



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE: MODELO MURINO DE
CO-INFECCIÓN *Taenia crassiceps-Toxoplasma gondii***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A:
DANAE BERENICE MENDOZA SÁNCHEZ

**DIRECTORA DE TESIS
DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA**



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO

2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
 SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
 CARRERA DE BIOLOGÍA

No. reg.: BIO/004/18

Los Reyes Iztacala a 09 de mayo de 2019

DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA
DIRECTORA DE LA FES IZTACALA
Presente

Atención: Lic. Eloy González Fernández
 Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS**
 Titulado "**POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE: MODELO MURINO DE COINFECCION**
Taenia crassiceps-Toxoplasma gondii"

Que presenta el (la) pasante de Biología **DANAE BERENICE MENDOZA SANCHEZ** número de
 cuenta: **414016154** Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las
 características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado,
 razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen
 profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DR.	LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES		Presidente
DRA.	GLORIA LUZ PANIAGUA CONTRERAS		Vocal
DRA.	MIRIAM RODRIGUEZ SOSA		Secretario
DRA.	ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA		Suplente
DRA.	MARITZA AURELIA OMAÑA MOLINA		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos
 aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la
 Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

JEFATURA DE CARRERA

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO

Dra. Patricia D. Davila Aranda
 Directora de FES Iztacala
 Vo. Bo.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
 DE MÉXICO
 FES IZTACALA



JEFATURA DE
 BIOLOGÍA



“La vie n’est facile pour aucun de nous. Mais quoi, il faut avoir de la persévérance, et surtout de la confiance en soi. Il faut croire que l’on est donné pour quelque chose, et que, cette chose, il faut l’atteindre coûte que coûte.”

La vida no es facil para ninguno de nosotros. Pero ¿y qué hay con eso?. Debemos tener la perseverancia y sobre todo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esta cosa debe ser lograda.

Madame Curie: A biography (1937) por Eve Curie Labouisse,
parte 2, p116.



DEDICATORIAS

A mi familia, por haberme enseñado tantas cosas con su ejemplo, con amor, consejos, y regaños y porque sin su apoyo no sería lo que soy ni hubiera llegado hasta aquí. Sé que no es mi máximo logro y que estarán ahí para ver lo que sigue.

Mamá, por inculcarme el valor del conocimiento y del estudio, por enseñarme el orden y tratar de hacer de mi mejor persona día a día. Sé que no es fácil todo por lo que has pasado y atesoro tu amor y esfuerzo por la vida.

Papá, por esforzarte por nosotros por tantos años, tratar de ser la mejor versión de ti y a pesar de cómo se fueron dando ciertas situaciones eso no quitará el lugar que tienes en mi y todo lo que te agradezco.

Hermanos, Ivan y Alan, por ser mis compañeros de vida y sé que puedo contar con ustedes no solo como hermanos sino también como amigos en cualquier situación. Deseo que lleguen a cumplir todos sus sueños y que lleguen a ser los mejores en lo que hacen y les apasiona.

A mis amigas de la prepa Gaby y Daniela, gracias por seguir estando aun cuando ya casi no nos vemos,

A mis amigos de la carrera, Aldo, Fer, Nalle y Gus, me da mucho gusto haberlos encontrado y sé que nada hubiera sido lo mismo sin ustedes, gracias por el magnífico equipo que armábamos y por los buenos ratos que tuvimos. Quiero verlos triunfar.

Ramiro, conocerte y conectar contigo fue una casualidad maravillosa que agradezco mucho a la vida, gracias por estar ahí cuando más lo necesitaba y por enseñarme tantas y tantas cosas. No tengo idea qué nos depare el futuro, pero lo nuestro por ahora me encanta.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de proyecto A1-S-10463, y por el programa de apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), número de proyecto IN209718 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

A la doctora Miriam, por haberme aceptado a pesar de la forma tan peculiar en la que entre a su laboratorio, gracias por su tiempo, por su paciencia, por apoyarme en el proceso de conocer cosas nuevas y abrir mis horizontes.

A la M. en C. Imelda, ya que sin sus conocimientos y su apoyo en lo experimental este trabajo no se hubiera realizado, además de ser una pieza importante en el laboratorio.

