Gram-negativas), Manano (<i>Candida</i>) Glicoinositolfosfolipidos (<i>Trypanosoma</i>), Proteínas (VSR y MMTV)	MD2, CD14, LBP, RP105	TIRAP, MyD88, TRAM Y TRIF	NfκB, IRF3.7	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.) e INF tipo 1
TLR5	Superficie celular	Flagelina (bacterias flageladas)		MyD88	NfκB	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.)
TLR6/2	Superficie celular	Diacyl lipopéptidos (<i>Mycoplasma</i>) LTA (<i>Streptococcus</i>), Zymosan (<i>Sacharomyces</i>)	Heterodimero TLR6/2 o dectina 1 forma un receptor funcional	TIRAP, MyD88	NfκB	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.)
TLR7	Endosoma	ssRNA de RNA (VEV, influenza virus)		MyD88	NfκB, IRF7	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.) e INF tipo 1
#TLR8	Endosoma	ssRNA de virus		MyD88	NfκB, IRF7	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.) e INF tipo 1
TLR9	Endosoma	dsDNA virus (VHS, VCMM), CpG dominio de bacterias y virus, Hemozoina (<i>Plasmodium</i>)		MyD88	NfκB, IRF7	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.) e INF tipo 1
*TLR11	Superficie celular	Bacterias uropatógenicas, molécula como profilina (<i>Toxoplasma gondii</i>)		MyD88	NfκB	Citocinas inflamatorias (TNF-alfa, IL-6 etc.)

LAM lipoarabinomamano; VON virus del oeste nilo; VSR virus sincial respiratorio; VCMM, cytomegalovirus murino; VTMM, virus tumor mamario murino; LTA, ácido lipoteicoico VEV virus de estomatolitis vesicular, VHS, virus de herpes simple y CpG, guanosin fosfato citidina (# expresado en humano, *expresado en ratón).

Los TLRs tienen un papel crucial defendiendo al organismo contra patógenos a través de la inducción de citocinas inflamatorias e interferones de tipo I pertenecientes a la inmunidad innata y también son requeridos para el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa celular y humoral antígeno-específica (Gay *et al.*, 2006; Kawai y Akira, 2009).

Debido a la importancia de estos receptores en el reconocimiento de patógenos el estudio de sus mecanismos ayudaran a comprender el sistema inmune para contribuir al desarrollo de nuevas terapias para desordenes inmunes e infecciones. Algunos ligandos de TLRs, especialmente ácidos nucleicos, son sintetizados *in vitro*, y ya han sido aplicados en tratamientos para infecciones virales y enfermedades alérgicas. También se ha demostrado que el reconocimiento de algunos patógenos son TLR-independientes (Uematsu y Akira, 2008).

Futuros estudios o la identificación de nuevas familias de receptores de la inmunidad innata y sus vías de señalización podrían ayudar a tener mayor claridad en las interacciones hospedero-patógeno (Kumar *et al.*, 2009). Al entender la manera en la que los parásitos modulan el sistema inmune, estos mecanismos podrían ayudar a controlar algunas enfermedades autoinmunes como son la diabetes de tipo I, etc.

I.VI Respuesta inmune en helmintos parásitos

Los helmintos parásitos son organismos multicelulares que son llamados así comúnmente. Estos divergieron aproximadamente hace 600 millones de años de un ancestro de vida libre y generalmente están agrupados en dos taxones: los nemátodos o gusanos redondos y los platelmintos o gusanos planos. Estos últimos a su vez se subdividen en tremátodos y céstodos (Maizels *et al.*, 2004).

La regulación inmune por los helmintos parásitos es un concepto global que incluye supresión o polarización de la respuesta inmune del hospedero en beneficio de los patógenos. Estos organismos poseen diferentes morfologías, estructuras accesorias así como diversos ciclos de vida por lo que generan una gran variedad de enfermedades ya que pueden alojarse en diferentes órganos y tejidos como el tracto gastrointestinal, piel, vejiga, músculos, hígado, ojos, pulmones y cerebro. A pesar de esta diversidad gracias al estudio de diferentes modelos experimentales de helmintiasis se han identificado fenómenos de inmunomodulación consistentes o comunes tales como: la polarización hacia una respuesta inmune de tipo Th2 caracterizada por la producción de citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 y anticuerpos IgG1 e IgE como consecuencia del efecto ejercido por las citocinas mencionadas. Además la infección por helmintos ocasiona un aumento de poblaciones como eosinófilos y de mastocitos junto con una baja respuesta linfo-proliferativa en órganos como el bazo ante antígenos del mismo helminto así como estímulos policlonales no relacionados (Concavalina A ó anti-CD3). Recientemente se ha identificado una característica más compartida por estos parásitos, que es la identificación de

subpoblaciones de células con capacidad reguladora, ahora se conocen tanto a las células T reguladoras (T regs) como a los macrófagos alternativamente activados (AAM ϕ 's), ambos se reclutan en los sitios en donde residen estos parásitos. Por ejemplo las Tregs son una población que aparecen en respuesta a la infección por *Brugia malayi*, *Heligmosomoides polygyrus*, en contraste a los AAM ϕ 's que se han encontrado en la mayoría de los modelos experimentales de helmintiasis, cabe resaltar que en algunos casos ambas poblaciones pueden coexistir. Sin embargo, el papel que desempeñan estas poblaciones aun no está claro y parece depender del helminto que las induce. Algo importante a resaltar es el hecho de que estas poblaciones se han asociado con los efectos causados por estos parásitos sobre desordenes de tipo autoinmune o alérgicos (Maizels *et al.*, 2004; Reyes y Terrazas, 2007).

I.VII Activación diferencial de los macrófagos (Macrófagos clásicamente activados (CAM ϕ 's) y macrófagos alternativamente activados (AAM ϕ 's))

En los últimos años se ha demostrado que las macrófagos (M ϕ 's) poseen una plasticidad que les permiten adoptar distintos fenotipos de acuerdo al microambiente en el que se encuentran estimulados. Por ejemplo, los CAM ϕ 's se encuentran en un ambiente en el cual predominan estímulos proinflamatorios tales como las citocinas IFN γ y TNF α ó productos derivados de bacterias con la misma actividad proinflamatoria como LPS que inducen la expresión de moléculas como IL-12 y la sintasa de óxido nítrico (iNOS). Dicha enzima utiliza como sustrato L-Arginina para producir óxido nítrico y debido a que esta molécula es tóxica para los microorganismos patógenos, estos CAM ϕ 's poseen una alta capacidad microbicida por lo que este estado de activación de los macrófagos se asocia con

resistencia ante infecciones causadas por patógenos intracelulares (Gordon y Martinez, 2010; Martinez *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que los M ϕ 's estimulados con las citocinas IL-4 e IL-13 adquieren un estado de activación alternativo al de los CAM ϕ 's. Este estado es caracterizado por la disminución en la expresión de iNOS, mientras que sobre expresan la contraparte de esta enzima, la Arginasa-1, la cual utiliza el mismo sustrato que los CAM ϕ 's pero los productos finales son distintos ya que esta Arginasa-1 produce urea y prolinas en lugar de oxido nítrico. Por lo que estos AAM ϕ 's poseen una baja capacidad microbicida en contraste con los CAM ϕ 's. Además, se ha descrito que estos AAM ϕ 's también sobre expresan otras moléculas tales como el receptor de manosa (MMR), las quitinasas Relm α y Ym-1. Estos AAM ϕ 's poseen una alta capacidad fagocítica y de reparación de tejido (Gordon y Martinez, 2010; Martinez *et al.*, 2009).

Debido a que estos AAM ϕ 's se generan en un microambiente de citocinas tipo Th2 han sido ampliamente estudiados en infecciones experimentales causadas por helmintos ya que estos son fuertes inductores de estas citocinas. Sin embargo la función de estos AAM ϕ 's parece ser diversa en cada una de las diferentes infecciones (Reyes y Terrazas, 2007).

I.VIII. Modelo de cisticercosis experimental (*Taenia crassiceps*)

Taenia crassiceps es un céstodo parasito que durante su ciclo de vida requiere de un hospedero intermediario (roedores) en la fase de larva o metacéstodo y de un hospedero definitivo (cánidos) en la fase de adulto (ver ilustración 1). Durante años se ha utilizado la infección experimental con metacéstodos en ratones de laboratorio para comprender las interacciones hospedero-parásito en este modelo de helmintiasis. Algunas cepas de *T. crassiceps* han sido aisladas para su uso en diversos estudios entre ellas se encuentra la cepa HYG, KBS, Toi, ORF y recientemente también la cepa WFU, en este estudio se utilizó la cepa estéril ORF (Willms y Zurabian, 2009).

En la década de los ochenta se describió que los ratones hembra de la cepa BALB/c son más susceptibles que los machos, debido a esto surgió una intensa investigación en los fenómenos relacionados con las gónadas y hormonas sexuales que determinan el curso de la infección. Por otro lado también se han investigado los fenómenos de inmunomodulación inducidos por este parásito para poder crecer en su hospedero (Montor *et al.*, 1998).

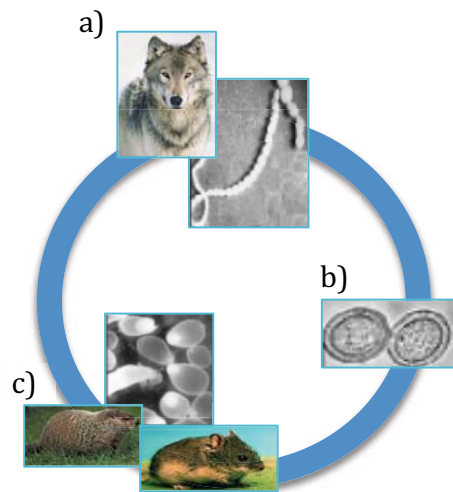


Ilustración 1. Ciclo de vida *T. crassiceps* a) Adulto en el intestino del hospedero definitivo (cánidos); b) Huevos infectivos liberados en las heces, estos son ingeridos por hospederos intermediarios; c) Las larvas crecen en el hospedero intermediario (roedores) y son ingeridos por un hospedero carnívoro definitivo, donde crece el gusano adulto específicamente en el duodeno cerrando el ciclo (Willms y Zurabian, 2009).

Utilizando la infección con 10 metacístodos, se describió que existe una respuesta tipo Th1 (alta producción de $IFN\gamma$) rápida y transitoria durante las dos primeras semanas de infección que conforme avanza el tiempo se vuelve mas difícil de detectar; mientras que una respuesta tipo Th2 (producción de IL-4 e IL-13) predomina a partir de la semana cuatro de la infección; poco tiempo después se demostró que bloquear la función del $IFN\gamma$ mediante anticuerpos dirigidos contra esta citocina aceleraba el crecimiento de *T. crassiceps* (Terrazas *et al.*, 1998).

Posteriormente el uso de ratones deficientes para diversas moléculas tales como el factor de transcripción, Signal Transducer and Activation of Transcription (STAT)-6 el cual es requerido para inducir una respuesta tipo Th2, mostró que estos ratones en los cuales predomina la respuesta Th1 se encontró un crecimiento significativamente menor de *T.*

crassiceps comparado con los ratones con el gen funcional de STAT-6 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002a).

Como contraparte, en otro estudio se utilizaron ratones deficientes en la molécula STAT-4 que es requerida para promover una respuesta Th1y que por lo tanto en ausencia de esta molécula predominó un microambiente de citocinas y anticuerpos tipo Th2 teniendo como consecuencia el aumento de la susceptibilidad a la infección con *T. crassiceps* como se observó en una mayor carga parasitaria en los ratones deficientes para STAT-4 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004).

Rodríguez Sosa y colaboradores en el 2003 realizaron un trabajo con ratones deficientes en el Factor Inhibidor de la Migración de los Macrófagos (MIF), molécula de la respuesta inmune innata que actúa como una quimiocina manteniendo in situ a los macrófagos en el sitio de la infección, que promueve la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 y otros mediadores de inflamación como COX 2 y PGE2 (Roger *et al.*, 2003). Estos autores utilizaron ratones MIF^{-/-} para conocer el papel de la misma en la infección con *T. crassiceps*. Encontraron que los ratones MIF^{-/-} eran más susceptibles ante esta infección ya que presentan una mayor carga parasitaria en comparación con los ratones MIF^{+/+} ellos a su vez estimularon células de bazo con antígeno soluble de *T. crassiceps* donde observaron que ambos grupos experimentales (MIF^{+/+} vs MIF^{-/-}) producían la misma cantidad de IL-4, sin embargo, los ratones MIF^{-/-} producían mas IL-13 así como más IFN γ sugiriendo que la susceptibilidad ante la infección con este céstodo no se debió a la

producción IFN γ . En los cultivos de macrófagos peritoneales estimulados con LPS mas IFN γ produjeron bajos niveles de IL-12, TNF α y óxido nítrico comparado con las células provenientes de ratones MIF^{+/+}. Esto hallazgos demostraron que MIF juega un papel importante en la protección contra la infección de *T. crassiceps in vivo*. Además estos hallazgos también sugirieron que la presencia de los macrófagos alternativamente activados son más importantes que la carencia del desarrollo de una respuesta tipo Th1 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2003).

Además de la modulación de citocinas Th1 y Th2 en este modelo se describió el reclutamiento de una población de M ϕ 's con una alta expresión en la membrana de las moléculas CD23 y CCR5 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002b).

Posteriormente, un análisis más profundo de esta población llevó a la identificación de estos macrófagos con sobre expresión de Relm α , Ym-1, Arginasa-1, PD-L1 y PD-L2, también se describió que esta población además de estar en un estado de activación alternativa tenían la capacidad de suprimir la proliferación de células T activadas a través de la función de PD-L1 y PD-L2 (Terrazas *et al.*, 2005).

Recientemente se demostró que la eliminación de estos macrófagos ocasionó una disminución significativa en la carga parasitaria. Estos datos sugieren que en la infección con *T. crassiceps* se reclutan AAM ϕ 's en un microambiente tipo Th2 y que parecen ser necesarios para el establecimiento de este parásito (Reyes *et al.*, 2010).

A pesar de la serie de experimentos descritos y del uso de animales genéticamente deficientes en moléculas clave de la respuesta inmune, los mecanismos de identificación temprana de este parásito y otros helmintos es poco conocida.

