



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ROL DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS DURANTE LA INFECCIÓN
DEL CISTICERCO DE *Taenia crassiceps* EN RATONES HEMBRA
C57BL/6

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

NATALY MONTSERRAT RUIZ MONROY



MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ABEL GUTIERREZ RAMOS

VOCAL: ENRIQUE ORTEGA SOTO

SECRETARIO: LAURA VIRGINIA ADALID PERALTA

1er. SUPLENTE: Profesor: JOSE CORDERO HERNANDEZ

2° SUPLENTE: Profesor: JULIO CESAR MARTINEZ ALVAREZ

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIROGIA
"JOSE MARIA VELAZCO"**

ASESOR DEL TEMA: LAURA VIRGINIA ADALID PERALDA

SUPERVISOR TÉCNICO: HECTOR PALAFOX

SUSTENTANTE: NATALY MONTSERRAT RUIZ MONROY

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	3
Ciclo de vida	4
Susceptibilidad a la infección en diferentes cepas de roedores	6
Respuesta inmune	7
Evasión inmune	10
Células T reguladoras	12
Mecanismo de acción	14
Supresión mediada por citocinas inhibitorias	14
Supresión mediada por citolisis	16
Supresión por disrupción metabólica	17
Supresión mediada por la modulación de la maduración y función las células dendríticas	18
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	23
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Materiales y métodos	26
Material biológico	26
Obtención de células de los diferentes órganos	26
Linfoproliferación <i>in Vitro</i>	27
Fenotipo de células T reguladoras	28
RT-PCR	29
Análisis estadístico	32
Resultados	33
Porcentaje de células T reguladoras	33
Expresión de moléculas supresoras	43
Papel de las T reguladoras en la respuesta proliferativa durante la estimulación con Antígenos del parásito y Concanavalina	
A	47
Discusión	51
Conclusiones	55
Anexo 1	56
Procedimiento para realizar conteo celular	56
Soluciones y reactivos	56
Solución de digestión	56
PBS 10X pH 7.2	56
PBS*	56
Solución de lisis	57
Solución de fijación permeabilización	57

Solución lavado/permeabilización	57
Anticuerpos empleados	57
Tablas y figuras	58
Bibliografía citada	60

RESUMEN

La cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* puede desarrollarse en la naturaleza tras la ingestión de huevos producidos por la forma adulta del parásito. Para estudiar las estrategias que permiten al parásito evadir el sistema inmune del huésped, en el presente trabajo se evaluaron los mecanismos de acción de las células T reguladoras en ratones hembra de 4 a 5 semanas de edad de la cepa C57BL/6, infectados con cisticercos de *T. crassiceps*. La cepa no es susceptible a la infección.

Se formaron dos grupos de ratones; grupo I: infectado, cada ratón fue inoculado por vía intraperitoneal con 20 cisticercos. Grupo II: sin infectar, se empleó como control. Posteriormente, a diferentes tiempos de infección (5, 30, 90 y 130 días) se determinó el nivel de células T reguladoras en el peritoneo, los ganglios mesentéricos, las placas de Peyer y el bazo. Paralelamente se evaluó la capacidad de proliferación de células del bazo, las cuales fueron estimuladas con concanavalina A (conA) y antígenos de *T. crassiceps*.

Con los resultados obtenidos pudo observarse que los porcentajes de T reguladoras fueron similares entre ambos grupos en el sitio de instalación del parásito. Al mismo tiempo, se observaron niveles similares de proliferación en ambos grupos cuando las células

se estimularon con ConA. Los antígenos específicos de cisticerco no indujeron proliferación de células T efectoras ni de T reguladoras.

Adicionalmente, se evaluó la expresión genética de las moléculas de carácter supresor de las células T reguladoras: CTLA-4, FOXP3, LAG-3, granzima A, granzima B, CD4 Y CD25. El análisis de la expresión de cada gen con respecto al gen constitutivo de β -actina muestra que los genes de las moléculas que caracterizan a las células T reguladoras (CD25 y FOXP3) en ratones infectados no aumentan significativamente con respecto de los controles a lo largo de la infección. Por otra parte, en los genes de moléculas supresoras de membrana se encontró que el CTLA-4 se aumenta significativamente a los 90 días, y el LAG-3 los 30 días. Con respecto a los genes de las moléculas solubles, se observó que no hay aumento de expresión de granzima A ni de granzima B, mientras que en los genes de la perforina se observa un aumento significativo a los 5 y 30 días.

En resumen, la resistencia a la infección causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps* en ratones hembra de la cepa C57BL/6 no está asociada con la presencia de células T reguladoras.

INTRODUCCIÓN

La teniasis y la cisticercosis, enfermedades ocasionadas por el parásito intestinal *Taenia solium*, son problemas de salud pública en países como México y Brasil. Ambos padecimientos prevalecen tanto en áreas urbanas como rurales, en donde se asocian con prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza (Sarti et al., 1997). La invasión en el cerebro humano por el metacéstodo de *T. solium* causa neurocisticercosis, la enfermedad parasitaria más frecuente en el sistema nervioso central (Rossi et al., 2000).

Por otra parte, la cisticercosis murina es causada por la forma larvaria de *Taenia crassiceps*, la cual se reproduce generalmente en la musculatura, los tejidos subcutáneos, la cavidad peritoneal y el espacio pleural de diversos roedores (Hoberg et al., 1999). Este cisticerco infecta ratones de forma natural, y se le utiliza ampliamente como modelo experimental por su cercanía filogenética con *T. solium*.

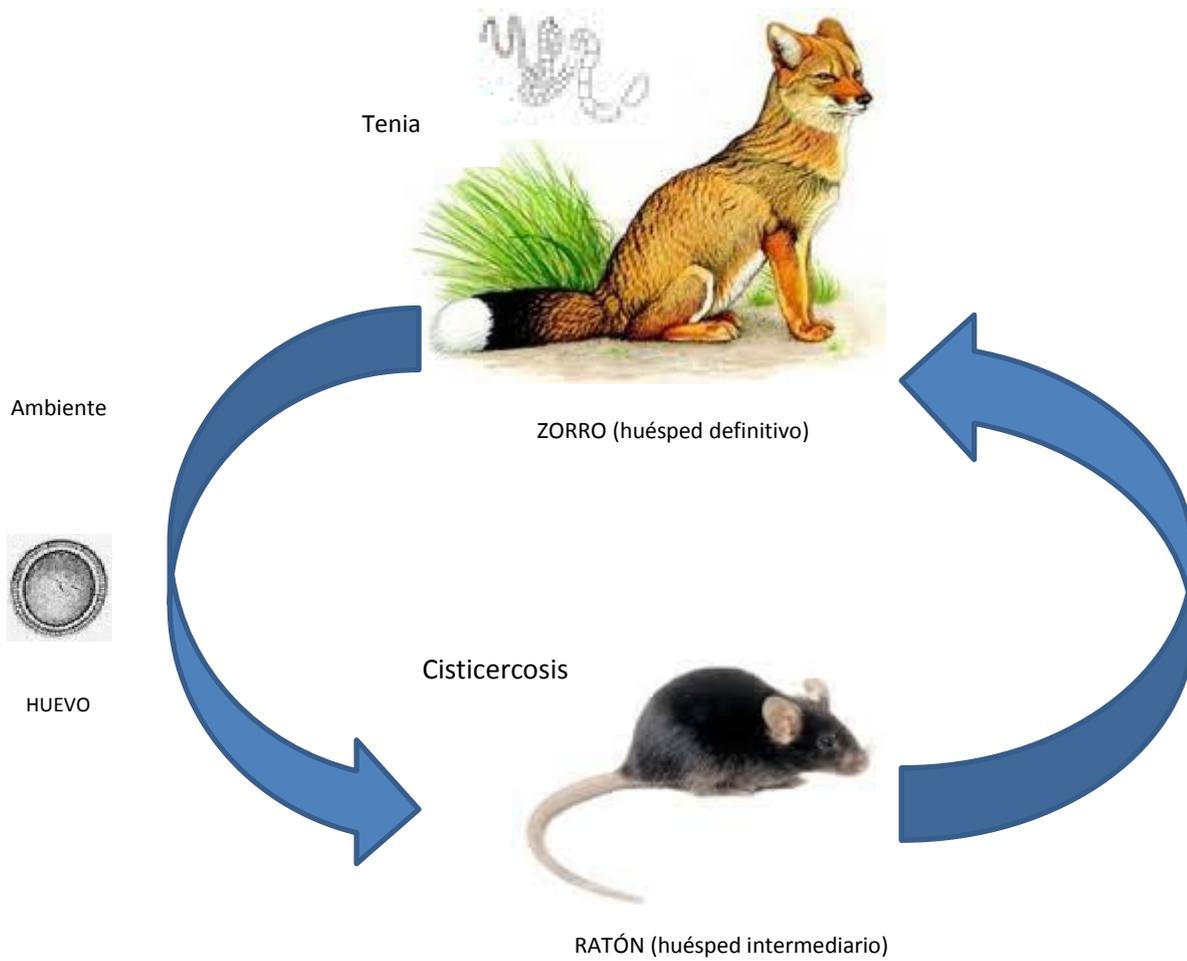
En el laboratorio, el modelo murino se ha adoptado como alternativa para el estudio de la cisticercosis causada por *T. solium*, ya que es de fácil reproducción y manejo, por lo que ha permitido

entender y definir los factores biológicos y genéticos que afectan la susceptibilidad y la resistencia a esta enfermedad (Ostoa-Saloma et al., 2009).

Ciclo de vida

El céstodo *Taenia crassiceps* se aloja en el lumen intestinal de su huésped definitivo, que consiste en zorros y otros cánidos (Ostoa-Saloma et al., 2009). El ciclo de vida del parásito comienza cuando el huésped definitivo (zorro) ingiere cisticercos vivos al momento de comer al huésped intermediario (ratón). La tenia adulta se aloja en el intestino del huésped. Está compuesta por una cabeza, un cuello y un estróbilo, que es el conjunto de proglótidos unidos entre sí en forma de cadena; los proglótidos grávidos se encuentran en las heces del huésped definitivo, y contienen los huevos del parásito, que se liberan al ambiente. Los roedores, que son los hospederos intermediarios naturales, ingieren dichos huevos, y cuando éstos eclosionan producen larvas con forma de quistes (metacéstodos, cisticercos) en el peritoneo y el espacio subcutáneo. El ciclo se cierra cuando el huésped definitivo ingiere al huésped intermediario (Heldwein et al., 2006).

FIGURA 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*



En ocasiones, los seres humanos sirven como huéspedes intermediarios accidentales cuando consumen alimentos o agua contaminados con heces de cánidos o felinos infectados. En los humanos, los metacéstodos se desarrollan en el tejido subcutáneo y dentro del tejido muscular (Heldwein et al., 2006).

Susceptibilidad a la infección en diferentes cepas de roedores

La susceptibilidad del hospedero y la intensidad de la cisticercosis murina dependen de factores genéticos, sexuales y anatómicos (Sciutto et al., 1995).

Se ha descrito que las cepas congénicas de ratones difieren en la susceptibilidad a la infección por *T. crassiceps*, y se ha observado que la cepa BALB/cAnN es la cepa más susceptible, mientras que C57BL/6J es relativamente resistente (Sciutto et al., 1995).

Igualmente, dentro de una misma línea genética existen diferencias. Tal es el caso de las cepas BALB/cAnn y BALB/cJ, las cuales son genéticamente muy similares pero difieren en varios fenotipos, incluyendo la expresión del antígeno Qa-2. Este antígeno es una molécula no-clásica del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC) codificada por cuatro genes (Q6 a Q9) y situada de forma telomérica a los loci H-2D. En los ratones BALB/cJ (Qa-2^{low}) se expresa la proteína Qa-2 de manera disminuida, debido a que sólo tiene activos los genes Q6 y Q7, ya que los Q8 y Q9 se han fusionado, lo que resulta en un gen Q8/Q9^d inactivo. Por otro lado, la cepa BALB/cAnn (Qa-2^{null}) no expresa la proteína Qa-2 debido a una

delección adicional de ADN genómico entre los genes Q6 y Q7, lo que conduce a su inactivación (Fragoso et al., 1998).

Por otra parte, las diferencias en la susceptibilidad observadas a la infección ocasionada por *T. crassiceps* entre cepas podrían estar vinculadas con genes relacionados con el H-2, que afectan el crecimiento del parásito en ratones. En diversos estudios se observaron diferencias significativas en el grado de la parasitosis entre ratones que llevan el haplotipo H-2d (BALB/cAnn y DBA/2), que fueron los más susceptibles, y ratones con los haplotipos H-2b (BALB/B, C57BL/6J y C57BL/10J) o H-2k (BALB/K, C3H/HeJ y C3H/FeJ), que eran relativamente resistentes (Fragoso et al., 1998).

Respuesta inmune

El sistema inmunológico es capaz de detectar, inactivar y destruir moléculas potencialmente patógenas, propias o ajenas. Así, cuando un patógeno entra en un organismo inmunológicamente competente se inicia una respuesta inmunológica específica, que en la mayoría de las ocasiones culmina con la destrucción del invasor (Chavarría et al., 2006).

El cisticerco de *T. crassiceps* expresa un conjunto muy extenso de antígenos, y cada uno de ellos tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunológica de características particulares. Este parásito tiene una participación crítica en el desencadenamiento y el tipo de respuesta inmunológica específica inducida (Chavarría et al., 2006).

Se sabe que la primera línea de defensa contra los parásitos, al igual que con otros patógenos, es el sistema inmune innato. Éste consiste en familias de moléculas como las proteínas séricas y los receptores de superficie celular e intracelular, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones; estos últimos, entre otras acciones, reconocen estructuras moleculares genéricas asociadas con los diferentes grupos de agentes patógenos, y movilizan a macrófagos y granulocitos, los cuales liberan proteínas antimicrobianas y metabolitos reactivos; también movilizan células dendríticas, las cuales a su vez activan a los linfocitos del sistema inmune adaptativo e inducen la proliferación de células T y B productoras de anticuerpos que reconocen específicamente al parásito (Maizels et al., 2009).