A Alexia, mi gemela malvada, gracias por haberte abierto a la oportunidad de conocernos y aunque somos muy diferentes hemos creado un lazo especial. Gracias por la compañía, las risas no solo en el laboratorio y el apoyo en mis experimentos

A Tona, gracias por los consejos, las pláticas de cualquier tema, las clases de inmuno y por todos los buenos ratos en el laboratorio. Espero verte triunfar como todo un doctor.

Y a todos los demás compañeros de laboratorio, Betsaida, Ulises, Marthita, Thalia, Dr. Oscar. Gracias por su ayuda en varios momentos y por hacer un ambiente agradable en el laboratorio, congresos y demás lugares.

Y gracias a todos aquellos que formaron parte en este proceso.

En memoria de:

Ricarda Rodríguez Gallegos

María Luisa Rojas Hernández

Siempre estarán en mi pensamiento...

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Inmunidad innata	1
1.2 Inmunidad adaptativa	2
1.3 Respuesta Th1	3
1.4 <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.4.1 Estadios	3
1.4.2 Ciclo de vida	5
1.4.3 Toxoplasmosis	7
1.4.4 Respuesta inmune	9
1.5 Respuesta Th2	10
1.6 <i>Taenia crassiceps</i>	11
1.6.1 Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	12
1.6.2 Epidemiología	13
1.6.3 Respuesta inmune a la infección por <i>T. crassiceps</i>	14
1.7 Co-infecciones helminto- <i>Toxoplasma</i>	15
2. JUSTIFICACION	17
3. OBJETIVO GENERAL	17
3.1 Objetivos particulares	17
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
5. MATERIALES Y METODOS	19
6. RESULTADOS	22
6.1 Parasitemia de <i>T. crassiceps</i>	22
6.2 Citocinas en infección primaria de <i>T. crassiceps</i>	23
6.2.1 Citocinas pro-inflamatorias	23
6.2.2 Citocinas anti-inflamatorias	24
6.3 Sobrevida de ratones infectados y co-infectados	25
6.4 Citocinas de ratones co-infectados	26
6.4.1 Citocinas pro-inflamatorias en la co-infección	26
6.4.2 Citocinas anti-inflamatorias en la co-infección	28
6.5 Tamaño de los bazos de diferentes grupos infectados y co-infectados	29
6.5.1 Peso de los bazos	31
6.5.2 Índice esplénico	32
6.6 Análisis histológico	33
6.6.1 Histología de bazo	33

6.6.2	Histología de hígado	36
6.7	Conteo de quistes de <i>T. gondii</i>	39
6.7.1	Quistes en bazo	39
6.7.2	Quistes en hígado	40
7.	DISCUSION	41
8.	CONCLUSION	47
	ANEXO	50

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Figuras	Pág.
1.	Micrografía de transmisión de electrones de un taquizoito de <i>T. gondii</i> .	4
2.	Bradizoito en quiste tisular.	5
3.	Quiste tisular en macerado de cerebro de ratón.	5
4.	Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .	7
5.	Respuesta inmune ante <i>T. gondii</i> .	10
6.	Mantenimiento de <i>T. crassiceps</i> en laboratorio.	12
7.	Ciclo de vida natural de <i>T. crassiceps</i> .	13
8.	Fotografía clínica de cisticercosis ocular, cisticerco con el escólex invaginado.	14
9.	Respuesta Th1 pro-inflamatoria inicial a <i>T. crassiceps</i> es rápidamente reemplazada por una respuesta Th2 anti-inflamatoria entre la tercera o cuarta semana de la infección.	15
10.	Plan de trabajo.	18
11.	Numero de cisticercos en la cavidad peritoneal de ratones infectados inicialmente con 15 cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en ratones hembras BALB/c.	22
12.	Concentración de citocinas pro-inflamatorias en suero de ratones BALB/c hembras infectados con 15 cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .	23
13.	Concentración de citocinas anti-inflamatorias en suero de ratones BALB/c hembras infectados con 15 cisticercos de <i>T. crassiceps</i> .	24
14.	Días de sobrevivencia de los ratones BALB/c hembras infectados con <i>T. crassiceps</i> y coinfectados con <i>T. gondii</i> ; y la sobrevivencia de los ratones control infectados únicamente con <i>T. gondii</i> o con <i>T. crassiceps</i> .	25
15.	Concentración de citocinas pro-inflamatorias a los siete días de los ratones co-infectados con <i>T. crassiceps-T. gondii</i> .	27
16.	Producción de IL-4 a los siete días post-co-infección con <i>T. gondii</i> .	28
17.	Fotografía representativa del tamaño de los bazos extraídos a los ratones de todos los grupos experimentales de infección y co-infección, sobre una base de papel milimétrico.	29