Los TLRs son entre otros receptores, los encargados del reconocimiento temprano de moléculas de patógenos y parecen ser esenciales para iniciar una respuesta inmune en contra de estos. En el caso de infecciones causadas por helmintos existe muy poca información en relación a si las moléculas de estos parásitos son reconocidas por TLRs y las posibles consecuencias de este reconocimiento en el curso de la infección. Recientemente, se identificó que la lisofosfatidilcolina presente en los antígenos del huevo de *Schistosoma mansoni* es reconocida por el TLR2 y que este reconocimiento se asocia con el reclutamiento de eosinófilos hacia el granuloma hepático ocasionado por este parásito (Magalhaes *et al.*, 2010).

En el caso de la infección causada por el tremátodo *Fasciola hepatica* se sugiere que los antígenos excretado/secretados podrían ser reconocidos por TLRs sin embargo, no se han definido las moléculas ni los receptores involucrados (Flynn y Mulcahy, 2008). También se ha descrito que antígenos derivados del adulto de *Onchocerca volvulus* podrían ser reconocidos por TLRs (Gentil y Pearlman, 2009).

Estos datos sugieren que efectivamente los TLRs pueden reconocer diversos antígenos derivados de helmintos y que este reconocimiento podría ser importante para determinar el curso de la infección. De manera interesante, a pesar de que en el modelo de infección experimental con *T. crassiceps* se han descrito diversos mecanismos de inmunomodulación inducidos por este parásito no se conoce la posible participación de los TLRs en ellos.

II. HIPÓTESIS

Debido a que TLR2 es necesario para iniciar una respuesta proinflamatoria, y que ésta última se ha asociado con resistencia en el modelo de infección por *T. crassiceps*, la ausencia de este receptor ocasionará una deficiente respuesta proinflamatoria permitiendo así un mayor crecimiento de *T. crassiceps*.

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la participación de la molécula Toll-like Receptor 2 tanto en la susceptibilidad como en la respuesta inmune ante la infección experimental con *Taenia crassiceps*.

Objetivos Particulares

- Analizar la susceptibilidad/resistencia en los ratones deficientes de la molécula TLR2 durante la infección con *T. crassiceps*.
- Comparar la producción de citocinas relacionadas a respuestas tipo Th1/Th2 en presencia y ausencia de TLR2 en la infección con *T. crassiceps*.
- Evaluar la producción de anticuerpos asociados a respuestas tipo Th1/Th2 específicos contra antígenos de *T. crassiceps*.
- Analizar la respuesta proliferativa y producción de citocinas en células totales de bazo ante el estímulo de antígenos de *T. crassiceps*.
- Determinar el estado de activación de las células peritoneales adherentes por medio de RT-PCR.
- Determinar la presencia de moléculas asociadas a un estado de activación alternativa en la superficie membranal de células totales peritoneales.

Estrategía experimental

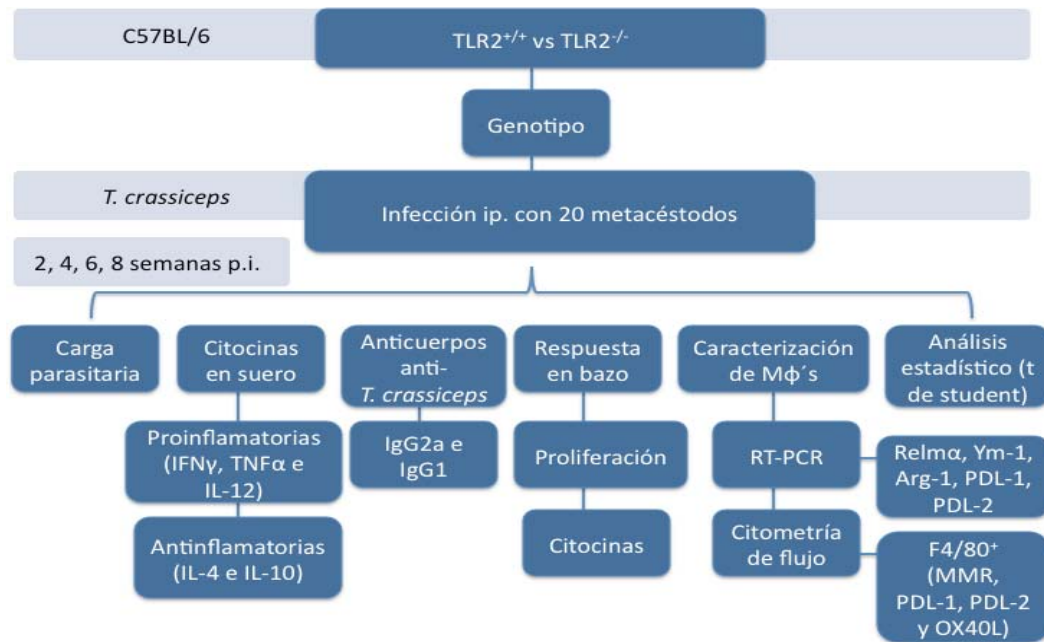


Ilustración 2. Diagrama de flujo de la estrategia experimental utilizada para determinar la susceptibilidad de los ratones TLR2^{-/-} con respecto a los ratones TLR2^{+/+} en la infección con *Taenia crassiceps*.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.I Animales experimentales

Los ratones utilizados en este trabajo fueron hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa C57BL/6, los cuales fueron utilizados como el grupo control (TLR2^{+/+}). Los ratones deficientes en TLR2 (TLR2^{-/-}) del mismo fondo genético fueron donados por el Dr. Abhay Satoskar de la Universidad Estatal de Ohio (The Ohio State University, Columbus OH USA). Ambos grupos experimentales se mantuvieron en condiciones similares dentro de cajas de policarbonato para ratones en el bioterio de la FES-Iztacala de acuerdo con el reglamento del mismo.

IV.II Determinación del genotipo de los animales experimentales utilizando PCR

Extracción de DNA

Se utilizaron ratones hembra para los dos grupos a experimentar con fondo genético C57BL/6. Cabe destacar que todo el material que se empleo para esta técnica era material nuevo, estéril y libre de DNAsas-RNAsas. A cada uno de los ratones se les hizo un corte aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola y se llevó acabo la digestión de este tejido en tubos de 1.8 ml (Eppendorf), en ellos se colocó la cola con 500 µl de buffer de lisis (Apéndice I) y 20 µl de Proteinasa K (Invitrogen 100 µg/µl) durante toda la noche en un incubador a 55 °C.

Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se pasó a otros tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, se homogenizó invirtiéndolos de manera suave hasta que la precipitación del DNA fue evidente. Se centrifugó a 14 000 rpm durante un minuto para concentrarlo y se decantó la fase líquida para después lavar el botón de DNA con etanol frío al 75 % en el mismo tubo, centrifugándolo a 14000 rpm por 5 minutos, se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por lo menos 1 hora. Cuando ya se tuvo el botón de DNA se secó y resuspendió en el tubo con 200 µl de agua grado molecular, para nuevamente incubarlo toda la noche a 55 °C.

Cuantificación de DNA

Esta parte se realizó utilizando una dilución de muestra de 1:200 de DNA en agua. El espectrofotómetro (Jenway, Genova) se calibró con agua grado molecular y se leyeron las muestras a 260 nm. La concentración final se obtuvo con el factor de 1 D.O.=40 µg.

Amplificación del gen

Para el reconocimiento del gen TLR2 se utilizaron los primers específicos, obtenidos de la página de Jackson Laboratories (Apéndice II).

En éste proceso de PCR se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas con capacidad de 0.2 ml, para obtener un volumen final de 25 µl, se colocaron los siguientes reactivos (kit taq Platinum polimerase, Invitrogen) en orden:

	Gen TLR2
Agua	9.25 μ l
Buffer 10x	2.5 μ l
MgCl ₂	0.75 μ l
DNTP mix	0.5 μ l
Primer F	2.0 μ l
Primer R	2.0 μ l
DNA Taq polimerasa	1.0 μ l
Muestra DNA	1.25 μ l

Una vez que se tuvieron los tubos rotulados y con los respectivos reactivos se colocaron en el termociclador (Corbett Research) con el programa Palmcycler System Manager Pocket Pc 2003, la temperatura de alineación mencionada en el apéndice II.

Electroforésis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1.5 % en Buffer TBE 1x (Apéndice I) sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos, que se mantuvo a temperatura ambiente hasta solidificarse.

Una vez hecho el gel, se hizo una dilución 1:4 de DNA y se colocaron por pozo, 2 μ l de la muestra previamente diluida a 8 μ l de buffer de carga blue juice (Invitrogen), a partir del segundo pozo ya que en el primero se colocaron 3 μ l del marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Se colocaron las muestras en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 100 Volts, 45 Amperes durante 30 minutos. Se observó en un transiluminador con luz UV (FujiFilm FLA-5000) y se capturó la foto utilizando el programa ImageReader FLA-5000 V2.1.

IV.III. Infección y mantenimiento de la cepa del parásito *Taenia crassiceps* en el laboratorio

Una vez determinado tanto el genotipo del grupo control (TLR2^{+/+}), como el del grupo de ratones deficientes de TLR2 (TLR2^{-/-}) se infectaron intraperitonealmente (i.p.) con 20 metacéstodos de *T. crassiceps* de la cepa ORF de 2 mm sin gemaciones, que se recuperaron de ratones previamente infectados de ocho semanas. Para mantener la cepa se realizaron pases sucesivos en ratones C57BL/6 estos fueron infectados intraperitonealmente con 20 metacéstodos resuspendidos en 1.0 ml de solución salina estéril, estos pases se realizaron durante todo el proyecto.

IV.IV. Determinación de susceptibilidad en ratones deficientes en TLR2

Después de las 2, 4, 6 y 8 semanas de infección los ratones se sacrificaron y se realizó un lavado peritoneal con 10 ml de solución salina estéril para recuperar los parásitos, estos fueron contados para determinar así la carga parasitaria por ratón.

IV.V. Determinación de los niveles de citocinas empleando la técnica de ELISA (Sandwich)

Obtención del suero

Los ratones fueron sangrados de la cola mediante una incisión con un bisturí a las 2, 4, 6 y 8 semanas posteriores a la infección. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Phillips), donde se mantuvieron durante 3 minutos para inducir dilatación en la vena caudal y facilitar el sangrado, obteniendo de 400 a 700 μ l de sangre la cual se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el suero sanguíneo. El suero obtenido se mantuvo a -70 °C hasta su uso para la cuantificación y determinación de citocinas y anticuerpos.

La medición se realizó en las semanas 2, 4, 6 y 8 posteriores a la infección. Se utilizaron los pares de anticuerpos (Preprotech) para detectar INF γ , IL-12, TNF α , IL-4 e IL-10. En todos los casos, se siguieron las indicaciones del proveedor como a continuación se describe:

Sensibilización de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura 2 μ g/ml en el buffer de pegado (Apéndice 1) se homogenizó y se colocaron 100 μ l por pozo utilizando una micropipeta multicanal en una placa para ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp). Para que se llevara a cabo la reacción de pegado del anticuerpo a la placa, esta última se incubó a 4 °C toda la noche en oscuridad.

Muestras y curva

Al día siguiente se sacó la placa del cuarto frío y se lavó tres veces con la solución de lavado (Apéndice I), se secó por aspiración y durante una hora a 37 °C se bloqueó para evitar pegado inespecífico con 200 µl de solución de bloqueo (Apéndice I), después se lavó tres veces más y se secó por aspiración.

En el caso de los cultivos celulares se utilizarán 50 µl de sobrenadante y 25 µl para el suero. Las muestras se colocaron en los pozos correspondientes, posteriormente, para poder 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 50 a 0.01 ng y nuevamente se incubó la placa toda la noche a 4 °C.

Revelado del ELISA

La placa se llevó a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces y se secó por aspiración para adicionar el anticuerpo correspondiente a cada citocina marcado con biotina en un volumen de 100 µl por pozo de una dilución de 2 µg/ml de anticuerpo con biotina en solución de bloqueo, se incubó por una hora a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación se lavó cuatro veces la placa y se secó por aspiración.

Se preparó una dilución de 1:5000 de enzima streptoavidina peroxidasa (PeproTech Inc) en solución de bloqueo, para obtener un volumen final de 10 ml de esta dilución y colocar 100 µl por pozo para dejar incubar las placas por 35 minutos a temperatura ambiente.

Por último, se lavó siete veces la placa después de la incubación con la enzima y se preparó la solución de revelado que consiste en 100 µl de H₂O₂ al 3 % (J.T. Baker) en 10 ml de ABTS (Apéndice I) para poner 100 µl por pozo, se dejó a temperatura ambiente 10 minutos y se llevó al lector de placa (Thermo Labsystems, Multiskan Ascent), utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

IV. VI. Determinación de los niveles de anticuerpos específicos (IgG2a é IgG1) anti-*Taenia crassiceps* en el suero

Sensibilización de la placa con antígeno

La cuantificación de Ac's se realizó en las semanas 2, 4, 6 y 8 posteriores a la infección. Se utilizó una placa de 96 pozos (Nunc, Polisorp). Se diluyó 10 µg/ml de antígeno total de *T. crassiceps* en PBS pH 9 y se colocaron 100 µl por pozo, se cubrió la placa y se incubó toda la noche a 4 °C.

Muestras y curva

Después de dicha incubación las placas se lavaron dos veces con solución de lavado (Apéndice I) y se secaron por aspiración, una vez secas, se bloqueó el pegado inespecífico con 200 µl de solución de bloqueo durante una hora en un incubador a 37 °C. Terminado el tiempo de bloqueo, se lavaron cuatro veces y se secaron las placas para colocar las muestras

partiendo de una dilución de 1:25 del plasma en solución de bloqueo. Ya colocadas las muestras se incubaron las placas durante hora y media a 37 °C, nuevamente se lavaron cuatro veces y secaron por aspiración.

Revelado del ELISA

Ya secas las placas se les colocó 100 µl por pozo del anticuerpo anti-IgG2a (Zymed) y anti-IgG1 (Zymed), según fue el caso diluido 1:500 en una solución de 75 % PBS y 25 % SFB (suero fetal bovino, Gibco) y se incubó por una hora a 37 °C.

Por último, se lavaron las placas seis veces y secaron por aspiración, para después colocar 100 µl de la solución de revelado compuesta por 10 ml de ABTS (Apéndice I) y 100 µl de H₂O₂ al 3 % (J. T. Baker). Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente para obtener la coloración y se utilizó el filtro de 405 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA (Termo Labsystems)

IV. VII. Análisis de la respuesta celular en bazo

En la etapa crónica de la infección (6 y 8 semanas p.i.) se sacrificaron tres ratones de cada grupo experimental (TLR2^{+/+} y TLR2^{-/-}). En condiciones asépticas, dentro de una campana de flujo (VECO) se les extrajo el bazo colocándolo en una caja Petri, posteriormente se separaron las células del resto del tejido y se masero en separadores celulares (B. D. Falcon, cell strainer) con embolos estériles de geringas, finalmente se depositaron las células en tubos estériles de 10 ml (Nalge, Nunc Int).