Los mastocitos y fundamentalmente los eosinófilos actúan de manera complementaria en la eliminación y destrucción del parásito. Cabe señalar que aunque estas células son inespecíficas, su acción

frente a los helmintos requiere la ayuda de mecanismos específicos, básicamente de las IgE (Doménech et al., 2008).

No obstante, la respuesta innata parece ser poco efectiva en el control de las infecciones por helmintos, y se ha demostrado resistencia a la actividad lítica del complemento, ya que son organismos demasiado grandes para ser fagocitados, y sus gruesos tegumentos impiden el daño por las enzimas de neutrófilos y macrófagos (Gutiérrez et al., 2006). Además, algunos parásitos pueden activar la vía alterna del complemento, y aunque la fagocitosis no suele ser eficaz, los fagocitos pueden secretar sustancias microbicidas sobre la superficie del parásito.

Por otro lado, en la inmunidad adaptativa durante la fase aguda, la respuesta se inicia con el reconocimiento y el procesamiento de antígenos de los helmintos por parte de las células presentadoras de antígeno, las cuales son reconocidas por los linfocitos y se da una progresión hacia una respuesta de tipo Th2, con reclutamiento y activación de eosinófilos y producción de IgE (Gutiérrez et al., 2006).

En el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* en el ratón, durante los estados iniciales de la infección se observa una respuesta

inmune clara pero transitoria Th1, que se distingue por los niveles elevados de IL-2, IFN- γ , **reacciones de hipersensibilidad tardía** y anticuerpos de subclase IgG2a, asociados con una reproducción reducida del parásito. A medida que la infección progresa se nota una respuesta enérgica y sostenida de tipo Th2, caracterizada por niveles elevados de IL-4, IL-6, IL-10 y anticuerpos de clase IgG2b e IgG1, que a su vez se relaciona con un incremento de la reproducción del parásito. Se cree que la reproducción progresiva del parásito podría explicar su residencia prolongada durante la infección crónica en ratones Balb/C (Rosales et al., 2009).

Además de esta respuesta tipo Th2, la infección por *T. crassiceps* se asocia con una serie de eventos inmunomoduladores, incluyendo la inducción de macrófagos de tipo M2 y la inhibición de la proliferación de células T (Espinoza et al., 2010).

Evasión inmune

Los parásitos son capaces de sobrevivir en el huésped por largo tiempo, utilizando diferentes mecanismos de evasión. Uno de los mecanismos por los cuales el parásito es capaz de evadir la respuesta inmune es la generación de nuevas proteínas y su variación entre las fases larvaria y adulta; la variación de los antígenos expresados

durante las diferentes etapas del ciclo de vida del parásito hace más probable la evasión de la respuesta inmune, facilitando el establecimiento de la infección (Riffkin et al., 1996).

Algunas estrategias de evasión utilizadas por el parásito interfieren con la modulación de la respuesta inmune sistémica en su beneficio. Se han reportado varios mecanismos de evasión, como el cambio en la respuesta de tipo Th1 hacia una respuesta de tipo Th2, la supresión de la respuesta de las células T y B, el mimetismo de las proteínas del parásito con las del huésped para engañar a la respuesta inmune, e incluso el uso de citocinas como factores de crecimiento del parásito (Riffkin et al., 1996).

Uno de los antígenos más importantes del parásito es el antígeno B o paramiosina, la cual tiene la propiedad de unirse al C1q e inhibir la cascada del complemento. Éste probablemente se une al C1q a través de sus dominios tipo colágena, y podría relacionarse con una estrategia parasitaria para modular la respuesta inmune del huésped. Se ha propuesto que la paramiosina es responsable del reducido infiltrado inflamatorio que se observa alrededor de los cisticercos, pues éstos mantienen una relación de equilibrio con el huésped. Por su parte, en *T. crassiceps* se ha reportado un receptor para Fc asociado a su superficie tegumentaria, que tiene una similitud

de 87.5% con la paramiosina de *T. solium*. Se ha propuesto que esta paramiosina inhibe la vía del complemento en la interfaz huésped-cisticerco; es decir, que desempeña un papel inmunomodulador de la respuesta del huésped (Solís et al., 2004).

Esta paramiosina tiene además propiedades similares a las fibronectinas, por lo que puede asociarse con la colágena del cerdo y el humano, y tiene la capacidad de dirigir las células que promueven el fenómeno inflamatorio alrededor del parásito (Chavarría et al., 2006).

Una de las estrategias más sutiles empleadas por parásitos y otros patógenos para evadir la respuesta inmune consiste en modular directamente la intensidad y la eficacia de la respuesta inmunitaria del huésped. Los patógenos inducen células T reguladoras (Treg), las cuales suprimen la capacidad de montar respuestas específicas hacia ellos (Maizels et al., 2009).

Células T reguladoras

Recientemente se ha estudiado el papel de las células T reguladoras en infecciones parasitarias. Estas células comprenden de 5 a 10% de las células CD4+ en la sangre periférica de ratones, y su función

principal es controlar la respuesta inmune por medio de la supresión de la proliferación, evitando así el daño colateral del tejido por la misma respuesta (Cruz et al., 2010). Si bien estas células pueden ayudar a limitar el daño tisular causado por respuestas inmunológicas intensas contra patógenos, también son capaces de limitar la magnitud de la respuesta inmune, lo cual puede provocar una respuesta fallida a la infección. Las Treg pueden activarse por infección y por los productos derivados de ella (Jaramillo et al., 2006).

Las células T reguladoras son una población de linfocitos T con un fenotipo característico CD4+, CD25+ y Foxp3. Se han descrito dos poblaciones de Treg: 1) células Treg naturales, las cuales expresan constitutivamente el receptor de IL-2 o cadena CD25; se producen en el timo y dependen de la expresión del factor de transcripción Foxp3, regulando la respuesta autoinmune y suprimiendo respuestas patológicas inflamatorias como respuesta a antígenos no-propios, y 2) células Treg inducidas o adaptativas, producidas a partir de linfocitos T naive (vírgenes) durante un proceso inflamatorio; las citocinas circundantes y el medio inflamatorio inducen a los linfocitos T a adoptar las características de células T reguladoras. Éstas suprimen negativamente la función de las células T activadas a través

de la secreción de citocinas tales como IL-10 (Tr1) y TGF- β (Th3) (Rojas et al., 2010).

Mecanismos de acción

Los mecanismos de supresión utilizados por las células T reguladoras son diversos, y dependen del medio y del tipo de respuesta inmune producida.

Supresión mediada por citocinas inhibitorias

Se ha sugerido que las citocinas inhibitorias, como el TGF- β , la IL-10 y la IL-35 son agentes activos en la función efectora de las Treg.

IL-10 es una importante citocina inmunorreguladora. Secretada por una gran cantidad de células del sistema inmune (monocitos, células dendríticas y células T reguladoras), se le han atribuido propiedades antiinflamatorias. Esta citocina, producida por las células Treg, disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras en las células dendríticas, lo que induce un estado tolerogénico en ellas y suprime los linfocitos T activados (Guzmán-Flores et al., 2013). Asimismo, inhibe la maduración de las células dendríticas, lo que

conlleva a la reducción del MHC clase II y reduce la liberación de citocinas proinflamatorias producidas por los mastocitos (Taylor et al., 2006).

Por otro lado, el TGF- β es una importante citocina pleiotrópica, con potentes propiedades inmunorreguladoras; es esencial para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en las células T CD4+. Además, el TGF- β **suprime la respuesta antígeno**-específica de células Th1 y Th2, y está asociado con la expresión de CTLA-4 en las células T (Taylor et al., 2006). El rol principal del TGF- β **es la inducción de** más células Treg.

Recientemente se describió otra citocina inhibitoria, llamada IL-35, expresada por células Treg. Según diversos estudios, parece actuar como una molécula antiinflamatoria mediante la inhibición de la proliferación de las células T activadas.

También se ha sugerido que la IL-35 puede suprimir el desarrollo de las Th17 *in vivo* (Hamza et al., 2010).

Supresión mediada por citólisis

La citólisis por la secreción de granzimas y perforinas se ha descrito y estudiado ampliamente en células NK y CD8+ citotóxicas. Sin embargo, los linfocitos Treg también exhiben actividad citotóxica (Rojas et al., 2010). Varios estudios han demostrado que las células Treg adaptativas expresan cantidades importantes de granzima B y desarrollan una actividad lítica dependiente de perforinas (Siachoque et al., 2011).

El proceso se inicia cuando la Treg libera los gránulos que contienen las granzimas y perforinas. La perforina se polimeriza y forma un poro transmembranal en la célula T efectora, que permite el ingreso de la granzima B al interior de la célula (Fuster-Lluch et al., 2004). Posteriormente, la granzima B actúa sobre la procaspasa 3 y la 10, hidrolizándolas; la caspasa 3 es responsable de la escisión de proteínas celulares clave, como las proteínas del citoesqueleto, que conduce a los cambios morfológicos observados en las células sometidas a apoptosis (Fuster-Lluch et al., 2004). Por otro lado, la granzima B también ejerce efecto sobre la procaspasa 8, la cual media la degradación de BID (miembro de la familia Bcl-2), lo que resulta en su traslado hacia la mitocondria y la liberación del citocromo C. La escisión de la procaspasa 8 ocasiona un gran

aumento la actividad del BID, y su translocación a la mitocondria promueve la salida del citocromo C. Una vez que el citocromo C se ha sido liberado en el citosol es capaz de interactuar con una proteína llamada Apaf-1. Esto conduce al reclutamiento de la procaspasa 9 en un complejo multiproteínico con citocromo C, Apaf-1 y ATP llamado apoptosoma. El apoptosoma tiene efecto en la procaspasa 3, activándola a caspasa 3 y causando la apoptosis (Fuster-Lluch et al., 2004).

Supresión por disrupción metabólica

Este mecanismo de disrupción depende del aumento exponencial del marcador CD25 en la superficie de la célula Treg. La expresión constitutiva de CD25 por células T reguladoras les da una ventaja competitiva inicial para el consumo de IL-2 sobre las células T naive, que expresan el CD25 sólo después de la estimulación de su TCR. En efecto, las células Tregs claramente privan a las células T efectoras de IL-2 en cultivos *in vitro*. Se ha demostrado que la competencia mediada por las células Treg por los factores de crecimiento conduce a la apoptosis de células efectoras por la privación de esta citocina. Se ha demostrado que el mediador de la muerte apoptótica es el mediador de muerte celular Bcl-2 (Sojka et al., 2008).

Una vía inhibitoria interesante para las células Treg es la modulación del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) en las células blanco. La elevación de los niveles del AMPc se ha asociado con la inhibición de la proliferación celular y la diferenciación de los linfocitos, y además causa la inhibición selectiva en la expresión de genes de citocinas, incluyendo IL-2 e interferón gamma, en parte a través de la cinasa A (PKA), bloqueando la actividad del factor nuclear κ B (NF- κ B) o la activación del represor transcripcional ICER (represor inducible temprano del AMPc). Evidencias recientes indican que las Tregs pueden aumentar los niveles de AMPc en las células blanco a través de al menos dos mecanismos: directamente por la entrega de AMPc, e indirectamente por la generación local de adenosina (Sojka et al., 2008).

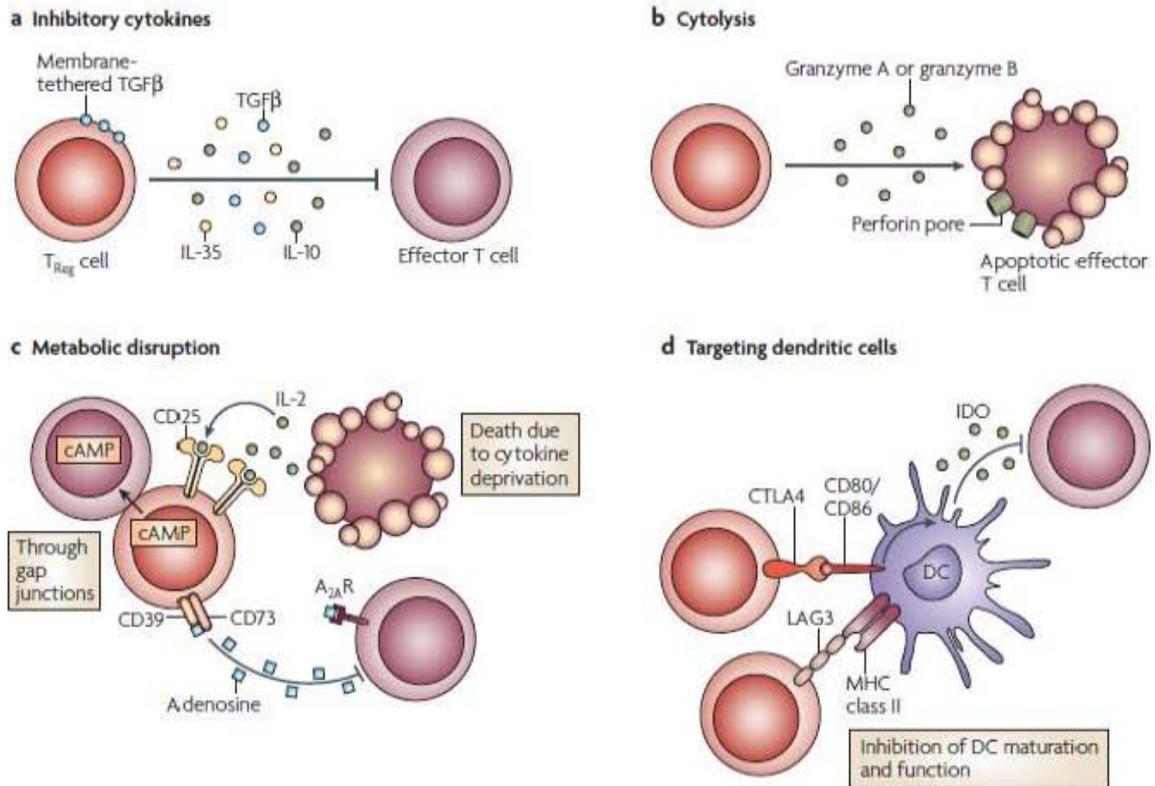
Supresión mediada por la modulación de la maduración y la función de las células dendríticas

Se ha demostrado una interacción célula-célula entre las Treg y las CPA. Esta interacción atenúa la activación de los linfocitos T efectores por parte de la CPA, en un proceso donde se involucraría a la molécula inhibitoria CTLA-4, expresada constitutivamente en las Treg (Rojas et al., 2010).