18.	Área de los bazos extraídos a los ratones sanos, infectados y coinfectados, sacrificados a los siete días, bazos medidos con el programa Image J 1.52 ^a .	30
19.	Peso de los bazos extraídos a los ratones sanos, infectados y coinfectados, sacrificados a los siete días.	31
20.	Índice esplénico de los ratones sanos, infectados con <i>T. crassiceps</i> o <i>T. gondii</i> , y co-infectados <i>T. crassiceps-T. gondii</i> .	32
21.	Fotografías representativas de vistas al microscopio con diferentes aumentos de tejido esplénico de roedores sanos.	33
22.	Fotografía representativa de microscopía óptica de bazo de roedor sano teñido con H&E a un aumento de 10x.	34
23.	Fotografías representativas de cortes histológicos de bazo de todos los grupos experimentales observado a diferentes aumentos en microscopio óptico.	35
24.	Micrografías de tejido hepático de roedor sano con tinción H&E en diferentes aumentos.	36
25.	Fotografías representativas de cortes histológicos de hígado de todos los grupos experimentales observado a diferentes aumentos en microscopio óptico.	38
26.	Fotografía representativa de un quiste de <i>T. gondii</i> en bazo.	39
27.	Numero de quistes de <i>T. gondii</i> en el bazo de ratones infectados y coinfectados.	39
28.	Numero de quistes de <i>T. gondii</i> en el hígado de ratones infectados y coinfectados.	40

ABREVIATURAS

Células dendríticas	CD
Células presentadoras de antígeno	CPA
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Factor de necrosis tumoral	TNF
<i>Fasciola hepatica</i>	<i>F. hepatica</i>
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	<i>H. polygyrus</i>
Inmunoglobulinas	Ig
Interferones	IFN
Interleucinas	IL
Linfocitos citolíticos naturales	NK
Linfocitos T citotóxicos	TCD8+
Linfocitos T cooperadores	TCD4+
Linfocitos Th vírgenes	Th0
Macrófagos	Mφ
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>
Organización mundial de la salud	OMS
Óxido nítrico	ON
Patrones moleculares asociados a patógenos	PAMPs
Respuesta inmune tipo Th1	pro-inflamatoria
Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	SIDA
<i>Taenia crassiceps</i>	<i>T. crassiceps</i>
<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>T. gondii</i>

RESUMEN

INTRODUCCION. La respuesta inmune incluye a un conjunto de células y proteínas que funcionan coordinadamente para proteger al organismo de patógenos. En este grupo se encuentran los linfocitos T helper (Th), los cuales se han clasificado en varios tipos por su funcionalidad. Dos de los principales son los linfocitos tipo Th1, que desarrollan respuestas inmunes inflamatorias; y los tipo Th2, que desarrollan respuestas inmunes anti-inflamatorias. Existe una gran incidencia de enfermedades parasitarias en países en vías de desarrollo, entre ellas los helmintos y los parásitos intracelulares son agentes etiológicos importantes. La coexistencia de estos parásitos infectando un mismo hospedero es común, sin embargo, el impacto de este fenómeno en el sistema inmune es pobremente entendido.

OBJETIVO. Con el fin de acercarnos a entender el efecto que tiene la presencia de un helminto sobre el desarrollo de una infección por un parásito intracelular, en esta tesis estudiamos como influye la presencia del *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) en el curso de una segunda infección por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) y su influencia en la respuesta inmune Th1 y Th2 en diferentes momentos de coinfección.