Para concentrarlas se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos y posteriormente fueron tratadas con 5 ml de solución hemolizante (Apéndice I) durante 15 minutos para eliminar los eritrocitos restantes. Se centrifugaron por 10 minutos a 1500 rpm y se decantaron. A las células libres de eritrocitos se agregó 5 ml de medio D-MEM (Gibco, suplementado con D-glucosa y libre de L-Glutamina, 10 % SFB y streptomycin) para homogenizar y contar las células viables utilizando la prueba de exclusión con azul de Tripano, tomando 20 μ l de muestra y 20 μ l de azul de Tripano (Sigma Chemicals co). En la cámara de Neubauer se colocaron 10 μ l con micropipeta estéril del homogenizado y se contaron cinco cuadrantes para obtener el número de células por mililitro, para después ajustar a 3×10^6 células/ml con medio D-MEM. Se colocaron 100 μ l por pozo en una placa de cultivo celular de 96 pozos (B. D. Falcon), para obtener una concentración final de 3×10^5 células por pozo. Una vez colocadas las células en la placa, se estimularon con 25 μ g por ml de antígeno total de *T. crassiceps*. Esta re-estimulación se llevó a cabo por cinco días en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂ y terminado el tiempo indicado, se recolectaron los sobrenadantes y congelaron a -70 °C hasta su uso para cuantificar la producción de citocinas por ELISA.

IV. VIII. Ensayo de RT-PCR para determinar el estado de activación de los macrófagos

Obtención de RNA total de células de peritoneo

Como anteriormente se menciono se obtuvieron células totales de los ratones por medio de un lavado peritoneal a los tiempos indicados en condiciones de esterilidad. Posteriormente se sembraron 1 millón de células por pozo en una placa de cultivo celular de 24 pozos y se incubaron dos hrs a 37 °C, 5 % CO₂ para que se adhieran. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó 1 ml de Trizol (Invitrogen) a las células adherentes, se tomó el liquido con una micropipeta y puntas libres de RN-asas después fue depositado en tubos de 1.8 ml (Eppendorf) para almacenarlos a -70 °C hasta su uso.

Posteriormente se descongelaron las muestras para obtener el RNA total por medio de la técnica fenol-cloroformo, agregando a cada muestra 200 µl de cloroformo frío, agitandolo fuertemente en el vortex por 15 segundos para centrifugar las muestras a 8,000 rpm durante 10 minutos, recuperando el sobrenadante el cual se coloco en otros tubos con 500 µl de isopropanol frío manteniendolos 10 minutos a -20 °C y se centrifugaron 10 minutos a 10,000 rpm para obtener el concentrado de RNA que se resuspende y lava dos veces con un ml de etanol al 75 % a 13500 rpm durante 5 minutos, al finalizar se decanta sin perder la pastilla para dejar secar a temperatura ambiente y almacenar con 20 µl de agua estéril a -70 °C hasta su uso.

Transcripción reversa para hacer DNA complementario (cDNA)

Se utilizó el kit First Strand Synthesis Superscript II, se emplearon 3 µg de RNA total y se siguió el protocolo propuesto por el proveedor, descrito a continuación:

Dentro de la campana de flujo laminar (VECO) se realizó la mezcla de los componentes del kit en tubos libres de RNAsas de 0.2 ml. Los volúmenes que contenían los 3 µg de RNA total se ajustaron a 10 µl con agua grado molecular para cada reacción, posteriormente a cada muestra se le agregó un µl de dNTP's mix (10mM) y 1 µl de oligo dT (0.5 µM), después se incubaron por cinco minutos a 65 °C en el termociclador (Corbett Research) y los tubos se colocaron un minuto en una cama de hielo. Al concluir el minuto a cada tubo se le adicionó los siguientes componentes con el volumen indicado.

Buffer 10x RT	2µl
MgCl 25mM	4µl
DTT 0.1M	2µl
RNase OUT	1µl

Se agitaron suavemente los tubos y se incubaron dos minutos a 42 °C, para posteriormente adicionar a cada reacción un µl de enzima Superscript II RT (50 unidades), se incubó por 50 minutos a 42 °C. para terminar esta reacción, los tubos se colocaron a -70 °C por 15 minutos y posteriormente en hielo por cinco minutos.

Cuando se obtuvo el cDNA a cada tubo se le agregó 1 μ l de enzima degradadora de RNA (RNase H) y se incubó a 37 °C por 20 minutos. Una vez terminado el procedimiento indicado se realizó una dilución 1:200 de la muestra en agua grado biología molecular para cuantificar la cantidad de cDNA obtenido, leyéndolo a 260 nm en un espectrofotómetro (Jenway) y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Amplificación de cDNA

Cuando se determinó la cantidad de cDNA obtenido de cada ratón, con el objetivo de realizar un análisis semicuantitativo de diferencias en la transcripción de los diferentes genes analizados, incluyendo los marcadores de activación alternativa para los macrófagos (GAPDH, Relm α , Ym-1, Arg-1, iNOS, PD-L1, PD-L2). Los primers específicos que se utilizaron para cada gen y la temperatura de alineación que se utilizó en el termociclador (Corbett Research) con el programa Palmcycler System Manager Pockeet Pc, 2003, son los referidos en el apéndice II.

Las reacciones se prepararon en tubos nuevos y libres de DNAsas con 0.2 ml de capacidad.

Las mezclas se llevaron al volumen final de 25 μ l con las siguientes concentraciones:

1Rxn

Buffer 10x	2.5 μ l
MgCl 25mM	0.75 μ l
DNTP mix 5mM	2 μ l
Primer F 50pM	1 μ l
Primer R 50pM	1 μ l
Taq Polimerasa 5U/ μ l	0.25 μ l

Electroforésis del gen amplificado

Para esta parte se preparó un gel de agarosa al 1.5 % en buffer TBE 1X (Apéndice I) con blue juice y Syber green, en una cámara molde se solidificó a temperatura ambiente. Una vez terminado el programa de ciclado a cada tubo se le adicionó 6 µl de buffer de carga (Invitrogen), se homogenizó y se tomó 10 µl de muestra en cada pozo. Por último se colocó en el primer pozo tres µl de marcador de peso molecular de 100 pb y se corrió durante 50 minutos a 85 volts y 45 amperes. Para observar y capturar la imagen de las bandas obtenidas, se utilizó un transiluminador de luz UV (FujiFilm FLA-5000) y se capturó la foto utilizando el programa ImageReader FLA-5000 V2.1.

IV. IX. Citometría de flujo para caracterizar la población celular reclutada en el sitio de infección

Cuando se cumplieron las semanas 2, 6 y 8 post-infección analizaron las células reclutadas en la cavidad peritoneal. Los ratones TLR2^{+/+} y TLR2^{-/-} infectados con *T. crassiseps* se sacrificaron en la campana de flujo, posteriormente se inyectaron i.p. con 10 ml de solución salina estéril (Pisa) para realizar un lavado peritoneal y con la jeringa se recuperaron células totales del peritoneo, que se colocaron en tubos de 15 ml. Los tubos con las células se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm para concentrarlas, se decantó el sobrenadante, dentro de la campana, se resuspendió el botón de células y se le adicionó a cada tubo 3 ml de buffer para FACS (Apéndice I). Se homogenizó la suspensión para realizar el conteo en la cámara de Neubauer, ajustándolas con el buffer de FACS a un millón de células por ml y se colocaron en tubos para análisis de citometría (B. D. Falcon).

A las células ajustadas y concentradas se les agregó 200 μ l del mismo buffer donde se tiñeron con un μ l de los anticuerpos conjugados con los distintos marcadores de fluorescencia y un anticuerpo isotipo (IgG2a) como control para pegado inespecífico, a una concentración de 0.2 μ g combinados de la siguiente manera:

F480 (APC, BioLegend) – MMR (FITC, BioLegend)

F480 (APC, BioLegend) – PDL1 (PE, BioLegend)

F480 (APC, BioLegend) – PDL2 (PE, BioLegend)

F480 (APC, BioLegend) – Ox40L (PE, BioLegend)

Una vez agregados los anticuerpos se incubó durante 30 minutos a 4 °C, se lavaron las células dos veces más con buffer de FACS a 2000 rpm por 10 minutos para eliminar los anticuerpos no adheridos, finalmente se les agrego 500 μ l para su lectura utilizando el programa Cell Quest y el citometro FACSCalibur (Becton Dickinson) para la captura de cada muestra.

IV. X. Análisis estadístico de los datos obtenidos

Se utilizó el programa Graph pad Prism 3.0 para obtener el promedio y error estándar de los datos, así como para las diferencias por medio de la prueba de “t” no pareada. Los valores de “p” menores a 0.05 se consideraron significativamente diferentes.

V. RESULTADOS

V.I. Genotipo de los ratones TLR2^{+/+} y TLR2^{-/-} utilizando PCR

Para comprobar la deficiencia de la molécula TLR2 en los ratones se realizó la técnica de PCR utilizando DNA proveniente de sus colas previamente procesadas por el método de extracción de isopropanol/cloroformo. Este se amplificó con la temperatura indicada y se corrió en un gel de agarosa al 1.5 %. En la figura 1 podemos observar la presencia del gen para TLR2 y la ausencia del mismo. En el carril 2 no se observó ninguna banda indicando que estos ratones eran deficientes para la molécula TLR2. Mientras que en el carril 3 se puede ver la banda de los ratones silvestres correspondiente a 499 pb de acuerdo con el marcador de peso molecular (MPM) que se encuentra en el primer carril. De esta manera se confirmó el genotipo de los ratones utilizados para los experimentos.

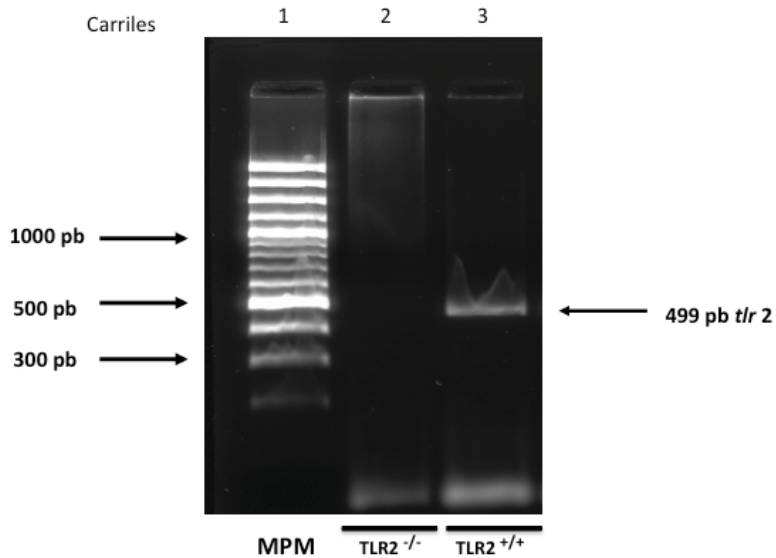


Figura 1. Electroforésis de fragmentos de DNA amplificados por PCR en un gel de agarosa al 1.5% en amortiguador TBE 1x para la molécula TLR2. En el carril uno se observa el marcador de peso molecular (100 pb), en el carril dos no se detectó la banda correspondiente al gen de TR2 en el grupo experimental TLR2^{-/-} y en el carril tres se observó la banda de TLR2 con un peso molecular de 499 pb en el grupo control TLR2^{+/+}.

V.II. Los ratones TLR2^{-/-} son mas susceptibles a la infección experimental con *T. crassiceps*

Para analizar la susceptibilidad/resistencia en los ratones deficientes para la molécula TLR2 durante la infección con *T. crassiceps*, se infectaron i.p. ratones hembra con fondo genético C57BL/6 tanto deficientes para la molécula TLR2 (TLR2^{-/-}) así como ratones funcionales para TLR2 (TLR2^{+/+}) con 20 metacístodos de *T. crassiceps*. Después de 2, 4, 6 y 8 semanas de infección los animales se sacrificaron y se realizó un lavado peritoneal con solución salina estéril para obtener los parásitos, los cuales fueron contados para determinar la carga parasitaria.

En la semana 2 y 4 después de la infección, se cuantificó la carga parasitaria y esta fue similar entre ambos grupos experimentales. Sin embargo, en los conteos realizados en las semanas, 6 y 8 de la infección fue claro el hecho de que los ratones TLR2^{-/-} fueron más susceptibles ya que presentaron hasta cuatro veces más carga parasitaria que la observada en los ratones TLR2^{+/+} (ver Fig. 2). Estos datos sugieren que la molécula TLR2 podrían estar involucrada o coordinar los mecanismos de resistencia tempranos en este modelo.

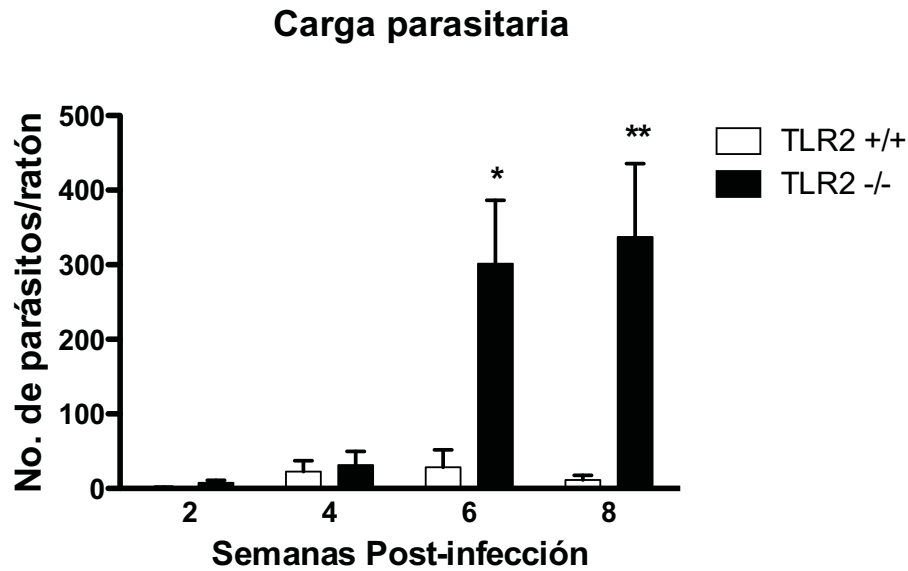


Figura 2. Gráfica donde se observa que los ratones TLR2^{-/-} son más susceptibles en la infección experimental con *T. crassiceps*. La gráfica muestra el curso de la infección intraperitoneal con 20 metacístodos de *T. crassiceps* en ratones TLR2^{+/+} (□) y TLR2^{-/-} (■) a las 2, 4, 6 y 8 semanas. Observamos un aumento significativo en la carga parasitaria a partir de la semana 6 en los ratones TLR2^{-/-} mientras que los ratones TLR2^{+/+} presentaron un nivel bajo de parásitos, mostrando así que TLR2 podría estar involucrado en el mecanismo de resistencia contra este parásito. Los datos son el promedio ± su desviación estándar de cuatro ratones por grupo de tres experimentos independientes. ** p < 0.001 y * p < 0.01 para TLR2^{+/+} contra TLR2^{-/-} los cuales se obtuvieron a tiempos iguales.