El CTLA-4 es una molécula expresada en la superficie de las Treg y se han descrito dos mecanismos para mediar la inhibición de la respuesta de los linfocitos T (Siachoque et al., 2011).

Entre otras funciones posibles, CTLA-4 interactúa con el CD80 y CD86 en la CPA y traduce una señal coestimuladora a las Tregs, activándolas y generando la cascada supresora. En otro mecanismo potencial, el CTLA-4 podría generar una supresión directa, porque fomentaría la inducción y activación de la enzima indolamina 2-3 dioxigenasa (IDO) en la CPA al interactuar con CD80 y CD86. La IDO cataliza la conversión de triptófano en kiunurenina y otros metabolitos, los cuales tienen efecto inmunosupresor en el ambiente local de las CPA a través de un mecanismo citotóxico, o posiblemente induciendo la generación de Tregs *de novo* a partir de células CD25-CD4+ (Rojas et al., 2010).

FIGURA 2. Mecanismos de acción de las células Treg.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la cisticercosis murina experimental causada por *Taenia crassiceps* participan factores genéticos, sexuales, inmunes y anatómicos. Se ha observado que el parásito parece evadir la respuesta inmune del hospedero para establecerse en éste. El modelo murino ha permitido definir los factores biológicos que participan en la modulación de la respuesta inmune en infecciones por céstodos. Se cree que uno de los mecanismos por los cuales el parásito controla la respuesta inmune del huésped involucra a las células T reguladoras. Como se ha demostrado en otras parasitosis, incluyendo la cisticercosis ocasionada por *T. solium*, los parásitos promueven la diferenciación de células T reguladoras para crear un microambiente propicio que favorezca su establecimiento y crecimiento. Se ha demostrado que la cepa C57BL/6 es resistente a la infección, por lo que el sistema inmune podría estar limitando la instalación y supervivencia del parásito. Sin embargo, aún se desconoce la implicación de las células Treg en la resistencia a la infección.

En nuestro laboratorio se observó anteriormente que en la cepa de ratones BALB/caNn, susceptible a la infección, las Tregs aumentan durante la infección del cisticerco de *T. crassiceps*, y éstas pueden estar modulando la respuesta inmune a través de diferentes

mecanismos: por moléculas supresoras de membrana como CTLA-4 y LAG-3, asociadas con el mecanismo de supresión por su interacción célula-célula con la CPA, y por moléculas supresoras solubles como granzima A, granzima B y perforina, asociadas con el mecanismo de citólisis de células efectoras.

Sin embargo, aún se desconoce la implicación de las células Tregs en la resistencia a la infección en la cepa C57BL/6.

Por ello, el presente trabajo pretende determinar el rol de las células Treg en el establecimiento del parásito y la progresión de la infección en ratones hembra de la cepa C57BL/6.

HIPÓTESIS

Las células T reguladoras están modulando la respuesta inmune efectora de forma homeostática, sin favorecer el crecimiento del parásito.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las células T reguladoras durante la infección del cisticerco de *Taenia crassiceps* en ratones hembra C57BL/6.

OBJETIVOS PARTICULARES

Infectar ratones hembra de la cepa C57BL/6 con cisticercos de *Taenia crassiceps* por vía intraperitoneal.

Determinar los porcentajes de células T reguladoras (CD4+, CD25+ y FOXP3) a diferentes tiempos de infección (5, 30, 90 y 130 días) y en los diferentes compartimientos (peritoneo, placas de Peyer, bazo y ganglio mesentérico).

Correlacionar los porcentajes de células Treg con la cantidad de cisticercos en el peritoneo a diferentes tiempos de infección.

Analizar la proliferación de células de bazo cuando son estimuladas con antígenos específicos del parásito y con antígenos inespecíficos (concanavalina A).

Determinar las moléculas con carácter supresor implicadas en los mecanismos de regulación de Tregs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se emplearon ratones hembra de la cepa C57BL/6, de 4 a 5 semanas de edad.

Los ratones fueron adquiridos y mantenidos en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se formaron dos grupos, con 48 ratones cada uno: el grupo A fue el grupo control (no infectado), y el grupo B fue el infectado.

Se realizó la infección por vía intraperitoneal, con 20 cisticercos de 2 a 3 mm de diámetro por ratón.

Obtención de células de los diferentes órganos

Se sacrificaron 12 ratones de cada grupo mediante una cámara de CO₂ a los 5, 30, 90 y 130 días postinfección.

Para la obtención de células del peritoneo se realizó un lavado con 10 mL de PBS. Posteriormente se extrajeron los siguientes órganos: bazo, ganglio mesentérico y placas de Peyer.

Para la obtención de las células de bazo, dicho órgano se colocó en una caja de Petri con PBS 1X, se maceró para obtener células en suspensión y se realizó la lisis de eritrocitos, para lo cual se utilizaron 2 mL de solución de cloruro de amonio al 1% durante 10 minutos, seguido de un lavado con PBS 1X y centrifugación a 1500 rpm durante 5 min.

Para la obtención de las células de ganglio y placas de Peyer se hizo una digestión con 1 mL de solución de colagenasa y DNasa durante 10 min. Posteriormente los órganos se maceraron para la obtención de las células y finalmente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min.

Linfoproliferación *in vitro*

Se obtuvo el bazo de cada ratón en cada grupo estudiado. Posteriormente el órgano se maceró para obtener las células y se realizó la lisis de los glóbulos rojos empleando una solución de cloruro de amonio al 1%. Se contaron las células para resuspender 10^7 células en 1 mL de PBS al 10% de suero fetal bovino, y se marcaron intracelularmente con CFSE (carboxifluoresceína diacetatosuccinimidil éster) a una concentración de 5 μ M. Posteriormente se incubaron a 37 °C por 5 minutos, se realizaron tres lavados con 15 mL de medio

RPMI 10% suero fetal bovino seguidos de centrifugación a 1200 rpm durante 10 min.

Las células marcadas se estimularon con concanavalina A (ConA), 5 µg/mL (Sigma, St. Louis, Missouri) o con Ag total de *T. crassiceps* (10 µg/mL). Para cada condición se utilizaron 10^5 células, empleando 200 µL del medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York) suplementado con antibiótico (1%), 2-mercaptoetanol 50 µM (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino (10%) (Gibco).

Las muestras se incubaron por 4 días a 37 °C. Al cuarto día se recuperaron las células y se marcaron con anticuerpos (fenotipo de células Treg) para identificar la población proliferativa. La adquisición de la proliferación celular se realizó en el equipo FACScalibur, y para el análisis se empleó el software Cytometer Cell Quest (Becton Dickinson).

Fenotipo de células T reguladoras

Para realizar la determinación del fenotipo de las células Tregs se emplearon 10^6 células de peritoneo, bazo, placas de Peyer y ganglio mesentérico. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales para marcaje extracelular: mouse anti-CD4 (isotype Rat IgG2a k)

Percep y mouse anti-CD25 (isotype IgG1) APC. Las células se incubaron con los anticuerpos durante 30 min a 4 °C. Las células se incubaron con solución de permeabilización por una noche. Al día siguiente se lavaron y se realizó el marcaje intracelular con anti-Foxp3 (isotype IgG2a, **k**) PE.

Todos los anticuerpos usados fueron adquiridos de eBioscience^{MR} (San Diego, California) y se emplearon a la concentración recomendada por el fabricante. La adquisición de las muestras se realizó en el citómetro FACScalibur y los datos se analizaron con el software Cytometer Cell Quest (Becton Dickinson).

RT-PCR

Para observar la expresión de los genes de las moléculas con carácter supresor en las células T reguladoras se realizó la extracción de RNA de las células de peritoneo mediante el reactivo Trizol Gibco BRL; se emplearon 5×10^7 células en 1 mL de Trizol.

La concentración de RNA se midió en el equipo Epoch BioTeK[®] a 260 nm. El cDNA se obtuvo mediante la técnica de retrotranscripción utilizando 1 µg de ARN más 1 µL de DNasa libre de RNasa buffer 10X y 1 µL de RNasa libre de DNasa (InvitrogenTM), incubando a 37 °C por

30 min en el termociclador Corbett Research modelo CG1-96 para eliminar el DNA genómico.

Posteriormente, para detener la reacción se adicionó 1 μ L de Stop Solution y se incubó a 65 °C por 10 min. Después se realizó la RT bajo las siguientes condiciones: se adicionó 1 μ L de oligo dT y 1 μ L de dNTP mix (Invitrogen™); se llevó a 65 °C por 5 min y se adicionaron 4 μ L de first strand buffer 5X, DTT y 2 μ L de RNasa out (Invitrogen™); se incubó a 42 °C por 2 min y se añadió 1 μ L de enzima Superscript™ II transcriptase reverse (Invitrogen™); posteriormente se incubó a 42 °C por 50 min y a 70 °C por 15 min.

El PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L agregando buffer PCR 10X (5 μ L), 50 mM MgCl₂ (1.5 μ L), 10 mM dNTP (1 μ L), Platinum® Taq (0.2 μ L), 3 μ L de cDNA, H₂O y los *primers* (Tabla 3) con las siguientes condiciones. Para FOXP3: 95 °C por 30 s, 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 54 °C 20 s, 72 °C por 20 s, y se finalizó con 72 °C por 1 min. Para todos los demás: 95°C por 5 min y 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se observaron en un gel de agarosa al 1.5%, revelados con Gel Red y visualizados y analizados en el equipo Minibis Pro, software v. 2.7.0.

TABLA 3. *Primers* empleados para la determinar la expresión de los genes de moléculas supresoras. Se muestran la secuencia, la temperatura media de alineación y el peso molecular.

Gen	Primer F 5´-3´	Primer R 5´-3´	TM (°C)	Peso (pb)	Referencia
CD4	GAGAGTCAGCGGAGTTCTC	CTCACAGGTCAAAGTATTGTTG	60	329	Vremec, et al., 2000
FOXP3	GGCCCTTCTCCAGGACAGA	GCTGATCATGGCTGGGTTGT	60	112	Kameshwar et al., 2004
PERFORINA	GCCTGGTACAAAAACCTCCA	AGGGCTGTAAGGACCGAGAT	60	172	Kitaura, et al., 2011
B-ACTINA	GTGGGCCGCTCTAGGCACCAA	CTCTTTGATGTCACGCACGATTC	60	450	Vremec, et al., 2000
LAG-3	ATGATTGCTAGTCCCTCAGG	TGGATGCTACAGGTGTAGG	59	491	Diseñados
GRANZIMA A	AGACCGTATATGGCTCTACT	CCCTCACGTGTATATTCATC	59	218	Revell. et al., 2011
GRANZIMA B	ATCAAGGATCAGCAGCCTGA	TGATGTCATTGGAGAATGTCT	59	262	Revell. et al., 2011
CD25	AAGATGAAGTGTGGGAAAACGG	GGGAAGTCTGTGGTGGTTATGG	60	158	Kitaura, et al., 2011
CTLA-4	TGTGCCACGACATTCACAG	TTGGGGGCATTTTCACATAG	60	367	Wang et al., 2006

Análisis estadístico

Los datos se procesaron en el software GraphPad InStat [DATASET1.ISD] versión 3.0 (San Diego, California). Las variables se describieron usando la media \pm desviación estándar.

La diferencia entre los grupos se calculó con la prueba de Mann-Whitney. Para los análisis de correlación se utilizó la prueba de Spearman.

Los valores de p menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Porcentajes de células T reguladoras

En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de linfocitos T CD4, Treg y células totales en los diferentes órganos y compartimientos.

Puede observarse una disminución de las células CD4 en el bazo a los 5 días ($p < 0.001$), con una recuperación a los 30 y 90 días, y vuelven a disminuir a los 130 días ($p < 0.01$). Por otro lado, se observa que en los primeros días de la infección hay un aumento en las células T reguladoras, aunque no es significativo, y disminuyen significativamente a los 130 días ($p < 0.01$).

En el ganglio mesentérico se observa una disminución significativa de células CD4 hasta los 130 días ($p < 0.05$). Sin embargo, las células Tregs aumentan significativamente a los 5 días ($p < 0.01$) de infección, y su proporción se mantiene constante a los 30 y 90 días, y disminuyendo significativamente a los 130 días ($p < 0.05$).

En las placas de Peyer no se observó diferencia significativa en los porcentajes de células CD4 durante la infección hasta los 130

días, cuando hubo un aumento significativo ($p < 0.05$). En cambio, las Tregs aumentaron a los 5 días de infección ($p < 0.01$), para después mantener constante su proporción a lo largo de la infección.

TABLA 1. Porcentaje de células en diferentes órganos inmunes.

DÍAS	BAZO			GANGLIO			PLACAS			NÚM. DE PARÁSITOS EN LA CAVIDAD PERITONEAL
	% CD4	% Treg	% de células totales ($\times 10^7$)	% CD4	% Treg	% de células totales ($\times 10^7$)	% CD4	% Treg	% de células totales ($\times 10^7$)	
control	24.60 \pm 5.25	4.64 \pm 1.93	3.35 \pm 1.40	34.50 \pm 4.89	6.64 \pm 2.42	1.82 \pm 7.30	14.26 \pm 4.39	3.62 \pm 0.99	0.391 \pm 2.54	
	INFECTADOS									
5	16.69 \pm 2.67***	5.53 \pm 3.48	3.62 \pm 1.33	36.00 \pm 3.15	11.81 \pm 4.06***	2.54 \pm 9.63*	14.74 \pm 1.87	5.79 \pm 1.84**	0.58 \pm 0.246	9.143 \pm 9.477
30	25.32 \pm 4.82	5.32 \pm 1.00	7.57 \pm 2.74***	35.15 \pm 3.52	6.19 \pm 1.61	1.95 \pm 4.41	15.55 \pm 1.76	4.29 \pm 1.01	0.405 \pm 0.226	280.4 \pm 0.748
90	29.63 \pm 4.09***	3.34 \pm 1.17	5.61 \pm 1.28***	32.98 \pm 2.67	7.34 \pm 5.45	1.66 \pm 7.72	16.05 \pm 1.77	4.79 \pm 1.18	0.388 \pm 0.146	1239 \pm 196.698
130	18.16 \pm 4.85**	2.04 \pm 0.31**	5.32 \pm 2.20*	30.30 \pm 4.36*	4.74 \pm 1.81*	3.24 \pm 1.50*	18.76 \pm 5.54*	2.67 \pm 1.45	0.754 \pm 2.83**	1827.67 \pm 411.34

Los datos muestran la media \pm desviación estándar. Todos los datos fueron analizados con la prueba de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 8$.