METODOLOGIA. Para este fin, ratones hembras de fondo genético BALB/c de 6 a 8 semanas de edad se infectaron vía intraperitoneal con 15 cisticercos de *T. crassiceps*. En la semana 2, 4 y 8 post-infección con *T. crassiceps* los ratones fueron coinfectados vía intraperitoneal con 40 quistes tisulares de *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) cepa ME49 semivirulenta. Como controles se utilizaron ratones sanos o infectados únicamente con *T. crassiceps* o *T. gondii*. Se monitoreo la sobrevida de los ratones. Al día 7 de las co-infecciones se sacrificaron los ratones y se obtuvo suero, para la determinación de las citocinas TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4 y también se obtuvieron los hígados y bazos para observar su morfología, peso y determinar la presencia de quistes de *T. gondii*.

RESULTADOS. La infección inicial por *T. crassiceps* desde el inicio, hasta la semana 3, generó una respuesta inmune inflamatoria-Th1 con altos niveles de IL-12, TNF- α e IFN- γ ; en las semanas 4 a 5 se desarrolla un perfil mixto con la presencia de IFN- γ , IL-4 e IL-10, y subsecuentemente, en las semanas 6 a 10 se desarrolla un perfil anti-inflamatorio Th2 con la presencia de IL-4 e IL-10. Los ratones únicamente infectados con *T. gondii* y los coinfectados en la semana 2 tuvieron las más altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias (IL-12 y TNF- α), mientras que IL-4 se vio aumentada en todas las co-infecciones. Se monitoreo la sobrevida de los ratones y el grupo de co-infección a las 4 semanas fue el que tuvo una sobrevida más larga. Después de la muerte se diseccionaron los bazos, se pesaron y midieron, los ratones del grupo de la co-infección a las 2 semanas fueron lo que mostraron pesos y medidas más grandes, comparados con la infección solo con *T. gondii* y las demás co-infecciones. De la misma forma se estableció la esplenomegalia al calcular el índice esplénico, e igualmente el grupo con índice esplénico

más alto fue el coinfectado en la semana 2. En los cortes histológicos se observó que la infección con *T. gondii* generó daños severos en el espacio pulpar del bazo, mientras que el tejido hepático presentó necrosis, infiltrado celular e inflamación. Los daños disminuyeron en los grupos de las co-infecciones a las 4 y 8 semanas. Ambos tejidos, hepático y esplénico, alojaron más quistes en la infección de *T. gondii* comparados con las co-infecciones. CONCLUSION, los datos obtenidos en este trabajo indican que la polarización de la respuesta mediada por células es modulada por la infección previa por el helminto *T. crassiceps* y afecta de manera diferencial a la respuesta inmune a la infección por *T. gondii* de una manera dependiente del tiempo de la co-infección.

ABSTRACT

INTRODUCTION. The immune response includes all cells and proteins subsets working to protect the organism against pathogens. Into these group we found the T helper lymphocytes (Th), classified in several subsets by their functionality. Two principal subsets are Th1 that encompasses pro-inflammatory immune response and type Th2 developer of anti-inflammatories answers. Great parasitic infections incidences exist in developing countries, among them, helminths and intracellular parasites are important etiologic agents, the coexistence of these two parasites infecting same host is common, nevertheless, the phenomenon impact in the immune system is poorly understood. **AIM.** For come closer to understand the effect of helminth presence in the course in a secondary infection by an intracellular parasite, in this thesis we studied the *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) presence influence in a second infection curse by *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), and the influence on immune response type Th1 and Th2 in different times the co-infection. **METHODOLOGY.** For this purpose, 6-8 week-old female BALB/c mice were infected by 15 cysticerci of *T. crassiceps* ORF strain by intraperitoneal (i.p.) injection. At weeks 2, 4 and 8 *T. crassiceps*-post infection, the mice were coinfecting with 40 tissue cyst of *T. gondii* ME49 semi virulent strain by intraperitoneal injection. The survival was monitored. Controls, were healthy mice, or only *T. crassiceps*, *T. gondii* infected. At day 7 post-coinfection the mice were sacrificed and bleed, to extract sera for TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-4 cytokine determination, additionally, dissect the spleen and liver to observe morphology, weigh and determinate tissue cyst presence. **RESULTS.** The initial *T. crassiceps* infection from de beginning until week 3, the infection developed a pro-inflammatory profile Th1 with high levels of IL-2, TNF- α and IFN- γ , in the weeks 4-5 developed a mixed profile with IFN- γ , IL-4 and IL-10, and subsequently, in the 6-10 weeks switch to an anti-inflammatory profile Th2 as IL-4 and IL-10, The *T. gondii* infection and co-infection at 2 weeks showed the greatest pro-inflammatory cytokines (IL-12 and TNF- α) production in mice. While in all coinfections IL-4 was increased. Next, we monitored the mice survival and the coinfection at week 4 had time longer survival. After mice death, the spleen was dissected, weighed and measured, the coinfection at 2 weeks infected group was heaviest and biggest compared to others co-infections and only *T. gondii* infected. In the same way the splenomegaly was established calculating the splenic index, the co-infection at week 2 showed the greatest splenic index. Lastly, in the histological sections we observe that *T. gondii* infection induced severe tissue damage in the pulpar space of spleen, likewise, the hepatic tissue showed necrosis, cellular infiltrate and inflammation. In the co-infected at week 4 and 8, the damage decreased. Both tissues, spleen and liver, harbored more cysts in *T. gondii* infection compared to coinfections. **CONCLUSION.** The data obtained in this research indicates that response