V.III. Los ratones TLR2^{-/-} presentan un perfil de citocinas tipo Th2 mayor que los ratones TLR2^{+/+}

Para comparar la producción de citocinas Th1/Th2 en presencia y ausencia de la molécula TLR2 en la infección con *T. crassiceps*, se obtuvieron sueros a diferentes tiempos post-infección por medio de una incisión en la vena caudal de cada uno de los ratones, estos sueros fueron analizados por la técnica de ELISA sandwich. Se midieron citocinas proinflamatorias como IFN γ , TNF α e IL-12 todas relacionadas con resistencia y citocinas antiinflamatorias, como IL-4 e IL-10 asociadas a susceptibilidad en este modelo.

En la figura 3a se observa que los ratones TLR2^{-/-}, tuvieron una producción inicial de IFN γ (semana 2 p.i.) mas alta comparada con los ratones TLR2^{+/+}. Apartir de la semana cuatro se observó una producción similar en ambos grupos, que se mantuvo así hasta la semana 8 p.i. Para IL-12 (ver Fig. 3b), se encontró a la semana 2 p.i. una producción significativamente más alta en los ratones TLR2^{+/+} comparado con los ratones TLR2^{-/-}, dicha diferencia se perdió en la semana 4 y la producción fue similar en ambos grupos de ratones. En la semana 6 despues de la infección, se observó nuevamente una diferencia significativa en la producción de IL-12 para que finalmente en la semana 8, los ratones TLR2^{+/+} así como en los ratones TLR2^{-/-} se encontró niveles similares de esta importante citocina. En línea con esto, se observó que otra importante citocina proinflamatoria como es TNF α se produjo en niveles significativamente menores en los ratones deficientes para TLR2 comparados con los ratones TLR2^{+/+}, durante las primeras 4 semanas. Posteriormente, en la semana 6 y 8 de infección la producción fue similar entre ambos grupos (ver Fig. 3c). Así, la ausencia de

TLR2 ocasionó una producción deficiente de citocinas asociadas con resistencia contra este céstodo tales como IFN γ e IL-12 únicamente en algunos puntos del seguimiento y de TNF α durante toda la fase aguda de la infección.

Citocinas pro-inflamatorias en suero

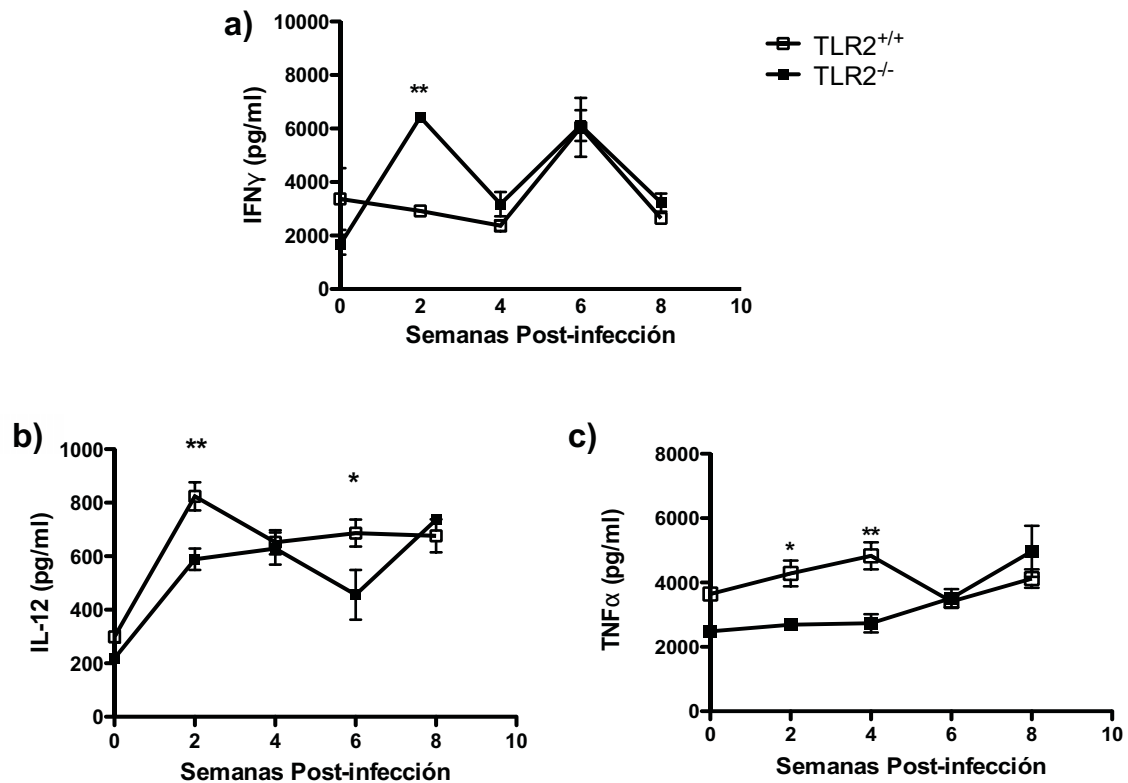


Figura 3. Los ratones TLR2^{-/-} presentan una ligera alteración en la producción de citocinas Th1. A los tiempos indicados en las gráficas se cuantificaron mediante la técnica de ELISA (Sandwich) las citocinas IFN γ (a) e IL-12 (b) ambas relacionadas con resistencia en este modelo, también se midió la producción de TNF α (c). En el caso de IFN γ observamos que los ratones más susceptibles tuvieron una producción inicial más alta de esta citocina que conforme avanzó el tiempo de infección se volvió similar en ambos grupos. Para IL-12 encontramos que únicamente en la semana 2 y 6 la producción fue significativamente mas baja en el grupo de los ratones TLR2^{-/-} (■) comparado con los ratones TLR2^{+/+} (□). ** p < 0.001 y * p < 0.01 para TLR2^{+/+} contra el grupo de ratones TLR2^{-/-} por la prueba de t de student.

En cuanto a las citocinas antiinflamatorias se analizaron IL-4 e IL-10. En el caso de IL-4 se ha visto que tanto ésta como su señalización promueven o facilitan el crecimiento de *T. crassiceps* en su hospedero (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002a). Se observó (ver Fig. 4 a), que hubo una producción significativamente más alta de IL-4 en la semana 2, en los ratones TLR2^{-/-} comparado con los ratones TLR2^{+/+}. Sin embargo, en la semana 4 la producción fue similar. La diferencia observada en la semana 2 se hizo mas grande a partir de la semana 6 y perduró hasta la semana 8 después de la infección, alcanzando así una producción dos veces mayor de IL-4 en los ratones TLR2^{-/-} sobre los ratones TLR2^{+/+}. La citocina IL-10 también se ha visto elevada en cepas de ratones altamente susceptibles a la infección con *T. crassiceps*, como son los ratones deficientes en el factor de transcripción STAT4 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004). Aquí, en la fase aguda de la infección encontramos una producción significativamente más alta de IL-10 en ausencia de TLR2. De manera interesante, en la etapa crónica de la infección estos mismos ratones produjeron menos IL-10 al menos en la semana 6 (ver Fig. 4b), mientras que en la semana 8 no hubo cambios en la producción. Estos datos sugieren que la susceptibilidad de los ratones TLR2^{-/-} se puede asociar a que presentan un perfil tipo Th2 más alto comparado con los ratones resistentes (TLR2^{+/+}).

Citocinas anti-inflamatorias en suero

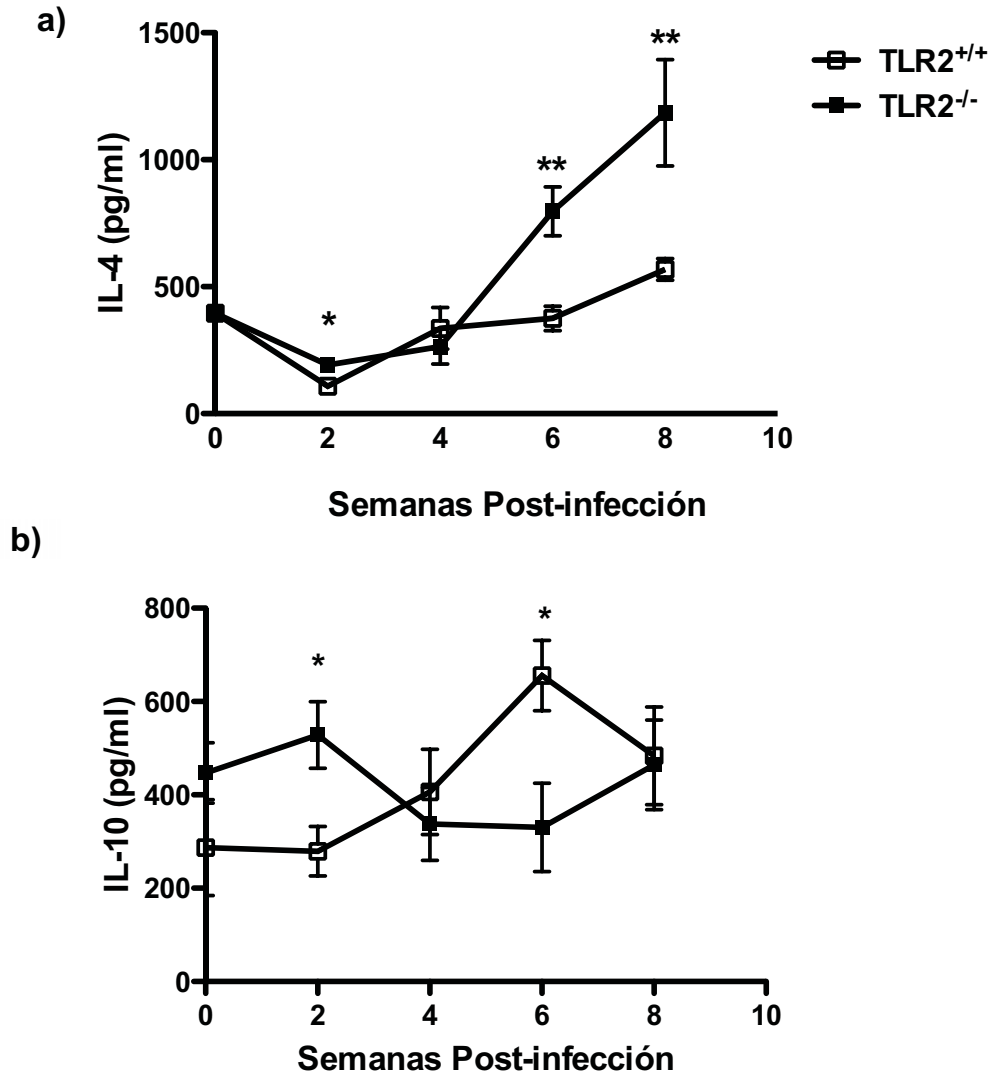


Figura 4. Los ratones TLR2^{-/-} (■) presentan un perfil de citocinas tipo Th2 mayor que los ratones TLR2^{+/+} (□). Se realizó una cinética de citocinas para evaluar el comportamiento de IL-4, citocina asociada a susceptibilidad en esta infección. Alta producción de IL-4 en los ratones TLR2^{-/-} comparado con los ratones TLR2^{+/+} (a), dicha diferencia se incrementó significativamente a partir de la semana 6. La IL-10 se ha asociado de igual manera a susceptibilidad. Encontramos una mayor producción en la fase aguda en los ratones TLR2^{-/-} respecto a los ratones TLR2^{+/+}; sin embargo, en la etapa crónica estos mismos ratones produjeron menos de esta citocina (b). Los datos son representativos de 3 experimentos independientes, ** p < 0.001 y * p < 0.01.

V.IV. Los ratones TLR2^{-/-} sobre producen el isotipo IgG1 anti-*T. crassiceps* asociado a una respuesta tipo Th2

Es conocido que las citocinas pueden estimular a los linfocitos B para producir de manera diferencial isotipos de anticuerpos, por ejemplo el IFN γ induce la producción del isotipo IgG2a mientras que la IL-4 induce la producción de IgG1 (Abbas *et al.*, 2008). Para evaluar si los niveles de las citocinas cuantificadas en suero estaban teniendo su efecto biológico esperado se realizó la técnica de ELISA para determinar la producción específica de anticuerpos contra antígenos de *T. crassiceps*. En la figura 5 a se observa que, confirmando lo hayado en cuanto a la producción de IFN γ , se produjo un nivel similar de IgG2a entre los ratones TLR2^{-/-} y TLR2^{+/+} durante las 8 semanas que se le dio seguimiento a la infección. En contraste, se observa una alta producción de IgG1 en la fase crónica de la infección por parte de los ratones TLR2^{-/-} (ver Fig. 5b) lo que indica la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2.