Ahora bien, en la cavidad peritoneal (Tabla 2) se observa un aumento de células CD4 a los 5 ($p < 0.001$), 30 ($p < 0.05$) y 130 días ($p < 0.01$) de infección. En cuanto a las Tregs, únicamente hay aumento significativo a los 5 días ($p < 0.01$).

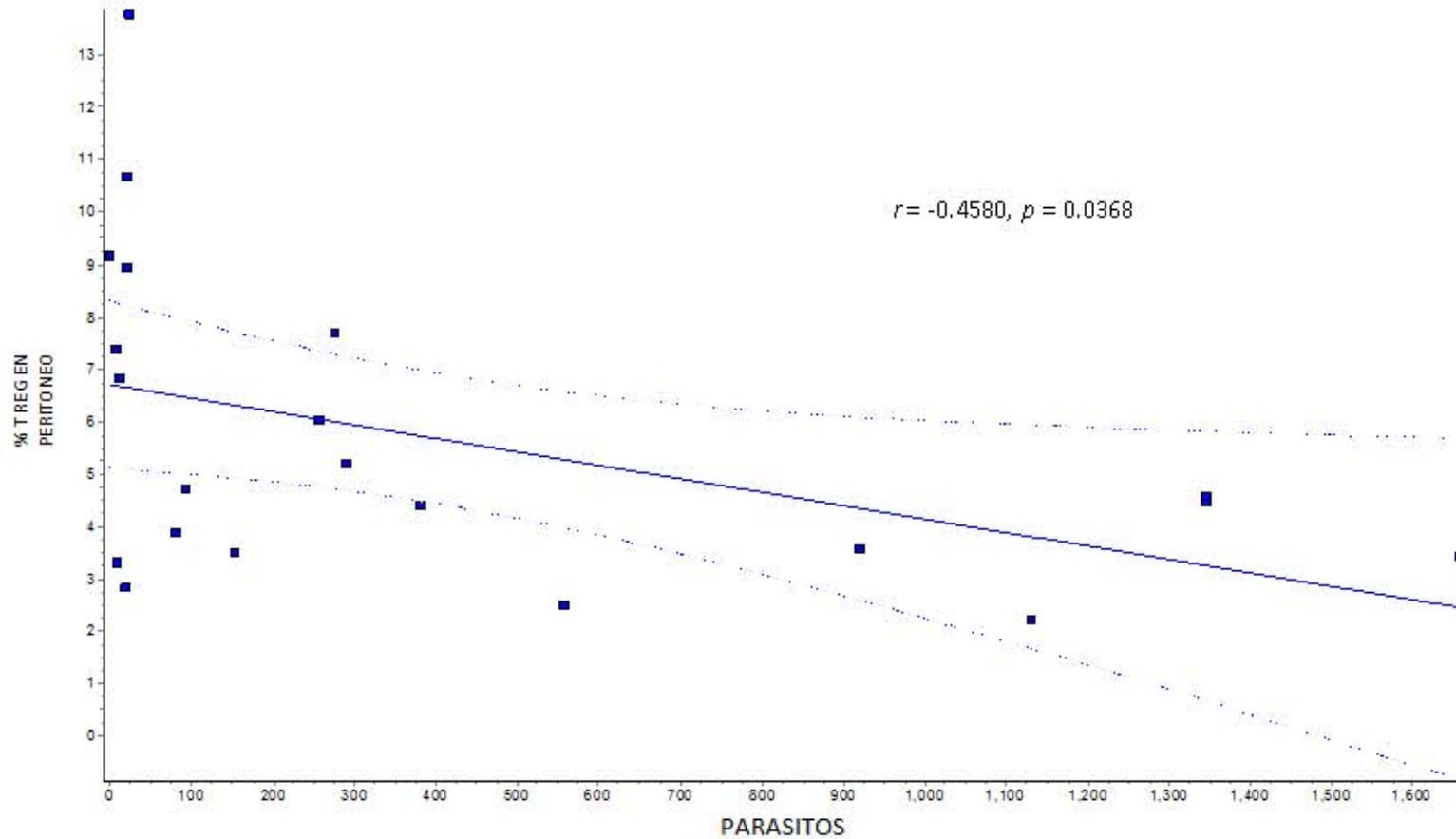
TABLA 2. Porcentajes de células en el peritoneo.

DÍAS	PERITONEO			
	% CD4	% Treg	% de células totales ($\times 10^7$)	No. DE PARÁSITOS EN LA CAVIDAD PERITONEAL
CONTROL	13.24 \pm 6.90	4.91 \pm 2.68	0.404 \pm 0.288	
INFECTADOS				
5	21.71 \pm 4.80 ***	8.51 \pm 3.40 **	1.25 \pm 0.705 **	138.75 \pm 8.871
30	21.29 \pm 4.96 **	4.83 \pm 1.46	2.37 \pm 0.735 ***	192.75 \pm 196.28
90	12.37 \pm 5.76	3.12 \pm 1.19	0.661 \pm 0.376	1185.75 \pm 203.76
130	18.98 \pm 3.21 **	4.14 \pm 1.52	1.41 \pm 0.344 ***	1507.5 \pm 656.68

Los datos muestran la media \pm desviación estándar. Todos los datos se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $n = 8$.

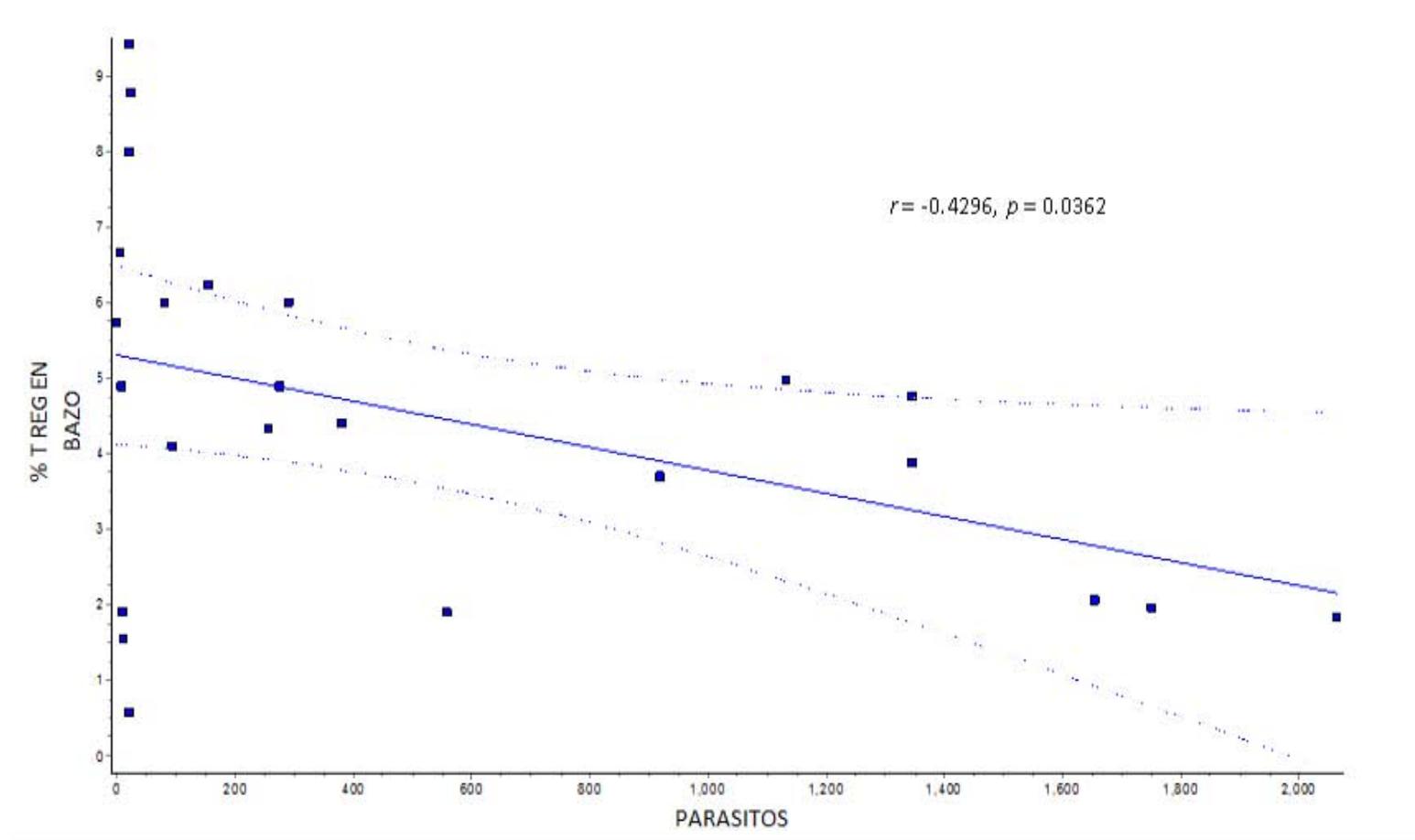
Por otra parte, se observó una correlación negativa entre el porcentaje de Tregs en el peritoneo y la carga parasitaria ($r = -0.4580$, $p = 0.0368$), en donde la población de células T reguladoras va disminuyendo con respecto de la carga parasitaria (Figura 3).

FIGURA 3. Correlación entre el número de parásitos y el % de células T reguladoras en el peritoneo.



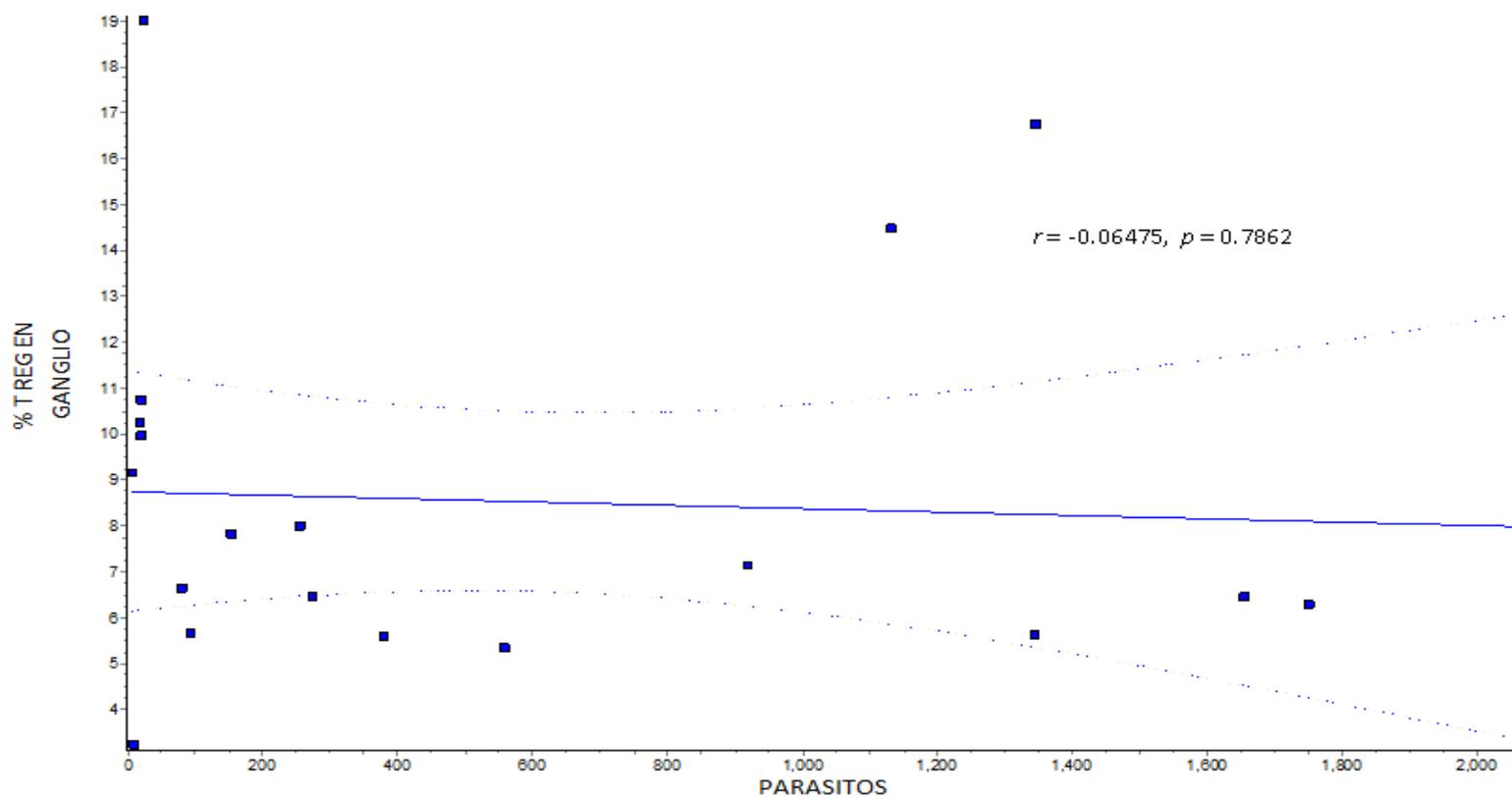
También puede observarse una correlación negativa entre las células Treg del bazo y la carga parasitaria en el peritoneo (Figura 4); hay una disminución ($r = -0.4296$, $p = 0.0362$) en la población de células T reguladoras van con respecto a la carga parasitaria.

FIGURA 4. Correlación entre el número de parásitos en el peritoneo y el % de células T reguladoras en el bazo.



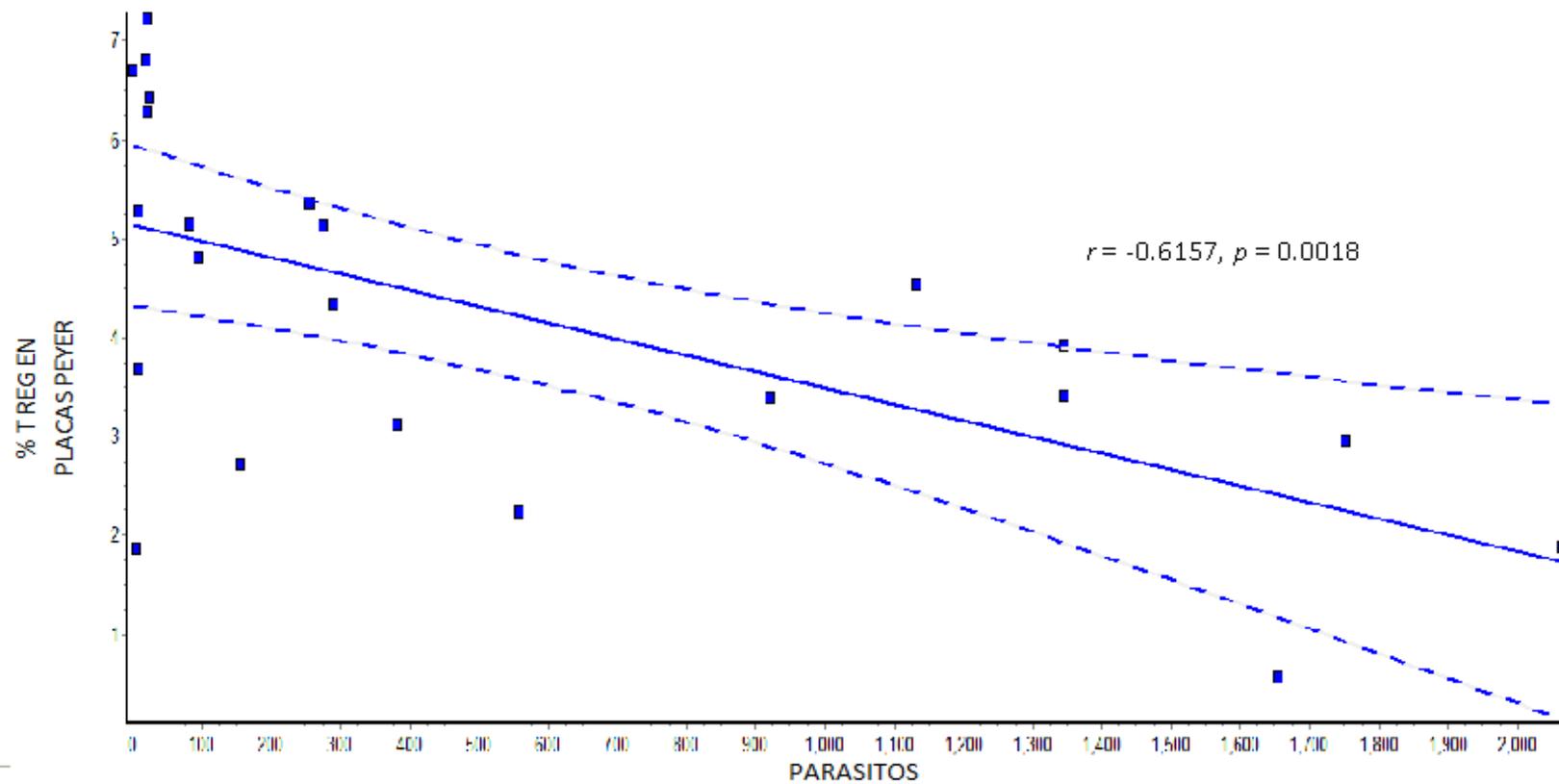
En el ganglio mesentérico no se observaron diferencias significativas (Figura 5).

FIGURA 5. Correlación entre el número de parásitos en el peritoneo y el % de células T reguladoras en el ganglio mesentérico.



Asimismo, en las placas de Peyer (Figura 6) hay una correlación negativa entre las células T reguladoras y la carga parasitaria en el peritoneo. Puede observarse una disminución muy significativa de las células Treg ($r = -0.6157$, $p = 0.0018$).

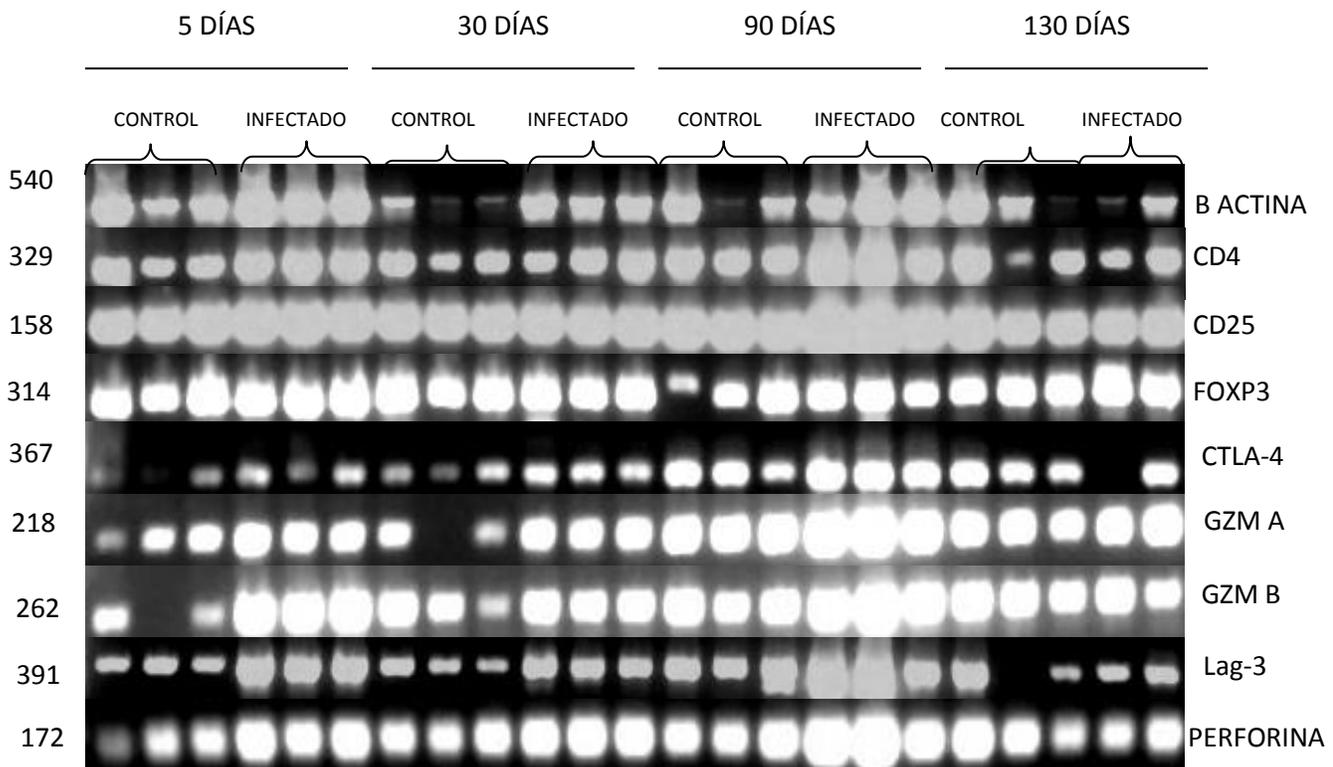
FIGURA 6. Correlación entre el número de parásitos en el peritoneo y el % de células T reguladoras en las placas de Peyer.



Expresión de moléculas supresoras

En la figura 7 se muestran los productos de PCR de los genes de las moléculas supresoras expresadas en células Treg de la cavidad peritoneal.

FIGURA 7. Productos de PCR de los genes de las moléculas supresoras de células T reguladoras del peritoneo.



En esta figura se muestra la amplificación de los genes de cada grupo (control e infectado), en la que se utilizó cDNA de 3 ratones por cada grupo estudiado a los diferentes tiempos de infección.

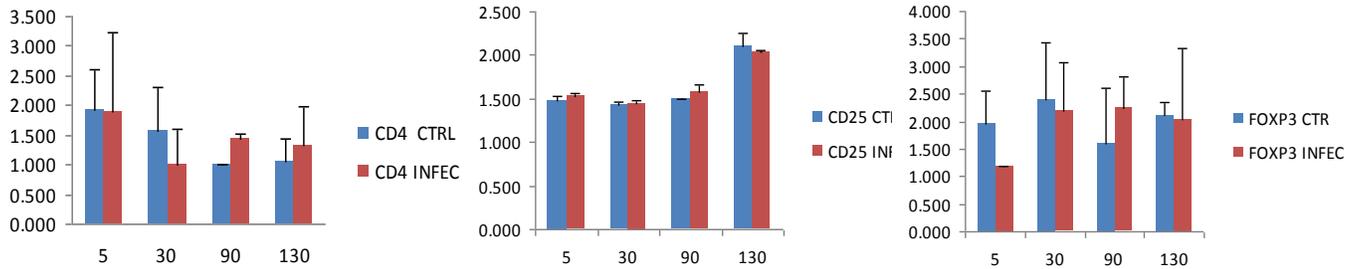
El análisis de la expresión relativa con respecto del gen constitutivo de beta actina, para los genes analizados muestra que las moléculas que caracterizan a las Treg (CD25 y FOXP3) no aumentan significativamente con respecto a los controles (figura 8) a lo largo de la infección.

Por otro lado, en las moléculas supresoras de membrana se encontró que la expresión de CTLA-4 aumenta significativamente a los 90 días ($p < 0.05$), y la expresión de Lag-3 aumentó significativamente a los 30 días ($p < 0.05$).

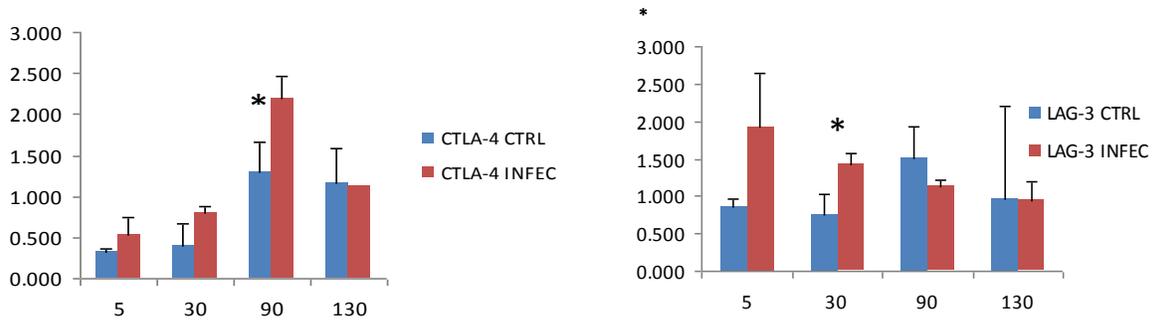
Con respecto a los genes de las moléculas solubles, se observó que ni la granzima A ni la granzima B aumentan significativamente en ningún momento de la infección. Por otro lado, la perforina tiene un aumento significativo a los 5 días ($p < 0.05$) y a los 30 días ($p < 0.01$).

FIGURA 8. Expresión de moléculas supresoras.

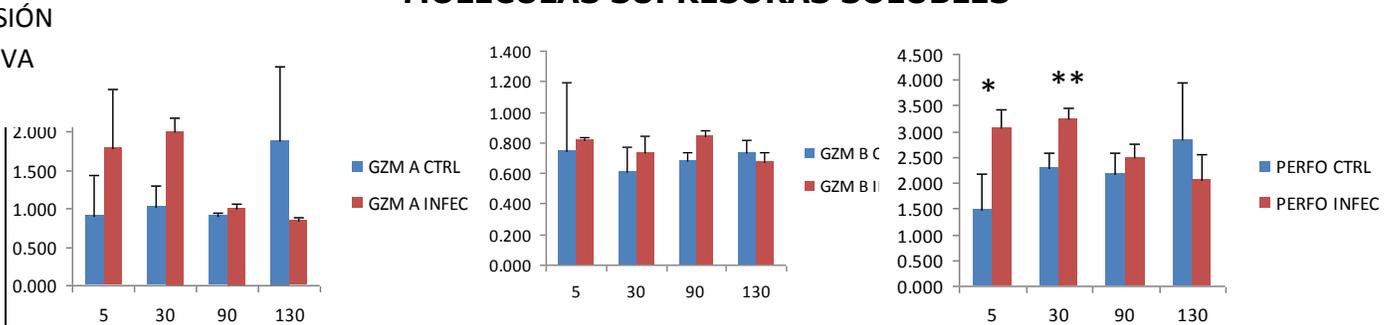
FENOTIPO DE CÉLULAS T REGULADORAS



MOLÉCULAS SUPRESORAS DE MEMBRANA



MOLÉCULAS SUPRESORAS SOLUBLES



$$ER = \frac{ABS \text{ GEN X}}{ABS \text{ GEN } \beta \text{ ACTINA}}$$

TIEMPO EN DÍAS

ER= Expresión relativa con respecto del gen constitutivo beta actina. ; X = Gen de las moléculas supresoras

Por otra parte, se observó que la expresión de CD4 correlaciona positivamente con LAG-3 ($r = 0.6570$, $p < 0.005$) (Tabla 4). También se observó que la expresión de CD25 se correlaciona positivamente con la de granzima B ($r = 0.6523$, $p < 0.005$).

En cuanto a las moléculas supresoras expresadas en la membrana, se observó una correlación positiva con LAG-3 y la granzima A ($r = 0.8150$, $p < 0.001$). Finalmente, se observó una correlación positiva entre las moléculas solubles con carácter supresor granzima A y perforina ($r = 0.7114$, $p < 0.05$).