Detección de anticuerpos específicos anti-*T. crassiceps*

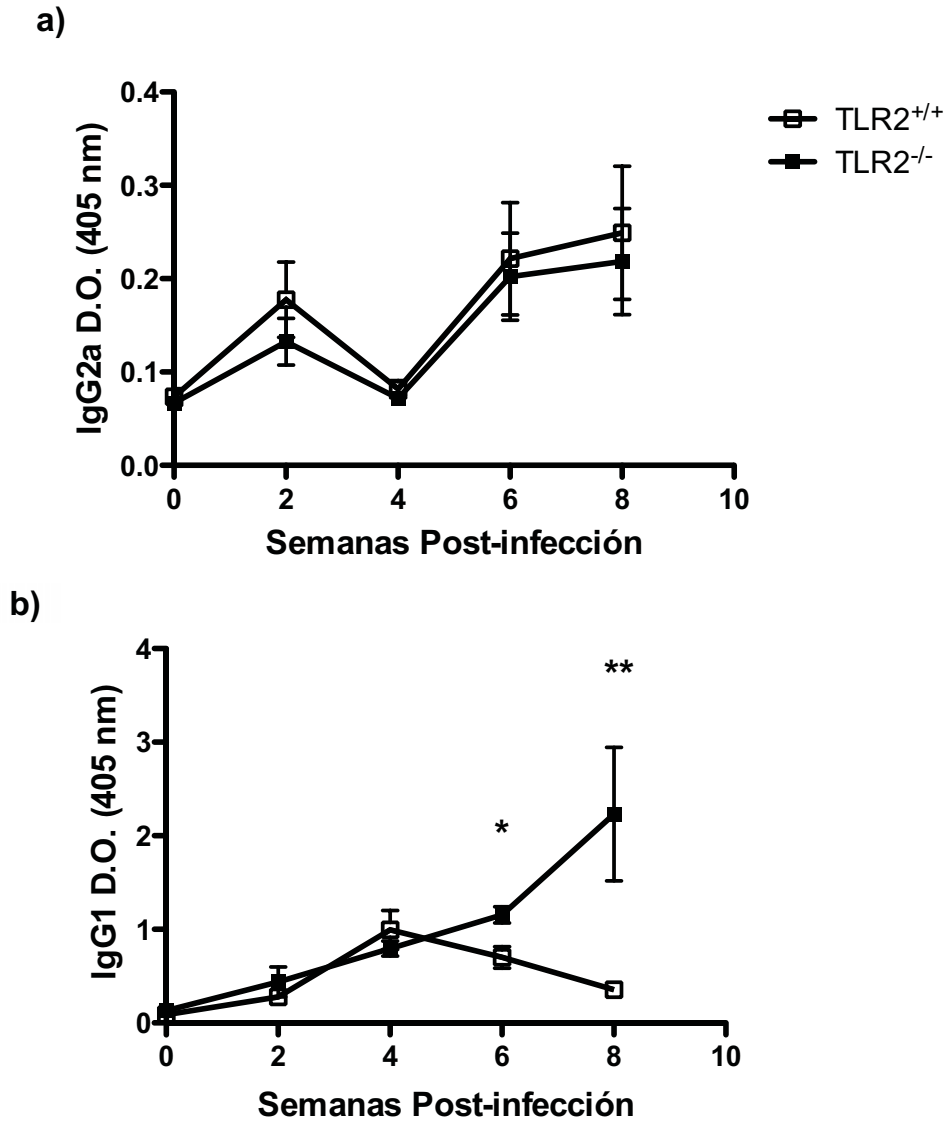


Figura 5. Los ratones TLR2^{-/-} presentaron una alta producción de anticuerpos específicos asociados a una respuesta tipo Th2. Cinética de producción de anticuerpos específicos IgG2a e IgG1 en ratones TLR2^{+/+} (\square) y TLR2^{-/-} (\blacksquare) durante la infección con *T. crassiceps*. a) Producción del anticuerpo específico IgG2a anti-*T. crassiceps*, No observamos diferencias significativas en ambos grupos (TLR^{+/+} vs TLR2^{-/-}). b) Producción del anticuerpo específico IgG1, altamente dependiente de IL-4. En esta gráfica podemos observar diferencias significativas en la fase crónica en los ratones (TLR2^{-/-} vs TLR2^{+/+}) *p < 0.01; **p < 0.001 (TLR2^{+/+} vs TLR2^{-/-}).

V. V. Análisis de la respuesta en células de bazo en la fase crónica de la infección en ambos grupos experimentales (TLR2^{+/+} vs. TLR2^{-/-})

Se analizó la respuesta proliferativa así como la producción de citocinas por parte de las células totales de bazo provenientes de ratones TLR2^{+/+} y ratones TLR2^{-/-} ante el estímulo con antígenos específicos de *T. crassiceps*. Se obtuvieron células de bazo de estos grupos experimentales, se analizó la incorporación de ³H-timidina y se observó que los ratones TLR2^{-/-} presentaban disminuida la proliferación celular tanto a la semana 2 como en la semana 8 post-infección, debido probablemente a un estado anérgico causado por la alta carga parasitaria registrada en estos animales (ver Fig. 6 a).

Las citocinas IFN γ , IL-12, IL-4 e IL-10, como ya se mencionó juegan un papel importante ante la infección con *T. crassiceps*. En esta parte del trabajo se estudió la producción de citocinas en respuesta a un estímulo no relacionado con este parásito como la Concanavalina A (Con A), así como una respuesta específica ante el estímulo con antígeno total de *T. crassiceps* (TcAg). Se evaluó la producción de IFN γ en sobrenadantes de cultivos de esplenocitos. Las células provenientes de ratones TLR2^{-/-} produjeron más IFN γ en respuesta a la Con A. Mientras que para TcAg no se encontró una respuesta significativa ya que se detectaron niveles similares a los de las células no estimuladas (Figura 6b). En cuanto a la producción de IL-12 (ver Fig. 6c) el estímulo mitogénico de la Con A indujo una mayor producción en los ratones TLR2^{+/+} comparado con los ratones TLR2^{-/-} mientras que TcAg indujo una producción similar en ambos grupos. Los ratones TLR2^{-/-} produjeron mayores niveles de IL-4 ante ambos estímulos (Con A y TcAg, Figura 6d). Finalmente se

evaluó la producción de IL-10 y se encontró una mayor producción en las células de bazo de los ratones TLR2^{-/-} ante el estímulo de Con A, sin embargo esta misma citocina se encontró abatida ante el estímulo con TcAg en los mismos sobrenadantes (ver Fig. 6e).

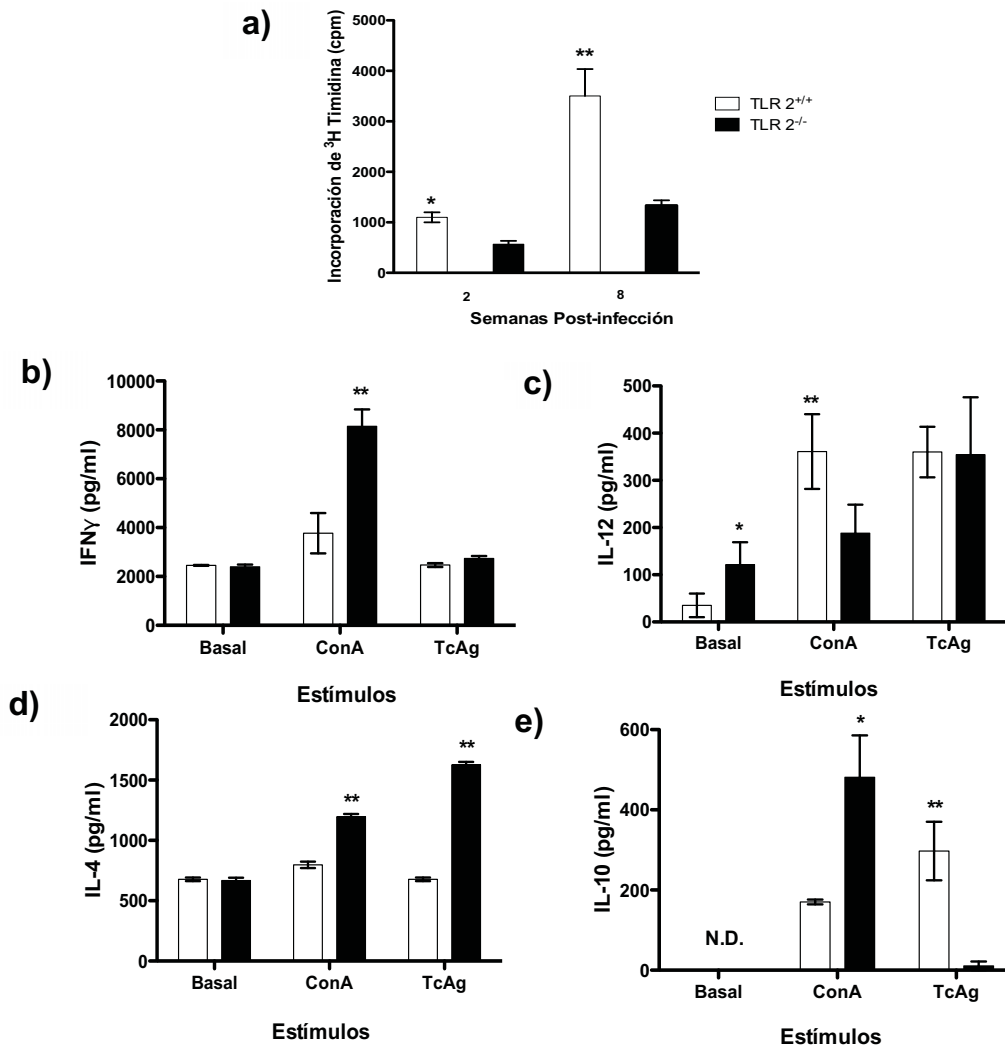


Figura 6. Análisis de la respuesta inmune específica en bazo a las 8 semanas post-infección en ratones TLR2^{+/+} (□) y TLR2^{-/-} (■) igualmente infectados con *T. crassiceps*. (a) Respuesta proliferativa de esplenocitos estimulados con antígeno de *T. crassiceps* en fase aguda y crónica. Observamos una incapacidad de responder a dicho estímulo por parte de las células provenientes de ratones TLR2^{-/-}. Por el contrario, los ratones TLR2^{+/+} mostraron una respuesta proliferativa significativamente mas alta ante los mismos estímulos. Los datos están representados en cuentas por minuto (cpm). (b) Se evaluó la producción de IFN γ en sobrenadantes de estos cultivos de esplenocitos estimulados con mitógeno Con A y con el antígeno de *T. crassiceps* (TcAg). Los ratones TLR2^{-/-} produjeron más IFN γ en respuesta a la Con A pero no ante el estímulo del antígeno. (c) En cuanto a la producción de IL-12 el estímulo mitogénico de la Con A indujo mayor producción en los ratones TLR2^{+/+} mientras que TcAg indujo una producción similar en ambos grupos. (d) Los ratones TLR2^{-/-} produjeron altos niveles de IL-4 ante ambos estímulos (Con A y TcAg). Finalmente se evaluó la producción de IL-10 (e) encontramos una mayor producción en los ratones TLR2^{-/-} ante el estímulo de Con A sin embargo esta misma citocina se encontró abatida ante el estímulo con TcAg (e). ND= No Detectable. ** p < 0.001 y * p < 0.01.

V.VI. RT-PCR de macrófagos peritoneales adherentes

Se ha descrito previamente que macrófagos adherentes peritoneales reclutados durante la infección con *T. crassiceps* sobre expresan marcadores de activación alternativa tales como Relm α , Ym-1, Arg-1, PD-L1 y PD-L2. Además esos macrófagos juegan un papel importante en el establecimiento de este parásito ya que su eliminación disminuye significativamente la carga parasitaria (Reyes *et al.*, 2010). En esta parte del trabajo se revisó el posible papel de TLR2 en el estado de activación de los macrófagos peritoneales. Por lo tanto se realizaron ensayos de RT-PCR para comparar la expresión de los marcadores de activación alternativa en presencia o ausencia de este receptor. La figura 7 muestra la cinética del análisis de los macrófagos adherentes tanto en ratones TLR2^{+/+} como en ratones TLR2^{-/-} igualmente infectados. Confirmando hallazgos anteriores, en la cinética podemos observar que en los ratones TLR2^{+/+} que mantuvieron bajos niveles de parásitos no se encontró una expresión significativa de los marcadores mencionados a excepción de un ligero aumento de Relm α que no se logró sostener a lo largo de la infección. Por otro lado, los ratones susceptibles (TLR2^{-/-}) mostraron en la semana 6 una importante sobre expresión de Relm α y PD-L1, y hacia la semana 8 post-infección los marcadores de activación alternativa como Relm α , Ym-1, Arg-1, PD-L1 y PD-L2 ya se encontraron sobre expresados. Así, observamos que la cepa más susceptible (TLR2^{-/-}) presenta una población de macrófagos alternativamente activados permitiendo el establecimiento de *T. crassiceps* en su hospedero al contrario de los ratones TLR2^{+/+} que presentaron un número menor de macrófagos alternativamente activados, esta población celular esta correlacionada con una baja carga parasitaria en estos ratones.

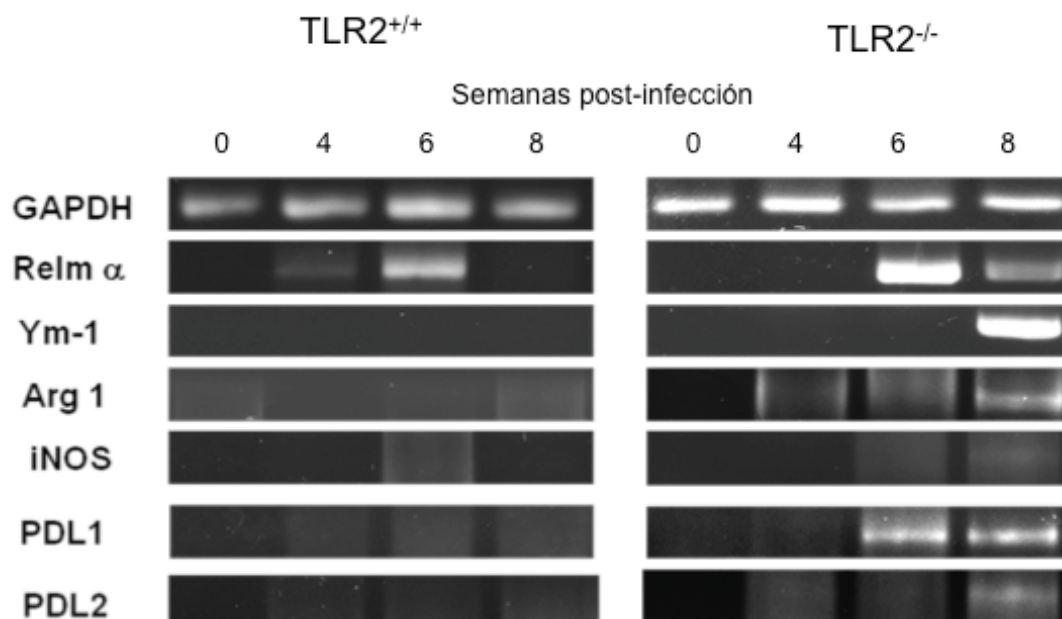


Figura 7. Electroforésis de fragmentos amplificados por RT-PCR de los macrófagos peritoneales adherentes, donde se analizó la expresión de los principales marcadores de macrófagos alternativamente activados (Relm α , Ym-1, Arg-1, PD-L1, PD-L-2), en gel de agarosa al 1.5%. Se observa que Relm α aparece en la semana 4 y 6 p.i. sin embargo no se sostiene dicha expresión además que ninguno de los otros marcadores se sobre expresó en los ratones TLR2^{+/+} a diferencia de los ratones TLR2^{-/-} en los que en la semana 6 aparecen Relm α y PD-L1, pero sobresalientemente en la semana ocho estos mismos ratones expresaron todos los marcadores (Relm α , Ym-1, Arg-1, PD-L1, PD-L2).