TABLA 4. Correlación entre moléculas con carácter supresor.

	CD4	CD25	Foxp3	CTLa-4	LAG-3	GZA	GZB
CD4							
CD25	$r = 0.004192$						
FOXP3	$r = -0.5109$	$r = -0.1801$					
CTLA-4	$r = -0.2853$	$r = 0.4199$	$r = 0.4798$				
LAG-3	$r = 0.6570^*$	$r = 0.2258$	$r = -0.3918$	$r = -0.5578$			
GrzA	$r = 0.5202$	$r = -0.02115$	$r = -0.1339$	$r = -0.6539^*$	$r = 0.8150^{**}$		
GrzB	$r = -0.1380$	$r = 0.6523^*$	$r = 0.2182$	$r = 0.3176$	$r = 0.1532$	$r = 0.08602$	
Prf	$r = 0.4809$	$r = -0.05291$	$r = -0.2979$	$r = -0.5771$	$r = 0.5097$	$r = 0.7114^*$	$r = 0.1725$

Los datos muestran el coeficiente de correlación. Todos los datos con $p < 0.05$ se consideraron significativamente diferentes. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. $n = 11$.

Papel de las células Treg en la respuesta proliferativa durante la estimulación con antígenos del parásito y con concanavalina A

Para analizar el papel de las células T reguladoras durante la respuesta proliferativa, se analizó el fenotipo de las células efectoras (CD4+) y de las células T reguladoras (CD4+, CD25+, Foxp3). Esto se hizo bajo la hipótesis de que las células T reguladoras están proliferando prioritariamente o en mayor número que las células T efectoras.

En la Tabla 5 se muestra la respuesta proliferativa al estimular inespecíficamente células de bazo con Concanavalina A. Puede observarse que no hay diferencia significativa en la estimulación no-específica, ni de células CD4 ni de células Treg. Sin embargo, a los 30 días de infección hay un aumento significativo de células Treg ($p < 0.05$) en el grupo infectado con respecto al control.

TABLA 5. Proliferación de células del bazo con estimulación con Concanavalina A (no-específica).

Porcentaje de proliferación tras la estimulación con ConA					
Grupo	Día	Proliferación total	Proliferación CD4	% de T efectoras	% de Treg
Control	5	32.45 ± 7.649	3.878 ± 1.778	2.633 ± 0.8859	0.9764 ± 0.8255
Infectado		28.575 ± 11.378	4.587 ± 1.677	3.402 ± 1.605	1.007 ± 0.4676
Control	30	38.892 ± 9.017	2.348 ± 0.8077	2.112 ± 0.8268	0.1057 ± 0.06018
Infectado		35.252 ± 9.500	4.265 ± 2.371	3.496 ± 1.910	0.2717 ± 0.1342*
Control	90	54.672 ± 5.343	7.782 ± 2.296	5.589 ± 2.394	0.5712 ± 0.1370
Infectado		49.194 ± 6.709	8.016 ± 2.087	5.386 ± 1.553	0.7016 ± 0.2242
Control	130	44.522 ± 13.618	5.252 ± 3.088	4.598 ± 2.662	0.3932 ± 0.3315
Infectado		51.28 ± 15.164	7.336 ± 2.983	6.431 ± 2.998	0.6012 ± 0.3827

Los datos se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

En la Tabla 6 se muestra la proliferación con estimulación antígeno-específica, en la cual ambos grupos no mostraron respuesta a ningún tiempo de infección.

TABLA 6. Proliferación con antígeno total de *T. crassiceps* (específica).

Porcentaje de proliferación a la estimulación con Ag TOTAL					
Grupo	Día	Proliferación total	Proliferación CD4	% de T efectoras	% de Treg
Control	5	3.735 ± 1.775	0.055 ± 0.02811	0.04833 ± 0.02846	0
Infectado		3.783 ± 1.212	0.1033 ± 0.1118	0.0695 ± 0.06913	0
Control	30	4.098 ± 0.9339	0.01667 ± 0.01211	0.0125 ± 0.01009	0
Infectado		3.608 ± 0.9040	0.07833 ± 0.07885	0.07567 ± 0.07853	0
Control	90	4.56 ± 0.5096	0.285 ± 0.4970	0.2677 ± 0.4908	0
Infectado		5.84 ± 5.718	0.258 ± 0.1714	0.2372 ± 0.1685	0
Control	130	2.995 ± 1.166	0.08333 ± 0.05465	0.06317 ± 0.04863	0
Infectado		4.845 ± 2.254	0.1517 ± 0.1783	0.1123 ± 0.1385	0

Los datos se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

DISCUSIÓN

Anteriormente se ha descrito que en diversas parasitosis se desencadena una respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, y que ambas se complementan para montar una respuesta eficiente contra diferentes patógenos (Gutiérrez et al., 2006).

Sin embargo, los parásitos han desarrollado diferentes mecanismos de evasión para modular la respuesta inmune que el hospedero activa en su contra (Riffkin et al., 1996).

En el caso del cisticerco de *Taenia crassiceps*, se ha observado que éste es capaz de evadir la respuesta inmune mediante de diferentes mecanismos (Espinoza et al., 2010).

En el presente trabajo se determinó la proporción de células T reguladoras durante la cisticercosis experimental en ratones hembra de la cepa C57BL/6, la cual es restrictiva a la infección.

En este estudio se observó que no hay aumento significativo en la población de células T reguladoras en la cavidad peritoneal, el sitio de instalación del parásito. Únicamente se observó un aumento significativo

de células Treg a los 5 días de infección con respecto al grupo control. Por ello, podría sugerirse que las células T reguladoras tienen un papel limitado en la instalación del parásito. Por otra parte, en etapas tardías de la infección las células T reguladoras no parecen ejercer un papel importante.

En este trabajo se analizaron los porcentajes de células Treg en diferentes compartimentos. En el bazo no se observó un aumento significativo de las células Treg. Sin embargo, en el ganglio mesentérico y las placas de Peyer se observaron aumentos significativos de células Treg al inicio de la infección (5 días). Este aumento de células en los órganos linfoides podría ser compatible con la inducción de células Treg como parte de la respuesta inmune adaptativa que se desarrolla contra el parásito.

Paralelamente se analizaron los mecanismos de acción de las Treg y su posible relación con la susceptibilidad a la infección en la cepa resistente C57BL/6.

Con respecto a la expresión del conjunto de moléculas que median el mecanismo de acción por citólisis por parte de las células Treg (CD25, FOXP3, GRZA, GRZB Y PERF) se observan cambios significativos únicamente en la perforina a los días 5 y 30 de infección. Pero al no existir

cambios en las moléculas relacionadas con el fenotipo de Tregs, podríamos asociar este aumento en la perforina con otras poblaciones inmunes, como las células CD8 citotóxicas. Para confirmar este punto se requieren estudios complementarios.

En cuanto al mecanismo de regulación por contacto célula-célula con la CPA, únicamente se observó un aumento significativo de la molécula CTAL-4 a los 90 días ($p < 0.05$) y de LAG-3 a los 30 días de infección ($p < 0.05$). En ambos casos se trata de una infección tardía, por lo que la implicación de las Tregs podría asociarse con un fenómeno homeostático del control de la respuesta inmune.

En lo tocante al mecanismo de control de la respuesta inmune proliferativa por parte de las células Treg, no se observó diferencia significativa en los ratones infectados con respecto a los controles. Esto coincide con los resultados anteriormente observados por Sciutto y col., quienes reportaron que el cisticerco de *T. crassiceps* induce supresión en la respuesta proliferativa efectora cuando se estimula con antígenos específicos y con ConA (Sciutto et al., 1995).

Adicionalmente, en este trabajo se determinó el fenotipo de las células que proliferan ante diferentes estímulos. Se observó que las células

proliferantes tenían fenotipo efector, descartando así la hipótesis de que las Treg proliferaban prioritariamente, y que de esta forma ejercían un control de la respuesta proliferativa.

Finalmente, la correlación negativa observada entre la carga parasitaria y el porcentaje de células Treg en el bazo, las placas de Peyer y el peritoneo indica que conforme es mayor el número de parásitos, el nivel de las células Treg va disminuyendo. Esto podría sugerir que las células Treg no tienen un papel importante en la instalación y supervivencia del parásito en la cepa C57BL/6, permitiendo que el sistema inmune actúe para controlar la respuesta al parásito.

Estos hallazgos contrastan con lo observado en BALB/cAnn, cepa permisiva a la cisticercosis murina, en donde las células T reguladoras se encuentran aumentadas en el peritoneo (Adalid-Peralta, artículo en preparación). Estas diferencias entre ambas cepas nos permiten considerar que la presencia diferencial de células Treg en el peritoneo podría asociarse con la susceptibilidad a la infección.

CONCLUSIONES

En la cepa resistente a la infección C57BL/6 no hay aumento significativo de las células T reguladoras durante la cisticercosis murina experimental, por lo que no están controlando la respuesta inmune para favorecer el establecimiento del parásito. Con respecto a los mecanismos de supresión de las células Treg, no se observan cambios significativos durante la infección, lo cual indica que las células T reguladoras están controlando de forma homeostática la respuesta inmune.

En la cisticercosis causada por *T. crassiceps* en la cepa C57BL/6, la respuesta inmunoinflamatoria podría actuar favoreciendo la eliminación del parásito.

ANEXO I

Procedimiento para realizar el conteo celular

Se diluyen 10 μ L de la muestra con 10 μ L de tinción azul de tripano. Se colocan 10 μ L de la mezcla en la cámara de Neubauer y se cuenta al microscopio a 40x.

- Cálculo

$\#CeC / \#CuC \times 25 \times 10^4 \times \text{la dilución} = \text{número de células/mL}$

$\#CeC = \text{Núm. de células contadas}$

$\#CuC = \text{Núm. de cuadros contados}$

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Solución de digestión:

20 mL de RPMI

40 μ g de DNasa/mL = 800 μ g - 0.008 g

0.5 μ g de colagenasa/mL = 10 μ g - 0.01 g

SFB - 5%

PBS 10X pH 7.2: NaCl - 80 g
KCl - 2g
KH₂PO₄ - 2g
Na₂HPO₄ - anhidro - 23.13 g
1 L de H₂O milli-Q

Para PBS 1X, tomar 100 mL de PBS 10X y aforar a 1000 mL.

PBS* para 1L: PBS 1X
Suero fetal bovino al 5%
Azida de sodio al 0.02%

Solución de lisis: NH₄Cl - 2.8 g
KHCO₃ - 0.25 g
EDTA disódico - 0.009 g

Aforar a 250 ml con H₂O milli-Q, filtrar y esterilizar.

Solución de fijación y permeabilización:

*Para 10 mL, se diluyen 2.5 mL de buffer en 7.5 de diluyente.

1 ---- 4

X ---- 10

Solución de lavado/permeabilización

Diluir 1 mL de Permeabilization en 10 mL de H₂O milli-Q.

ANTICUERPOS EMPLEADOS

-CD4 rat (DA) igG 2^ak Percp-C y 5.5: Bd Biosciences

-FITC anti-mouse CD127

-CD16/CD32 (mouse BD Fc block) purified rat anti-mouse

-CD25 (IL-2 receptor α chain, p55 rat (outbred OFA) IgG 1 λ APC: Bd Biosciences

-FoxP3 anti-mouse

TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

FIGURA 2. Mecanismos de acción de las células Treg.

FIGURA 3. Correlación entre el número de parásitos y el % de células T reguladoras en el peritoneo.

FIGURA 4. Correlación entre el número de parásitos en el peritoneo y el % de células T reguladoras en el bazo.

FIGURA 5. Correlación entre el número de parásitos en el peritoneo y el % de células T reguladoras en el ganglio mesentérico.

FIGURA 6. Correlación entre el número de parásitos en el peritoneo y el % de células T reguladoras en las placas de Peyer.

FIGURA 7. Productos de PCR de los genes de las moléculas supresoras de células T reguladoras del peritoneo.

FIGURA 8. Expresión de moléculas supresoras.

TABLA 1. Porcentaje de células en diferentes órganos inmunes.

TABLA 2. Porcentajes de células en el peritoneo.

TABLA 3. **Primers** empleados para la determinar la expresión de los genes de moléculas supresoras. Se muestran la secuencia, la temperatura media de alineación y el peso molecular.

TABLA 4. Correlación entre moléculas con carácter supresor.

TABLA 5. Proliferación de células del bazo con estimulación con concanavalina A (no-específica).

TABLA 6. Proliferación con antígeno total de *T. crassiceps* (específica).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Chavarría Anahí, Edda Sciutto. Respuesta inmunológica en la cisticercosis humana y porcina. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Primera edición 2006. Pp. 133-154.

Cruz B. Claudia Andrea, Mauricio Sarrazola S., Juan Pedro Laclette S. Análisis de la población de células T reguladoras Foxp3 en el modelo murino de amibiasis intestinal. Publicación científica en ciencias biomédicas. Vol.8 No. 23 2010.

Doménech Ana, Alicia Gibello, Victorio M. Collado, Rebeca Porras, M. Mar Blanco. El sistema inmune innato II: la primera respuesta frente a la infección. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 2008 2(1): 17-30

Espinoza Jiménez Arlett, Irma Rivera-Montoya, Roberto Cárdenas-Arreola, Liborio Morán, and Luis I. Terrazas. *Taenia crassiceps* infection attenuates multiple low-dose Streptozotocin-induced diabetes. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2010, Article ID 850541, 11 pages.

Fleury Agnes, Alfonso Escobar, Anahí Chavarría, Roller Carrillo-Mezo, Edda Sciutto. Cisticercosis en el humano. Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Primera edición 2006. Pp. 41-80.

Fuster-Lluch O., Galindo M. F., Cena V., Jordán J., Las serina proteasas y su función en los procesos de muerte neuronal. Rev Neurol 2004; 38(5): 449-457.

Gutiérrez Hernández J. Alonso, Dr. Victor M. Hernández Bautista, Dr. José G. Huerta López. Respuesta inmune a virus y parásitos. Alergia, asma e inmunología pediátricas. Artículo de revisión. Vol. 15, Núm. 3. Septiembre-Diciembre 2006. pp 94-96.

Guzmán-Flores Juan Manuel, Portales Pérez Diana Patricia. Mecanismos de supresión de células T reguladoras (Treg). Gaceta Médica de México. Artículo de revisión. 2013; 149:630-8.

Heldwein Katharina, Hans-Gernot Biendermann, Wolf-Dieter Hamperl, GriselaBretzel, Thomas Löscher, Davide Laregina, Matthias Frosch, Dietrich W. Büttner, Dennis Tappe. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in patient with non-Hodgkin's lymphoma. Trop. Med. Hyg., 75(1), 2006, pp. 108–111.

Hober Eric P. William Ebinger, and James A. Rendert. Fatal cysticercosis by *Taenia crassiceps* (Cyclophyllidea: Taeniidae) in a presumed immunocompromised canine host. Parasitol. 85 (6), 1999. p. 1174-1178.

Jaramillo Francisco Javier. Células T reguladoras, infección y autoinmunidad: implicaciones en terapéutica. Artículo de revisión. Asociación Colombiana de infectología. 2006.

López Moreno Héctor Samuel. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. Salud pública de México. Vol. 44, no. 2. 2002.

Maizels Rick M., Tato Zaldívar Patricia, José Lous. Parasite immunomodulation and polymorphisms of the system. Journal of Biology 2009, 8: 62.

Mooney. A., R. J. Spolskil, E. J. See, and R. E. Kuhn*. Immune Destruction of Larval *Taenia crassiceps* in Mice. Department of Biology, Wake Forest University, Winston-Salem, North Carolina 27109. January 2000.

Ostoa-Saloma Pedro. Pedro Ostoa-Jacobo, Marcela Esquivel-Velázquez, Silvana Bazúa, Carlos Larralde. Budding of *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2010.

Rojas Juan Ignacio, Sergio J. González, Liliana Patrucco, Edgardo Cristiano. Rol de las células T reguladoras en esclerosis múltiple. Servicio de Neurología, Hospital italiano de Buenos Aires. Medicina 2010: 70: 79-86.

Rosales-Borjas Disney, María A. Arévalo-Rosales, Librado Ortiz-Ortiz. Respuesta inmune a algunos parásitos extracelulares. Revista médica de la extensión portuguesa-ULA. Volumen 3/Número 1/2009.

Rossi Nineth, Dr. Ivan Rivas, Dr. Manuel Hernandez, y Dra. Haideé Urdaneta. Inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis: estudio comparativo de extractos antigénicos de *Cysticercus cellulosae* y *Taenia crassiceps*. Revista cubana med trop 2000; 52(3):157-64.

Sarti Elsa. La teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Salud Pública de México. Vol. 38, no 3. mayo-junio 1997. Pp. 225-231.

Sciutto Edda, Gladis Fragoso, Mercedes Baca, Vera de la Cruz, Liorena Lemus y Edmundo Lamoyi. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. Infection and immunity, June 1995. P. 2277-2281.

Siachoque Heber, Natalia Satisfesteban, Antonio Iglesias-Gamarra. T regulatory lymphocytes: subpopulations, mechanism of action and importance in the control of autoimmunity. Revista Colombiana de Reumatología Vol. 18. Núm. 3, septiembre 2011, pp. 203-220.

Sojka Dorothy K., Sojka, Yu-Hui Huang and Deborah J. Fowell Shevach Ethan M. Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression. Immunity 30, May 22, 2009 Elsevier Inc.

Solís F. Carlos, José Vázquez Talavera, Juan Pedro Laclette. Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*. Gaceta Médica de México. Vol. 140, Núm. 2. 2004.

Taylor Alison, Johan Verhagen, Kurt Blaser, Mubeccel Akdis and Cezmi A. Akdis. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells. Blackwell Publishing Ltd, Immunology, 117, 433-442 433. 2006.

Participación de las células T reguladoras en la cisticercosis experimental murina por *taenia crassiceps*

Nataly Montserrat Ruiz-Monroy¹, Alexander López-Roblero¹, Marisol Nájera-Ocampo², Cynthia Camacho-Vázquez², Asiel Arce-Sillas¹, Didier Casanova-Hernández¹, Héctor Palafox-Fonseca², Marlene Melo-Salas¹, Gladis Fragoso², Edda Sciotto-Conde¹, Laura Adalid-Peralta^{1,3}

RESUMEN

Objetivo: determinar el papel de las células T reguladoras (Treg) durante la infección del cisticerco de *taenia crassiceps* en ratones C57BL/6. **Material y métodos:** se emplearon ratones hembras de 4 a 5 semanas de edad, de la cepa C57BL/6J. Se formaron dos grupos de ratones; se inoculó a cada ratón del grupo I por vía intraperitoneal con 20 cisticercos; el grupo II, sin infectar, se empleó como control. A diferentes tiempos de infección (5, 30, 90 y 130 días) se determinó el nivel de células Treg en el peritoneo, ganglios mesentéricos, placas de Peyer y el bazo. Paralelamente se evaluó la capacidad proliferativa de las células del bazo, estimulándolas con concanavalina A (ConA) y antígenos de *T. crassiceps*. **Resultados:** se observó que los niveles de Tregs fueron similares entre el grupo control y el infectado en el sitio de instalación del parásito (peritoneo) durante el periodo de estudio. Al mismo tiempo, se observaron niveles similares de proliferación en ambos grupos cuando las células se estimularon con ConA. Los antígenos específicos de cisticerco no indujeron proliferación de células T efectoras ni de Tregs. Estos resultados demuestran que el parásito *T. crassiceps* promueve una disminución en la capacidad proliferativa de linfocitos T, que es independiente de células Treg antígeno-específicas. **Conclusiones:** la resistencia a la

infección por el cisticerco de *T. crassiceps* en ratones de la cepa C57BL/6 no está asociada a presencia de células Treg.

Palabras clave: cisticercosis, células T reguladoras, *taenia crassiceps*, parásito

ROLE OF REGULATORY T CELLS ON MURINE EXPERIMENTAL *TAENIA CRASSICEPS* CYSTICERCOSIS

ABSTRACT

Objective: to explore the role of T regulatory (Treg) cells during infection by *Taenia crassiceps* in C57BL/6 mice. **Materials and methods:** female C57BL/6J, 4-5-weeks-old mice were used. Mice were distributed in two groups. Mice from group I were intraperitoneally inoculated with 20 cysticerci each. Mice from group II were not infected and were used as control. At different times post-infection (5, 30, 90, and 130 days) Treg cells level was evaluated at peritoneum, mesenteric ganglia, Peyer's patches, and spleen. Concurrently, the proliferative capacity of spleen cells was assessed, by stimulating them both with Concanavalin A (ConA) and *T. crassiceps* antigens. **Results:** treg levels at the site of parasite establishment (peritoneum) were similar in the control group and the infected group during the period of study. Likewise, similar proliferation levels were observed in both groups when cells were stimulated with ConA. Cysticercal specific antigens failed to induce T effector or Treg cell proliferation. These results show that *T. crassiceps*

¹Unidad Periférica para el Estudio de la Neuroinflamación en Patologías Neurológicas, UNAM-INNN. ²Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. ³Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Correspondencia: Laura Adalid-Peralta. Insurgentes Sur 3877. Col. La Fama, 14269 México, D.F.

promotes a decrease in the proliferative capacity of T lymphocytes, which does not depend on antigen-specific Tregs. **Conclusions:** the resistance to infection by *T. crassiceps* cysticerci in the strain C57BL/6 is not associated to the presence of Treg cells.

Key words: cysticercosis, T regulatory cells, *taenia crassiceps*, parasite.

La cisticercosis murina por *taenia crassiceps* es una parasitosis que puede desarrollarse en la naturaleza, por ingestión de huevos producidos por la forma adulta del parásito, y experimentalmente inoculación directa de cisticercos. Los roedores son los huéspedes naturales de la forma larvaria, que puede alojarse en el tejido subcutáneo, cavidad torácica y peritoneal del ratón¹. El desarrollo de la cisticercosis causada por *T. crassiceps* se ha explorado en particular en el peritoneo, donde el parásito puede multiplicarse por gemación polar múltiple²; esta propiedad se ha aprovechado para su reproducción en condiciones experimentales. Se han aislado diferentes cepas de *T. crassiceps* (ORF, WFU, HYG, KBS) a partir de cisticercos de ratones silvestres³⁻⁵. La más empleada, quizás por su rapidez capacidad de reproducción por gemación en la cavidad peritoneal de los ratones, ha sido la cepa ORF⁶⁻⁹, la cual perdió la capacidad de transformarse en taenia¹⁰ (figura 1).

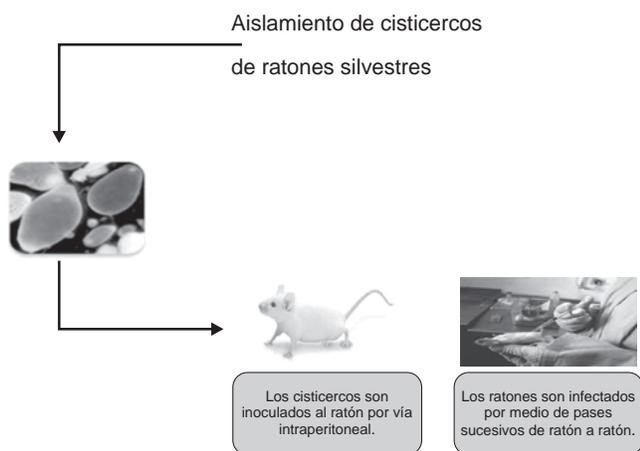


Figura 1. Modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*.

Este modelo de cisticercosis ha permitido estudiar diferentes aspectos de la parasitosis, desde los eventos inmunológicos que la acompañan^{7,9}, hasta la relevancia de componentes hormonales⁶ y genéticos^{8,11}. Las evidencias encontradas con el estudio de este modelo han orientado investigación de la cisticercosis humana y porcina, ambas causadas por *taenia solium*¹²⁻¹⁴.

Los cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium* presentan alta homología¹⁵, ambos estimulan al sistema inmune con una gran cantidad de antígenos complejos de origen protéico, glicoprotéico y lipídico¹⁶⁻¹⁸. Ambas infecciones tienen gran tendencia a la cronicidad, pudiendo el parásito vivir durante largos periodos dentro de su hospedero, sin destruirlo. Esta convivencia crónica implica una estimulación antigénica sostenida en un individuo inmunológicamente competente, con la posible activación de mecanismos inmunitarios tanto de tipo humoral como celular¹⁹⁻²¹. Los antígenos parasitarios estimulan preferentemente la activación de los linfocitos Th2 con la producción de citocinas IL4, IL5, IL10 e IL13. En la neurocisticercosis humana, causada por *T. solium*, se ha reportado la presencia de anticuerpos de los diferentes isotipos IgM, IgG e IgA²², siendo las IgE en el líquido cefalorraquídeo las que suelen asociarse con formas más graves de la enfermedad²⁰. Se ha descrito que los cisticercos vesiculares están inicialmente rodeados por una fina capa de colágena y un discreto infiltrado celular, en donde predominan células mononucleares, macrófagos, linfocitos T CD4⁺, eosinófilos y células plasmáticas. El inicio de la respuesta inmune contra el cisticerco se asocia con signos histológicos de destrucción y presencia de eosinófilos, por lo que se especula que éstos pudieran mediar la destrucción del parásito, en particular en el tejido muscular²³⁻²⁵.

En los últimos años ha ganado consenso la tesis de la relevancia de las células T reguladoras (Treg) en la modulación de la respuesta inmunoinflamatoria. Las Tregs son una subpoblación de linfocitos caracterizadas por el fenotipo CD4⁺, CD25⁺ y FOXP3⁺, capaces de controlar la respuesta inmune²⁶. Se han reportado numerosos mecanismos a través de los cuales las Tregs median el control de la inflamación.

La presencia de Tregs se ha reportado en parasitosis causadas por *trypanosoma*²⁷, *plasmodium*²⁸ y *T. solium*²⁹. En la cisticercosis humana, el papel de las células Treg parece estar relacionado con el control de la inflamación, que al mismo tiempo promueve el establecimiento del parásito y reduce los posibles daños al hospedero asociados con una inflamación exacerbada en respuesta a la parasitosis.

Este trabajo se diseñó con el propósito de conocer el papel de las células Treg durante la infección causada por el cisticerco de *taenia crassiceps* en ratones C57BL/6, y ahondar en la comprensión de mecanismos que participan en la regulación de la inflamación en la cisticercosis y su impacto en la relación huésped-parásito.

En este estudio experimental se utilizó el modelo de cisticercosis murina causado por *T. crassiceps* en una cepa restrictiva a la parasitosis (C57BL/6)^{8,30}.

En un inicio caracterizamos el fenotipo de células que infiltran la cavidad peritoneal, células de bazo, ganglios y placas de Peyer a diferentes tiempos después de la infección, y comparamos los resultados con un grupo control (sin infectar). Al mismo tiempo se analizó la capacidad proliferativa de los linfocitos a la estimulación con diferentes extractos antigénicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cisticercosis murina

Se emplearon ratones C57BL/6 hembras, de 4 a 5 semanas de edad. Los ratones fueron adquiridos y mantenidos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se formaron dos grupos, con 32 ratones en cada uno: el grupo A, control (no infectado) y el grupo B, infectado.

La infección se realizó por vía intraperitoneal con 20 cisticercos de 2 a 3 mm de diámetro por ratón. Ocho ratones de cada grupo se sacrificaron mediante una cámara de CO₂ a los 5, 30, 90 y 130 días posinfección. Se recuperaron células de bazo, ganglio mesentérico y peritoneo.