V.VII. Citometría de flujo de células peritoneales totales

Se ha demostrado que los AAM ϕ s se reclutan en la cavidad peritoneal de ratones susceptibles a la infección por *T. crassiceps*. Para determinar la presencia de moléculas asociadas a un estado de activación alternativa en los M ϕ s, se extrajeron células totales de peritoneo de ratones TLR2^{+/+} y TLR2^{-/-} infectados con 20 cisticercos en las semanas 2, 6, y 8 post-infección las células fueron procesadas con los anticuerpos indicados para realizar la citometría de flujo. Primero, se analizó la presencia del receptor de manosa de los

macrófagos (por sus siglas en inglés MMR) ya que este receptor es la principal molécula que se aumenta en los macrófagos ante el estímulo de IL-4 (Stein *et al.*, 1992). En dicho análisis, se observó que en la fase aguda a las dos semanas de la infección no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. En contraste, en la fase crónica (semanas 6 y 8) se encontró que los ratones TLR2^{-/-} presentaron un aumento de casi 2 veces en la semana 6 y 3 veces en la semana 8, en el porcentaje de células F4/80^{hi} MMR⁺ comparado con los ratones TLR2^{+/+} (ver Fig. 8a). De igual manera se analizó el porcentaje de células F4/80^{hi} que expresaron la molécula PD-L1 y PD-L2 en ambos grupos de ratones infectados (TLR2^{+/+} vs. TLR2^{-/-}). Ya que estas moléculas tienen una participación importante en la capacidad supresora de estos macrófagos (Terrazas *et al.*, 2005). En la cinética de expresión de PD-L1 en la semana 2, se encontró una tendencia de los ratones TLR2^{-/-} a sobre expresar dicha molécula en la membrana, sin embargo la diferencia no fue significativa.

Por otro lado, en la semana 6 y 8 se observó un aumento significativo en el porcentaje de células F4/80^{hi} PD-L1⁺ en las células de los ratones TLR2^{-/-} comparado con los ratones TLR2^{+/+} (ver Fig. 9a). Dichas diferencias se pueden observar mejor en la gráfica de barras que representa el análisis de los porcentajes mencionados (ver Fig. 9b). En el caso de PD-L2, otra molécula asociada a la capacidad supresora de estos macrófagos observamos un comportamiento similar, es decir, en las primeras dos semanas no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, mientras que en la fase crónica se observó

que la ausencia de TLR2 causó un aumento de las células F4/80^{hi} PD-L2⁺ de manera contraria a los ratones con el gen de TLR2 intacto (ver Fig. 10).

La molécula OX40L se expresa en APCs incluyendo células dendríticas activadas, células B, macrófagos, células de Langerhans, células T y células endoteliales tiene un papel crucial en la supervivencia y generación de células T de memoria (Gough y Weinberg, 2009). OX40L esta involucrada en el proceso de coestimulación de células T y además se ha visto la capacidad de esta molécula para polarizar la respuesta de las células T hacia un perfil tipo Th2. Debido a que se sobre produjo IL-4 (principal citocina Th2) en los ratones TLR2^{-/-}, se analizó la presencia de esta molécula en la membrana de los macrófagos. De manera interesante, se encontró que la deficiencia de TLR2 ocasionó un reclutamiento significativamente mayor de células F4/80^{hi} OX40L⁺ en la cavidad peritoneal de estos ratones infectados, mientras que los ratones silvestres reclutaron unicamente un 50 % de estas células con respecto a los ratones TLR2^{-/-} (ver Fig. 11).

Citometría de flujo de células peritoneales totales (células F4/80^{hi} MMR⁺)

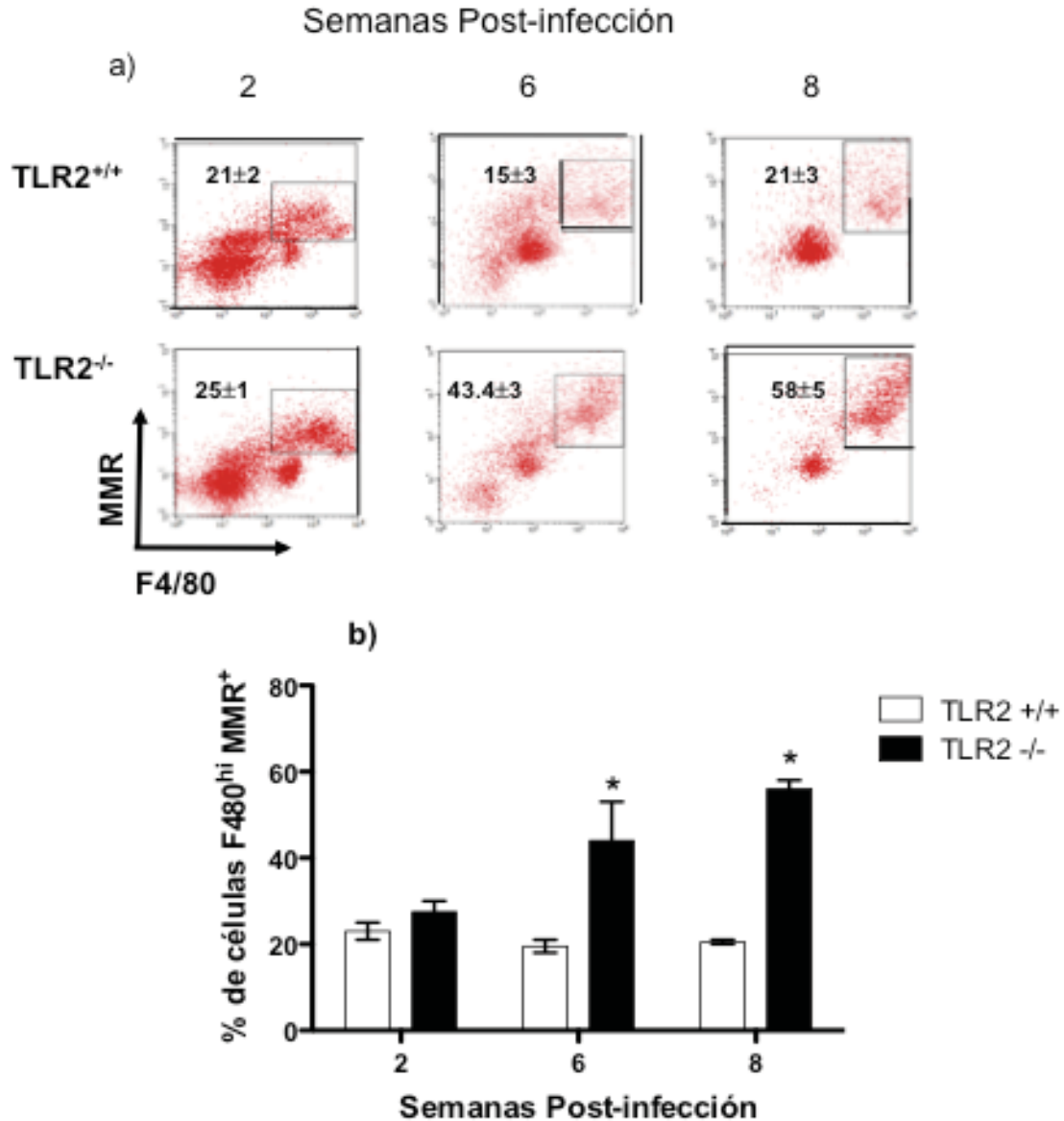


Figura 8. Citometría de flujo de células peritoneales totales de ratones TLR2^{+/+} vs TLR2^{-/-}. En los tiempos indicados las células fueron procesadas con los anticuerpos indicados para realizar la citometría de flujo. a) En el análisis de macrófagos con MMR observamos un aumento casi tres veces más en los ratones TLR2^{-/-} en la fase crónica de la infección comparado con el porcentaje de estas mismas células obtenidas de ratones TLR2^{+/+}. b) Comparamos el porcentaje de células F4/80^{hi} MMR⁺ entre ambos grupos experimentales. Observamos un claro aumento de este porcentaje en los ratones TLR2^{-/-} a lo largo de la infección. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. * p < 0.01.

**Citometría de flujo de células peritoneales totales
(células F4/80^{hi} PD-L1⁺)**

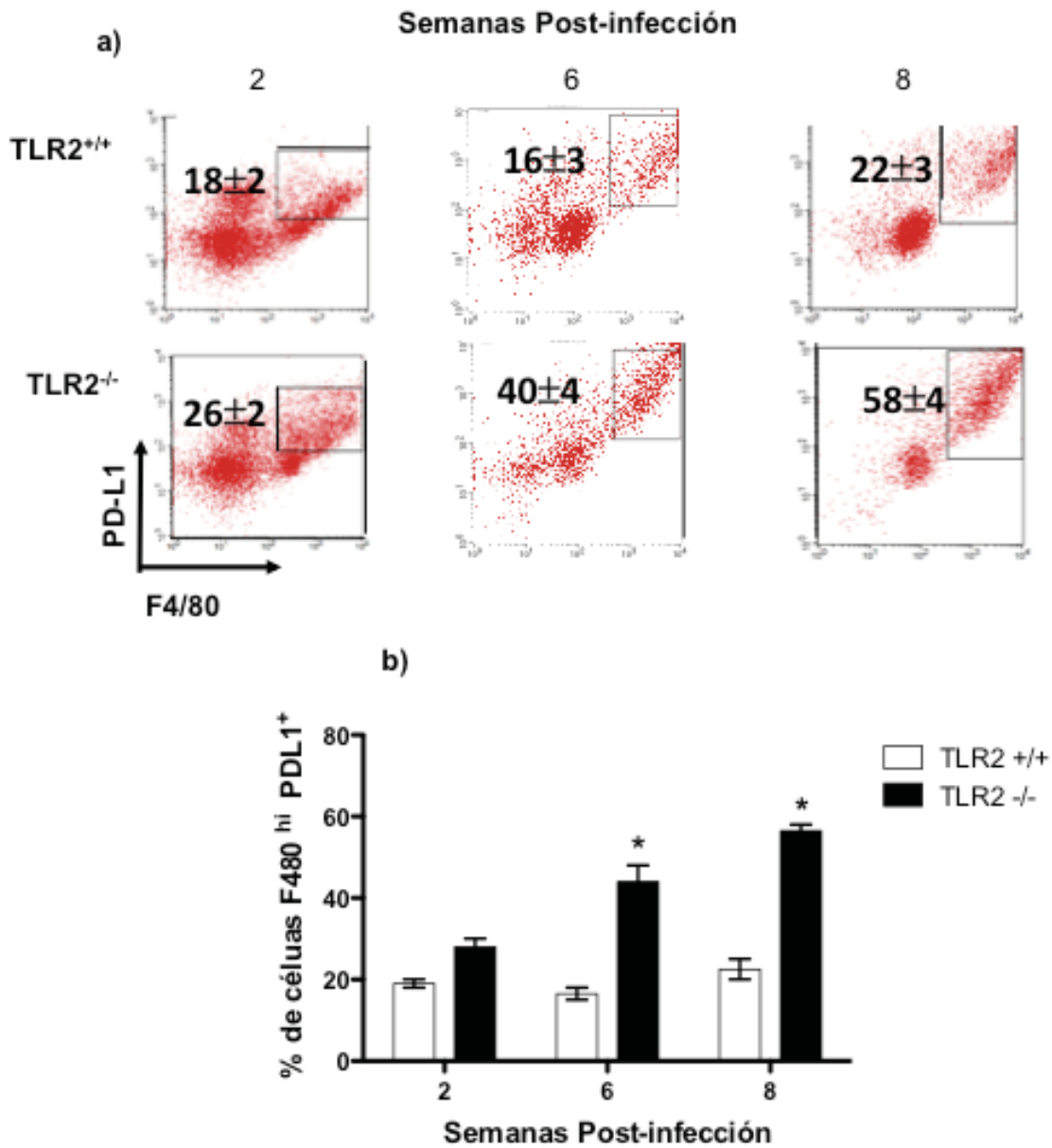


Figura 9. Análisis de macrófagos expresando PD-L1. a) En la cinética de expresión de esta molécula asociada a la capacidad supresora de los macrófagos se muestran dot plots representativos del aumento significativo (dos veces más) encontrado en los ratones TLR2^{-/-} en la fase crónica comparado con los TLR2^{+/+}. b) Representación gráfica de el porcentaje de las células F4/80^{hi} PD-L1⁺, *p < 0.01.

**Citometría de flujo de células peritoneales totales
(células F4/80^{hi} PDL-2⁺)**

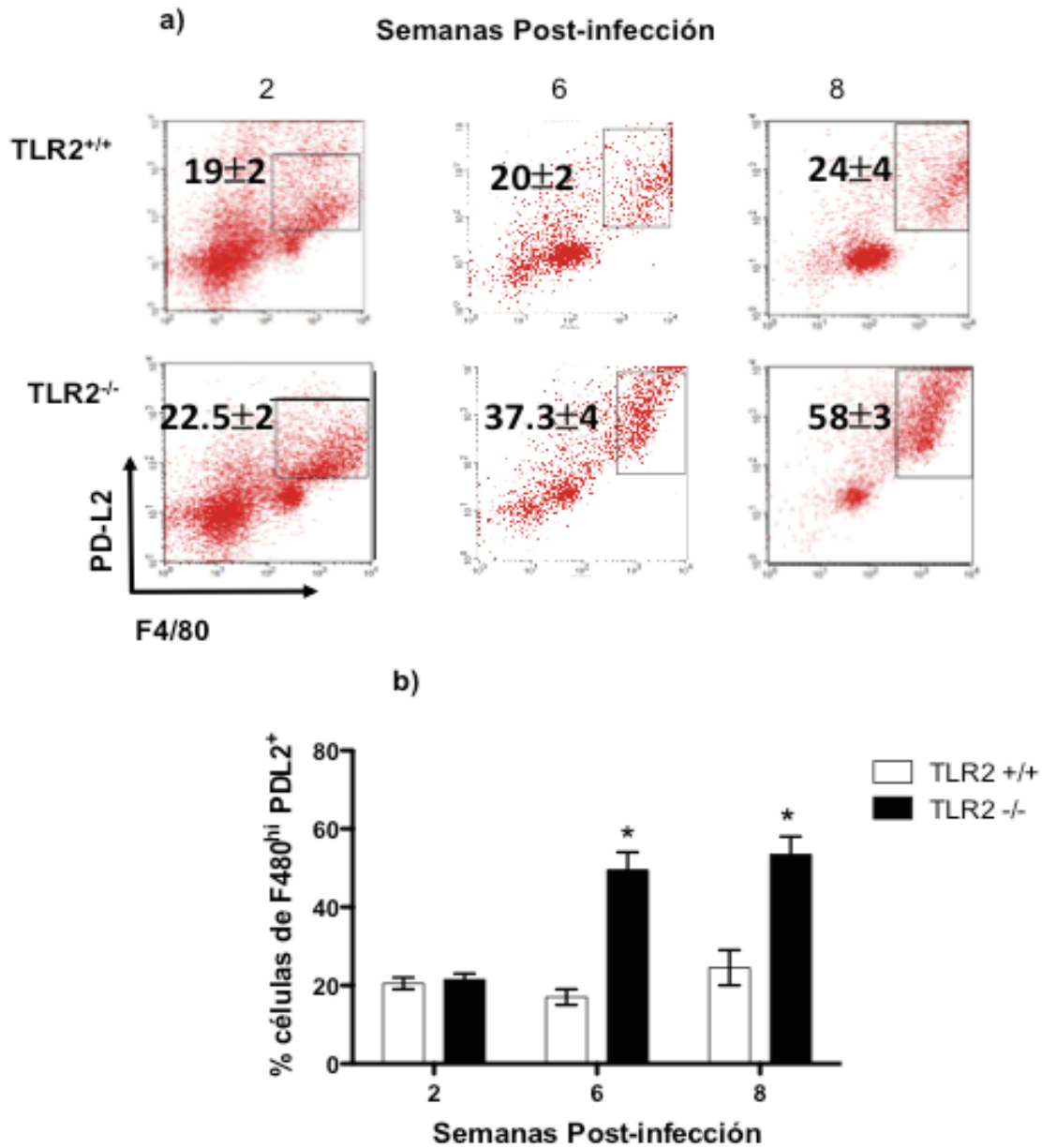


Figura 10. Porcentaje de macrófagos que expresan PD-L2 en la membrana. a) Nuevamente los macrófagos provenientes de ratones TLR2^{-/-} presentan un porcentaje mayor de esta molécula que los ratones TLR2^{+/+}. b) En esta gráfica podemos observar que conforme avanza el tiempo de infección es mayor el porcentaje de macrófagos con PD-L2 en ratones TLR2^{-/-} mientras que no se detectó un aumento significativo en los ratones TLR2^{+/+}, *p < 0.01, **p < 0.001 para ratones TLR2^{+/+} contra el grupo de ratones TLR2^{-/-}.

**Citometría de flujo de células peritoneales totales
(células F4/80^{hi} OX40L⁺)**

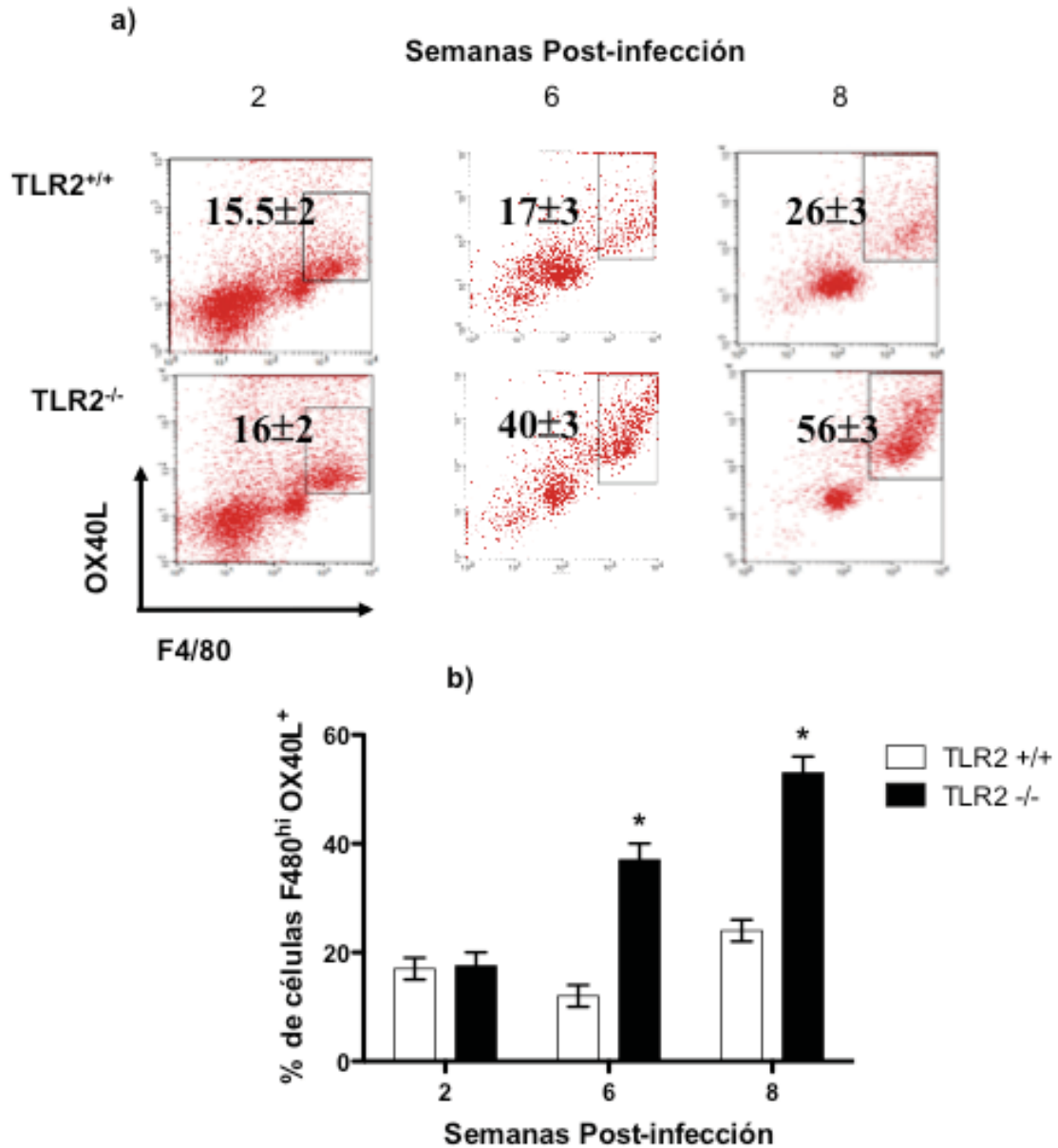


Figura 11. Cinética de la expresión de OX40L en macrófagos peritoneales, molécula asociada a respuesta Th2 en macrófagos peritoneales. a) En los dot plotts podemos ver que en la fase crónica los ratones TLR2^{-/-} reclutan mas macrófagos con OX40L que los ratones TLR2^{+/+}. b) Porcentaje de células F4/80^{hi} OX40L⁺. * p < 0.01.

VI. DISCUSIÓN

Los TLRs son importantes receptores que se localizan en células inmunes, tanto de la respuesta inmune innata como en la adaptativa y en células no inmunes. Sus importantes funciones abarcan desde el reconocimiento de una amplia variedad de moléculas expresadas en la superficie de patógenos, inducción de citocinas y quimiocinas hasta la modulación directa sobre células T como recientemente se ha descrito (Kumar *et al.*, 2011).

A pesar de que se conocen 12 diferentes TLRs en mamíferos los más ampliamente estudiados sin duda son TLR4 y TLR2. Este último tiene la capacidad de reconocer lipoconjugados de diferentes patógenos tales como el Glicosilfosfatidil inositol (GPI) de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*, el lipofosfoglicano (LPG) y lipoarabinomanano arabinosilado de *Leishmania*, peptidoglicano de bacterias Gram positivas y el zimosan en levaduras (Bhattacharya *et al.*, 2010; Hernandez-Ruiz *et al.*, 2010; Ropert y Gazzinelli, 2004; Uematsu y Akira, 2008).

Reportes previos demostraron de manera general que el reconocimiento de PAMPs por TLR2 activa la vía señalización dependiente de MyD88 y translocación del factor nuclear Kappa B (NF- κ B) que tiene como efecto final la producción de citocinas proinflamatorias entre las cuales destacan IL-1, IL-6, IL-12 y TNF α . Sin embargo, también existe evidencia de que *Leishmania donovani* puede utilizar a TLR2 para suprimir la producción de IL-12 mostrando así un posible papel dual de TLR2 (Chandra y Naik, 2008; Turner *et al.*, 2006).

El papel de los TLRs en infecciones causadas por helmintos parásitos ha sido muy poco estudiado. En este trabajo intentamos conocer la función del receptor TLR2 durante el curso de la infección con *T. crassiceps* en una cepa de ratón considerada como resistente a este parásito, para lo cual utilizamos ratones genéticamente deficientes en TLR2. Un hallazgo sumamente interesante fue que en la ausencia de este receptor los ratones resultaron ser altamente susceptibles a la infección con *T. crassiceps* ya que la carga parasitaria fue mayor en la fase crónica de la infección con respecto a los animales TLR2^{+/+}. Demostrando así por primera vez que este receptor confiere resistencia ante la infección por un helminto. Este hallazgo es importante ya que recientemente se ha demostrado que TLR2 puede reconocer antígenos de otros helmintos como la lisofosfatidilcolina de *Schistosoma*, antígenos no identificados del adulto *Onchocerca volvulus*, antígeno excretado/secretado de *Fasciola hepatica*, sin embargo no se reportó algún efecto de este receptor en la susceptibilidad a dichos parásitos (Flynn y Mulcahy, 2008; Gentil y Pearlman, 2009; Magalhaes *et al.*, 2010).

Como ya se mencionó es bien sabido que la ligación de TLR2 induce citocinas proinflamatorias dependientes de NF- κ B, por lo que decidimos analizar la producción de citocinas tanto inflamatorias como antiinflamatorias. Nosotros reportamos una disminución en la producción de TNF α e IL-12 como se ha visto en infecciones experimentales causadas por protozoarios (*Trypanosoma cruzi* y *Babesia bovis*), bacterias (*Mycobacterium* spp.) y hongos (*Encephalitozoon* spp.). De manera contraria encontramos una exacerbada producción de IL-4 en ausencia de TLR2, sumándose a la evidencia de que los TLRs

pueden regular la producción de IL-4 (Fischer *et al.*, 2008; Gimenez *et al.*, 2010; Meng *et al.*, 2011).

Ambos fenómenos explican parcialmente la susceptibilidad encontrada en los ratones TLR2^{-/-} ya que anteriormente se describió que cepas de ratones susceptibles a la infección por *T. crassiceps* como MIF^{-/-} y STAT4^{-/-}, muestran una baja producción de citocinas pro-inflamatorias y niveles altos de IL-4, respectivamente (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2003; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004).

Así pudimos demostrar que en este modelo TLR2 no es necesario para que se desarrolle una respuesta inmune tipo Th2, por el contrario parece suprimirla, ya que en ausencia de TLR2 se aumentaron los niveles de IL-4 e IgG1 circulante. Esto último coincide con lo hallado en el caso de los antígenos del huevo de *Schistosoma* (SEA) que se sabe inducen una fuerte respuesta tipo Th2 sin embargo MyD88, TLR4 ni TLR2 se requieren para este efecto (Kane *et al.*, 2008).

En el caso de IFN γ , citocina que también se ha asociado a este receptor sólo se encontró un ligero retraso al comienzo de la infección demostrando así que la ausencia de TLR2 regula de manera diferencial la cantidad y el tiempo de producción de las citocinas.

También analizamos la producción de anticuerpos específicos anti- *T. crassiceps* en ausencia de TLR2 observamos una alta producción de IgG1 mientras que no hubo cambios en la secreción de IgG2a confirmando así un fenotipo susceptible a *T. crassiceps* debido a

que cepas susceptibles, BALB/c, MIF^{-/-} y STAT4^{-/-} sobre producen de igual manera este isotipo (Rodriguez-Sosa *et al.*, 2003; Rodriguez-Sosa *et al.*, 2004).

Se creó que el impacto de TLR2 sobre la producción de IgG1 se debe a la abundancia de IL-4, citocina que favorece a este isotipo, más que al efecto directo de la ausencia de TLR2 en las células B, sin embargo sería interesante analizar el nivel de expresión del receptor de IL-4 en la membrana de las células B. De manera complementaria a la cuantificación de citocinas en suero se analizó la producción de citocinas en cultivos de células de bazo reestímuladas con TcAg provenientes de ratones TLR2^{+/+} y TLR2^{-/-}. Nuevamente encontramos que la deficiencia de TLR2 ocasionó una respuesta inmune predominantemente del tipo Th2 además de que los esplenocitos de estos ratones mostraron un fuerte estado anérgico asociado a la alta carga parasitaria encontrada ya que este ensayo se realizó a las ocho semanas de infección, tiempo en el que los ratones TLR2^{+/+} presentaron un nivel muy bajo de parásitos en la cavidad peritoneal opuesto a lo encontrado en los ratones TLR2^{-/-}. Confirmando así el fenotipo susceptible en los ratones deficientes en TLR2.

Se demostró anteriormente que la infección con *T. crassiceps* recluta en la cavidad peritoneal una población de AAMφs con capacidad supresora sobre las células T que parece ser muy importante en el reconocimiento de este parásito (Reyes *et al.*, 2010). Aquí, se analizó el efecto de la ausencia de TLR2 sobre la polarización o estado de activación de los macrófagos. La ausencia de TLR2 ocasionó que en los Mφ's que se reclutaron sobre

expresaran marcadores de activación alternativa tales como Recla, Ym-1, Arg-1, PD-L1 y PD-L2, comprobando así que si los Mφ's dejan de recibir la señal inducida por la ligación de TLR2 se polarizan hacia un estado de activación alternativo. Esto ultimo coincide con reportes previos en donde se demostró en el caso de *Schistosoma mansoni* que la ausencia de TLR3 ocasionó un aumento en la actividad de arginasa y en el caso de macrófagos TLR9^{-/-} expuestos a *Legionella pneumophila* presentan mayor expresión de Fizz y Arginasa confirmando que los TLR modulan el estado de activación de los macrófagos (Bhan *et al.*, 2008; Joshi *et al.*, 2008).