Linfoproliferación in vitro

Se obtuvo el bazo de cada ratón en ambos grupos experimentales. El bazo se maceró para obtener células. Se lisaron los glóbulos rojos empleando una solución de cloruro de amonio al 1%. Se resuspendieron 1×10^7 células de bazo en 1 mL de PBS suplementado con 10% de suero fetal bovino; las células se marcaron intracelular con CFSE a una concentración de 5 μ M. Después se incubaron a 37° C por 5 min, se realizaron tres lavados con 15 mL de RPMI con 10% de suero fetal bovino. Después, 1×10^5 células se estimularon con concanavalina A (ConA), 5 μ g/mL (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) o con Ag total de *T. crassiceps* (10 μ g/mL), empleando 200 μ L del medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Grand Island, New York, EE.UU.) suplementado con antibiótico (1%), 2-mercaptoetanol 50 μ M (Sigma-Aldrich) y suero fetal bovino (10%). Se cultivaron por 4 días. Al cuarto día se recuperaron las células y se marcaron con anticuerpos (fenotipo de células Treg) para identificar la población proliferativa. La adquisición y análisis de proliferación celular se realizaron en el equipo FACScalibur, y el análisis con el software *Cytometer Cell Quest* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.).

Fenotipificación de células Treg

El fenotipo de células Treg se realizó empleando 1×10^6 células del peritoneo, bazo y ganglios mesentéricos. Se emplearon los siguientes anticuerpos monoclonales para el marcaje extracelular: mouse anti-CD3 FITC (isotype Rat IgG2a k), mouse anti-CD4 (isotype Rat IgG2a k) Percp y mouse anti-CD25 (isotype IgG1) APC. Las células se incubaron con los anticuerpos por 30 min a 4° C. Después se incubaron con solución de permeabilización por una noche. Al día siguiente las células se lavaron, se realizó el marcaje intracelular con anti-Foxp3 (isotype IgG2a, k) PE. Todos los anticuerpos usados se adquirieron de eBioscience (San Diego, California, EE.UU.), se emplearon a la concentración recomendada por el fabricante. La adquisición de las muestras se realizó en el citómetro FACScalibur y los datos se analizaron con el programa *Cytometer Cell Quest* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, EE.UU.).

RESULTADOS

Niveles de Células T reguladoras en diferentes compartimentos

Se estableció el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y Treg en cuatro compartimentos diferentes: bazo, ganglios mesentéricos, placas de Peyer y peritoneo, en cuatro tiempos posteriores a la infección: 5, 30, 90 y 130 días.

Con respecto a los linfocitos CD4⁺, en el bazo se observó aumento de estas células a los 5, 90 y 130 días; en los ganglios mesentéricos se observó un aumento a los 90 días; en placas de Peyer a los 5 y 30 días, y en el peritoneo observamos un aumento a los 5 días de infección (figura 2).

Con respecto a los niveles de células Treg, se observó un aumento en bazo a los 90 días; en ganglios a los 5 días; en placas de Peyer a los 5 y 30 días, mientras que en el peritoneo no se observó aumento en el nivel de células con este fenotipo (figura 2).

Análisis de la respuesta proliferativa ante diferentes estímulos antigénicos

En este estudio se estableció el fenotipo de células que proliferan después de la estimulación específica e inespecífica. En las tablas 1 y 2 se muestra la respuesta proliferativa al estimular con antígenos de *T. crassiceps* y con ConA.

Los resultados mostraron que no hay respuesta proliferativa antígeno-específica. La falta de respuesta proliferativa no está asociada con la proliferación

prioritaria de células Treg. Simultáneamente se realizó estimulación con ConA, se observó que la proliferación celular de células CD4⁺ es similar entre individuos de control e infectados.

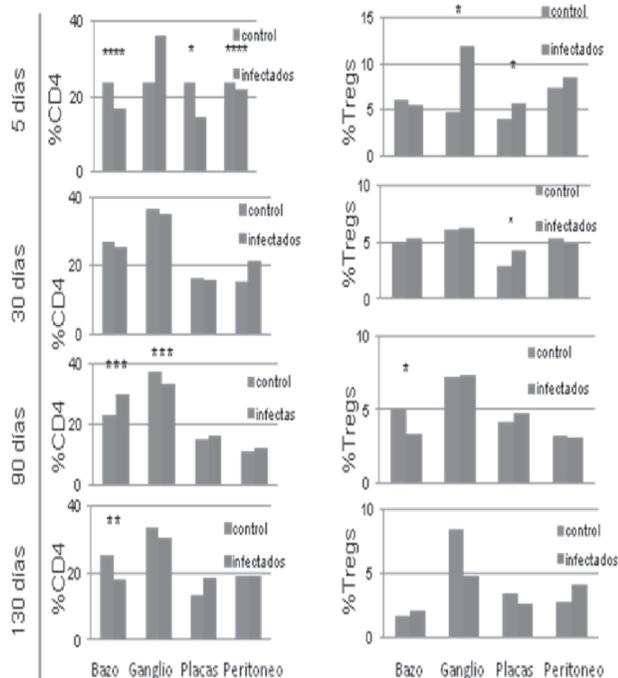


Figura 2. Análisis del fenotipo celular. Se observa el porcentaje de células T CD4 y Treg a distintos tiempos de infección: 5, 30, 90 y 130 días en el bazo, el ganglio mesentérico, las placas de Peyer y el peritoneo.

Tabla 1. Análisis de la respuesta proliferativa a antígenos de *taenia crassiceps*.

Grupo	Día	Proliferación total	Proliferación de T		
			CD4	% de T efectoras de CD4	% de Treg de CD4
Control	5	4.10 ± 0.93	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00
Infectado		3.61 ± 0.90	0.80 ± 0.08	0.04 ± 0.03	0.00
Control	30	4.10 ± 0.93	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00
Infectado		3.61 ± 0.90	0.08 ± 0.08	0.01 ± 0.00	0.00
Control	90	4.56 ± 0.51	0.29 ± 0.50	0.26 ± 0.49	0.00
Infectado		5.84 ± 5.72	0.26 ± 0.17	0.41 ± 0.34	0.00
Control	130	3.00 ± 1.17	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.05	0.00
Infectado		4.85 ± 2.25	0.15 ± 0.18	0.14 ± 0.14	0.00

DISCUSIÓN

El cisticerco de *T. crassiceps* puede modular la respuesta inmune a través de diferentes mecanismos. En este trabajo evaluamos el nivel de las células Treg en cisticercosis experimental murina utilizando una cepa restrictiva a la infección (C57BL/6). Los resultados muestran un aumento de células Treg en órganos del sistema inmune, pero no en el peritoneo, compartimento donde

Tabla 2. Análisis de la respuesta proliferativa a concavalina A.

Grupo	Día	Proliferación total	Proliferación de T		
			CD4	% de T efectoras de CD4	% de Treg de CD4
Control	5	32.45 ± 7.65	3.88 ± 1.78	2.63 ± 0.89	0.98 ± 0.83
Infectado		28.58 ± 0.39	4.59 ± 1.53	3.40 ± 1.46	1.01 ± 0.43
Control	30	38.89 ± 2.35	2.35 ± 0.81	2.11 ± 0.83	0.11 ± 0.06
Infectado		35.25 ± 9.50	4.27 ± 2.37	3.50 ± 1.91	0.27 ± 0.13
Control	90	54.67 ± 5.34	7.78 ± 2.30	5.59 ± 2.39	0.57 ± 0.14
Infectado		49.19 ± 6.71	8.02 ± 2.09	5.39 ± 1.55	0.70 ± 0.22
Control	130	44.52 ± 3.62	5.25 ± 3.09	4.60 ± 2.65	0.44 ± 0.33
Infectado		51.28 ± 5.16	7.34 ± 2.98	5.54 ± 3.46	0.60 ± 0.36

el parásito se instala y reproduce. Este aumento en órganos linfoides es compatible con la inducción de células Treg como parte de la respuesta inmune adaptativa que desarrolla el hospedero contra el parásito. La ausencia de células Treg en la cavidad peritoneal sugiere que estas células podrían no estar implicadas en instalación y supervivencia del parásito en la cepa resistente. Este hallazgo contrasta con lo observado en una cepa permisiva para la cisticercosis murina, BALB/cAnN, en la que las células Treg están aumentadas en el peritoneo (Adalid-Peralta, artículo en preparación). Las diferencias observadas entre ambas cepas nos permiten considerar que la presencia diferencial de Treg en el peritoneo podría estar asociada con la susceptibilidad a la infección. Es factible que las células Treg en la cepa susceptible controlen el fenómeno inflamatorio, permitiendo instalación y desarrollo del parásito en el hospedero. Mientras tanto, en la cepa resistente, los niveles basales de células Treg permitirían que la respuesta inmune controlara la infección parasitaria. Resultados similares se han observado en otras parasitosis, como en leishmaniasis y esquistosomiasis^{31,32}.

En el presente estudio no se encontraron cambios en el porcentaje de células Treg que proliferan inducidos por estímulo específico con ConA, un resultado compatible con la ausencia de células de memoria de este fenotipo asociadas a la infección.

CONCLUSIONES

La ausencia de un aumento de células Treg en el sitio de instalación del parásito sugiere que en la cepa C57BL/6 (resistente) la respuesta inmunoinflamatoria podría estar favoreciendo la eliminación del parásito.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo contó con el financiamiento de los proyectos de Conacyt Ciencia Básica 100708 y 167278, así como del proyecto DGAPA IN213911,

UNAM. Agradecemos a Carlos Castellanos Barba su apoyo técnica para la citometría de flujo y a Juan Francisco Rodríguez Ramírez por la corrección del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Kroeze WK, Freeman RS. *Taenia crassiceps*: fate of cysticerci following ingestion by the mouse. *Exp Parasitol* 1982;54:425-31.
2. Larralde C, Sciuotto E, Huerta L, Terrazas I, Fragoso G, Trueba L, et al. Experimental cisticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leiden* 1989; 57: 131-4.
3. Zurabian R, Aguilar L, Jimenez JA, Robert L, Willms K. Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. *J Parasitol* 2008;94:1-6.
4. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology* 2010;137:335-46.
5. Smith JK, Esch GW, Kuhn RE. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *Int J Parasitol* 1972; 2: 261-3.
6. Morales-Montor J, Escobedo G, Vargas-Villavicencio JA, Larralde C. The neuroimmunoendocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cisticercosis. *Curr Top Med Chem* 2008;8:400-7.
7. Terrazas LI. The complex role of pro- and anti-inflammatory cytokines in cisticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts. *Curr Top Med Chem* 2008; 8: 383-92.
8. Ramirez-Aquino R, Radovanovic I, Fortin A, Sciuotto-Conde E, Fragoso-Gonzalez G, Gros P, et al. Identification of loci controlling restriction of parasite growth in experimental *Taenia crassiceps* cisticercosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1435.
9. Sciuotto E, Fragoso G, Hernandez M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, et al. Development of the S3pvac Vaccine against Murine *Taenia crassiceps* cisticercosis: a historical review. *J Parasitol* 2013.
10. Smith JK, Parrish M, Esch GW, Kuhn RE. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda)-II. RNA and DNA synthesis in the ORF and KBS strains determined by autoradiography. *Int J Parasitol* 1972;2:383-9.
11. Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciuotto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cisticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998; 66:760-4.
12. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, et al. Immunodiagnosis of human cisticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med* 1990;114:926-8.
13. Jung H, Cárdenas G, Sciuotto E, Fleury A. Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Curr Top Med Chem* 2008;8:424-33.
14. Sciuotto E, Fragoso G, Hernández M, Rosas G, Martínez JJ, Fleury A, et al. Development of the S3pvac Vaccine against Porcine *Taenia solium* cisticercosis: a historical review. *J Parasitol* 2013.
15. Sciuotto E, Fragoso G, Larralde C. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. *Parasite Immunol* 2011; 33: 79-80.
16. López-Marín LM, Montrozier H, Lemassu A, García E, Segura E, Daffe M. Structure and antigenicity of the major glycolipid from *Taenia solium* cysticerci. *Mol Biochem Parasitol* 2002; 119: 33-42.
17. Tsai IJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Garcarrubio A, Sánchez-Flores A, Brooks KL, et al. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* 2013;496:57-63.
18. Esquivel-Velazquez M, Larralde C, Morales J, Ostoa-Saloma P. Protein and antigen diversity in the vesicular fluid of *Taenia solium* cysticerci dissected from naturally infected pigs. *Int J Biol Sci* 2011;7:1287-97.
19. Restrepo BI, Aguilar MI, Melby PC, Teale JM. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 366-70.
20. Chavarria A, Fleury A, García E, Marquez C, Fragoso G, Sciuotto E. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune-inflammatory profiles. *Clin Immunol* 2005;116:271-8.
21. Verma A, Prasad KN, Cheekatla SS, Nyati KK, Paliwal VK, Gupta RK. Immune response in symptomatic and asymptomatic neurocysticercosis. *Med Microbiol Immunol* 2011;200:255-61.
22. da SRV, Manhani MN, Costa-Cruz JM. IgA detection in human neurocysticercosis using different preparations of heterologous antigen. *Parasitol Res* 2010;107:221-5.
23. de Aluja A, Vargas G. The histopathology of porcine cisticercosis. *Vet Parasitol* 1988;28:65-77.
24. Perez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, de AA. *Taenia solium* cisticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res* 2002;88:150-2.
25. Alvarez JI, Colegial CH, Castano CA, Trujillo J, Teale JM, Restrepo BI. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J Neuroimmunol* 2002;127:139-44.
26. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490-500.
27. Wei G, Tabel H. Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis. *J Immunol* 2008; 180: 2514-21.
28. Hisaeda H, Maekawa Y, Iwakawa D, Okada H, Himeno K, Kishihara K, et al. Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat Med* 2004; 10: 29-30.
29. Adalid-Peralta L, Fleury A, Garcia-Ibarra TM, Hernández M, Parkhouse M, Crispin, JC, et al. Human neurocysticercosis: *in vivo* expansion of peripheral regulatory T cells and their recruitment in the central nervous system. *J Parasitol* 2011; 98: 142-8.
30. Fragoso G, Meneses G, Sciuotto E, Fleury A, Larralde C. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J Parasitol* 2008; 94: 551-3.
31. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks, DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 2002; 420: 502-7.
32. Wang X, Zhou S, Chi Y, Wen X, Hoellwarth J, He L, et al. CD4+CD25+ Treg induction by an HSP60-derived peptide SJMHE1 from *Schistosoma japonicum* is TLR2 dependent. *Eur J Immunol* 2009; 39: 3052-65.