De manera concluyente también se analizó estos mismos macrófagos peritoneales para determinar la expresión en la membrana de más marcadores de activación alternativa. Se encontró que conforme avanzaba la infección la ausencia de TLR2 ocasionó un mayor porcentaje de células F4/80⁺ MMR⁺, F4/80⁺ PD-L1⁺ y F4/80⁺ PD-L2⁺ confirmando así la presencia de AAMφ's con potencial supresor en los ratones TLR2^{-/-} los cuales fueron más susceptibles. Con el propósito de saber si estos macrófagos expresaban moléculas de coestimulación que previamente se han asociado a una respuesta Th2, se analizó la expresión de OX40L. Se observó que estos macrófagos alternativos también tienen una sobre expresión de OX40L en los macrófagos de los ratones TLR2^{-/-}. Estos datos explican parcialmente el exceso de respuesta tipo Th2, ya que tanto PD-L1 como OX40L se han asociado a este tipo de respuesta (Wang y Liu, 2009).

En conjunto estos datos sugieren que TLR2 puede reconocer uno o varios antígenos de *T. crassiceps* aun no identificados. Sin embargo, se ha descrito la presencia de lípidos neutrales en este parásito que podrían ser los ligandos de TLR2. Cabe señalar que el TLR2 reconoce a la lisofosfatidilcolina presente en el antígeno del huevo de *S. mansoni* lo cual ocasiona el relutamiento de los eosinófilos, se ha demostrado que los antígenos de *T. crassiceps* contienen este mismo lípido dejando abierta la posibilidad de que este sea el antígeno reconocido en nuestro modelo (Flynn y Mulcahy, 2008).

Además que la carencia en la señal despertada por TLR2 generó un microambiente predominantemente Th2 con AAM ϕ 's que es permisible para el crecimiento de *T. crassiceps*. Un estudio más profundo para la identificación exacta de los posibles ligandos de TLR2 presentes en lo metacéstodos de *T. crassiceps* así como la identificación de las vías de señalización involucradas nos ayudarán a comprender los mecanismos de resistencia contra este parásito que podrían ser utilizados para desarrollar vacunas o adyuvantes de éstas, teniendo como una nueva opción la utilización de los lípidos.

VII. CONCLUSIONES

- TLR2 participa de manera importante tanto en la susceptibilidad como en la respuesta inmune de la cisticercosis experimental con *Taenia crassiceps*.
- TLR2 regula de manera diferencial la producción de citocinas durante la infección con *T. crassiceps* favoreciendo a IL-4 mientras que IFN γ é IL-10 son las menos afectadas.
- La ausencia de TLR2 exagera el switch del isotipo IgG1 anti-*T. crassiceps*, asociado a una respuesta inmune tipo Th2 mientras que el isotipo IgG2a no se vió afectado.
- Las células de bazo provenientes de los ratones TLR2^{-/-} se encontraron en estado anérgico.
- Ante una respuesta antígeno-específica la carencia de TLR2 aumenta la producción de IL-4 en células de bazo.
- La ausencia de TLR2 aumenta el estado de activación alternativo y potencial supresor en los macrófagos en la infección experimental con *T. crassiceps*.

VIII. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2008). *Inmunología Celular y Molecular* (6ta ed.). Elsevier, España; 565 pp.
- Bhan, U., Trujillo, G., Lyn-Kew, K., Newstead, M. W., Zeng, X., Hogaboam, C. M., Krieg, A. M., y Standiford, T. J. (2008). Toll-like receptor 9 regulates the lung macrophage phenotype and host immunity in murine pneumonia caused by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.*: **76** (7), 2895-2904.
- Bhattacharya, P., Bhattacharjee, S., Gupta, G., Majumder, S., Adhikari, A., Mukherjee, A., Majumdar, S. B., Saha, B., y Majumdar, S. (2010). Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through up-regulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach. *J. Infect. Dis.*: **202** (1), 145-155.
- Chandra, D., y Naik, S. (2008). *Leishmania donovani* infection down-regulates TLR2-stimulated IL-12p40 and activates IL-10 in cells of macrophage/monocytic lineage by modulating MAPK pathways through a contact-dependent mechanism. *Clin. Exp. Immunol.*: **154** (2), 224-234.
- Fischer, J., Suire, C., y Hale-Donze, H. (2008). Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF-kappaB and subsequent inflammatory responses. *Infect. Immun.*: **76** (10), 4737-4744.
- Flynn, R. J., y Mulcahy, G. (2008). Possible role for Toll-like receptors in interaction of *Fasciola hepatica* excretory/secretory products with bovine macrophages. *Infect. Immun.*: **76** (2), 678-684.
- Gay, N. J., Gangloff, M., y Weber, A. N. (2006). Toll-like receptors as molecular switches. *Nat. Rev. Immunol.*: **6** (9), 693-698.
- Gentil, K., y Pearlman, E. (2009). Gamma interferon and interleukin-1 receptor 1 regulate neutrophil recruitment to the corneal stroma in a murine model of *Onchocerca volvulus* keratitis. *Infect. Immun.*: **77** (4), 1606-1612.
- Gimenez, G., Magalhaes, K. G., Belaunzaran, M. L., Poncini, C. V., Lammel, E. M., Gonzalez Cappa, S. M., Bozza, P. T., e Isola, E. L. (2010). Lipids from attenuated

- and virulent *Babesia bovis* strains induce differential TLR2-mediated macrophage activation. *Mol. Immunol.*: **47** (4), 747-755.
- Gordon, S., y Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions *Immunity.*: **32** (5), 593-604.
- Gough, M. J., y Weinberg, A. D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. *Adv. Exp. Med. Biol.*: **647**, 94-107.
- Hernandez-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A., y Becker, I. (2010). CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS. Negl. Trop. Dis.*: **4** (11), e871.
- Jackson, L. (2011). Genotyping protocols database. Retrieved 13 de Marzo de 2011, 2011, from http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:1106149749280155::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:6300,005846
- Janeway, C. A., Jr., y Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., y Capra, J. D. (1999). *Immuno Biology* (4ta ed.). Current Biology; Garland., EE UU. 635pp.
- Joshi, A. D., Schaller, M. A., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L., y Hogaboam, C. M. (2008). TLR3 modulates immunopathology during a *Schistosoma mansoni* egg-driven Th2 response in the lung. *Eur. J. Immunol.*: **38** (12), 3436-3449.
- Kane, C. M., Jung, E., y Pearce, E. J. (2008). *Schistosoma mansoni* egg antigen-mediated modulation of Toll-like receptor (TLR)-induced activation occurs independently of TLR2, TLR4, and MyD88. *Infect. Immun.*: **76** (12), 5754-5759.
- Kawai, T., y Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.*: **21** (4), 317-337.
- Kawai, T., y Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.*: **11** (5), 373-384.
- Kumar, H., Kawai, T., y Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*: **388** (4), 621-625.

- Kumar, H., Kawai, T., y Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.*: **30** (1), 16-34.
- Magalhaes, K. G., Almeida, P. E., Atella, G. C., Maya-Monteiro, C. M., Castro-Faria-Neto, H. C., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H. L., Bozza, M. T., y Bozza, P. T. (2010). Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *J. Infect. Dis.*: **202** (9), 1369-1379.
- Maizels, R. M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M., Taylor, M. D., y Allen, J. E. (2004). Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol. Rev.*: **201**, 89-116.
- Martinez, F. O., Helming, L., y Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.*: **27**, 451-483.
- McGeachy, M. J., y Cua, D. J. (2008). Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*: **28** (4), 445-453.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*: **449** (7164), 819-826.
- Medzhitov, R., y Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N. Engl. J. Med.*: **343** (5), 338-344.
- Meng, L., He, X., Zhu, W., Yang, X., Jiang, C., Sun, Q., M, B., Zhang, S., Xue, Q., Xie, X., y Lu, S. (2011). TLR3 and TLR7 Modulate IgE production in antigen induced pulmonary inflammation via influencing IL-4 expression in immune organs. *PLoS One*: **6** (2), e17252.
- Montor, J. M., Mendoza, M. E., y Romano, M. C. (1998). Effect of human and murine interferon-alpha on steroid production by rat ovarian cells. *Life Sci.*: **62** (19), 1733-1744.
- Mosmann, T. R., y Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*: **17** (3), 138-146.
- Nair, M. G., Cochrane, D. W., y Allen, J. E. (2003). Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated *in vitro*. *Immunol. Lett.*: **85** (2), 173-180.

- Paul, W. E. (1999). *Fundamental Immunology* (4ta ed.); Lippincott-Raven, United States of America. 1589 pp.
- Reyes, J. L., Espinoza-Jimenez, A. F., Gonzalez, M. I., Verdin, L., y Terrazas, L. I. (2011). *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.*: **267** (2), 77-87.
- Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Alonso-Trujillo, J., van Rooijen, N., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2010). Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance *in vivo*. *Int. J. Parasitol.*: **40** (6), 731-742.
- Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias, L., y Terrazas, L. I. (2009). Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Genet. Evol.*: **9** (6), 1115-1127.
- Reyes, J. L., y Terrazas, L. I. (2007). The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite Immunol.*: **29** (12), 609-619.
- Rodríguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2002a). Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J. Immunol.*: **168** (7), 3135-3139.
- Rodríguez-Sosa, M., Rosas, L. E., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2003). Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.*: **71** (3), 1247-1254.
- Rodríguez-Sosa, M., Saavedra, R., Tenorio, E. P., Rosas, L. E., Satoskar, A. R., y Terrazas, L. I. (2004). A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.*: **72** (8), 4552-4560.
- Rodríguez-Sosa, M., Satoskar, A. R., Calderon, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., y Terrazas, L. I. (2002b). Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect. Immun.*: **70** (7), 3656-3664.

- Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C., y Calandra, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J. Endotoxin. Res.*: **9** (2), 119-123.
- Roitt, I. M. (2000). *Inmunología* (5a ed.). Madrid: Harcourt; España. 423pp.
- Ropert, C., y Gazzinelli, R. T. (2004). Regulatory role of Toll-like receptor 2 during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Endotoxin. Res.*: **10** (6), 425-430.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., y Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.*: **176** (1), 287-292.
- Takeda, K., y Akira, S. (2007). Toll-like receptors. *Curr. Protoc. Immunol.: Chapter 14*, Unit 14 12.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T., y 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** (1), 74-81.
- Terrazas, L. I., Montero, D., Terrazas, C. A., Reyes, J. L., y 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** (13), 1349-1358.
- Turner, J. D., Langley, R. S., Johnston, K. L., Egerton, G., Wanji, S., y Taylor, M. J. (2006). Wolbachia endosymbiotic bacteria of *Brugia malayi* mediate macrophage tolerance to TLR- and CD40-specific stimuli in a MyD88/TLR2-dependent manner. *J. Immunol.*: **177** (2), 1240-1249.
- Uematsu, S., y Akira, S. (2008). Toll-Like receptors (TLRs) and their ligands. *Handb. Exp. Pharmacol.*: (183), 1-20.
- Wang, Y. H., y Liu, Y. J. (2009). Thymic stromal lymphopoietin, OX40-ligand, and interleukin-25 in allergic responses. *Clin. Exp. Allergy*: **39** (6), 798-806.
- Willms, K., y Zurabian, R. (2009). *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology*: **137** (3), 335-346.

IX. APÉNDICE I (Soluciones)

Buffer de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10 litros y pH

7.4

80 g NaCl (J. T. Baker)

11.6 g Na₂HPO₄ (J. T. Baker)

2 g KH₂PO₄ (J. T. Baker)

2 g KCl (ICN Biomedicals Inc.)

Buffer de lisis

200 mM NaCl (J. T. Baker)

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

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

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

Se afora con agua destilada hasta 1lt.

Solución hemolizante

Tris base 0.17 M (ICN Biomedicals Inc.)

NH₄Cl 0.16 M (J. T. Baker)

Se prepara para 300 ml.

Buffer TBE 1x

Tris base (890 mM) (Sigma Chemicals)

Ácido Bórico (890 mM) (J. T. Baker)

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

Se ajusta todo a pH 8 y se afora a 500 ml con agua destilada

Buffer de pegado (ELISA)

0.1 M de Na_2HPO_4 (J. T. Baker)

Para 1 lt de agua destilada

Solución de lavado (ELISA)

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

Solución de lavado (ELISA)

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

Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1 % de albumina sérica bovina (ISN Biochemicals)

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

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

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

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

Buffer para FACS

0.1% de azida de sodio NaN₃ (Sigma Chemicals), 1% de suero fetal bovino SFB (Gibco) en 1 lt PBS.

Bromuro de etidio

Stock 1000 x solución 0.5 mg/ml.

50 mg de Bromuro de etidio

100 ml. de agua

Diluir 1:1000 para teñir geles y proteger de la luz.

X. APÉNDICE II

Secuencias de primers

Tabla 2 Secuencias de primers y temperatura de alineación utilizados en este trabajo obtenidos bibliográficamente.

Genes	Secuencias	Pares de bases (Pb)	Temperatura de alineación (°C)	Referencia
TLR-2	CTT CCT GAA TTT GTC CAG TAC A GGG CCA GCT CAT TCC TCC CAC ACG AGC AAG ATC AAC AGG AGA	334 y 499 334 499	57	(Jackson, 2011)
GAPDH	F-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	1035	56	(Reyes <i>et al.</i> , 2009)
Ym-1	F-TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG R-TTTGTCCCTTAGGAGGGCTTCCTC	436	56	(Nair <i>et al.</i> , 2003)
Arg- 1	F-CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG R-CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC	250	54	(Nair <i>et al.</i> , 2003)
iNOS	F-CTGGAG GAG CTC CTG CCT CATG R-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG	449	62	(Reyes <i>et al.</i> , 2009)
PD-L1	F-GGT CGG ACA TGT TTA TGTG R-TCA CAC TTG TGA GGA AAG G	269	56	(Reyes <i>et al.</i> , 2011)
PD-L2	F-TCC AGG TAC AGG GGA GG R-GCA GGT CCA GAT CTG GG	529	56	(Reyes <i>et al.</i> , 2011)