polarization cell-mediated is previous infection-modulate by helminth *T. crassiceps* and it affects differentially to immune response against *T. gondii* infection in a time-dependent manner of coinfection.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune protege al individuo de las amenazas que puedan provenir de la gran diversidad de organismos y sustancias en su entorno; al conjunto de acciones de este sistema se le conoce como respuesta inmune [6].

La respuesta inmune es el reconocimiento, evasión y erradicación de los componentes de microbios, macromoléculas como polisacáridos y proteínas, además de pequeñas sustancias que son reconocidas como extrañas, independientemente de su posible efecto en el hospedero [7]. Esta respuesta depende de la acción coordinada de las células y moléculas que conforman el sistema inmune[8], que puede ser visto como dos “líneas de defensa”, la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa, determinadas por la velocidad y especificidad de reacción [9].

1.1. Inmunidad innata

Es la primera línea de defensa que preexiste en el hospedero en un estado funcional completo antes de la infección y que pueden responder de manera inmediata para proteger al hospedero de cualquier infección posible [7] [6].

Está compuesta por 1) barreras físicas como el epitelio y las sustancias que produce; 2) barreras proteicas como citocinas que regulan y coordinan la actividad de las células; 3) células fagocíticas como neutrófilos y macrófagos ($M\phi$); 4) células presentadoras de antígeno (CPA) como las células dendríticas (CD), $M\phi$, basófilos, neutrófilos y linfocitos citolíticos naturales (NK), que tienen receptores específicos y responden a estructuras o proteínas comunes en los grupos de microorganismos [6].

Esta respuesta no tiene memoria, pero es capaz de reconocer patrones de repetición de estructura molecular presentes en la superficie de bacterias, protozoarios y virus, conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del inglés Pathogen-associated molecular patterns) [8]. Además de ser capaz de reclutar células fagocíticas al sitio de infección por mediadores de inflamación, como interleucinas (IL) 6, 8, 12, interferones (IFN) de tipo 1 y factor de necrosis tumoral (TNF) [9]. Ambos, tanto los mediadores de inflamación como las CPA son las formas en que la inmunidad innata colabora con la respuesta inmune adaptativa.

1.2. Inmunidad adaptativa

Para combatir con eficacia la amplia gama de agentes patógenos con la que un individuo interacciona, los elementos de la inmunidad adaptativa han evolucionado para reconocer una gran variedad de antígenos provenientes de bacterias, virus y otros organismos que causan enfermedad [8].

La inmunidad adaptativa se desarrolla cuando la innata es insuficiente en la eliminación de agentes infecciosos, y cuando la infección ya se ha establecido [10], esto requiere de varios días, ya que necesita de la participación de las CPA para procesar y presentar antígenos del agente infeccioso a los linfocitos T y B para que lo reconozcan, se diferencien y posteriormente puedan convertirse en células efectoras [6]

A diferencia de la inmunidad innata, la adaptativa se caracteriza por presentar 1) memoria inmunológica, es decir, que se puede reconocer a un patógeno si este ya se ha presentado anteriormente; 2) diversidad, responder a una gran variedad de antígenos; 3) especificidad, capacidad para reconocer particularmente a cada antígeno reconocido; 4) especialización, diferenciación a varios tipos celulares dependientes del estímulo [6] [7].

La inmunidad adaptativa se divide en dos tipos que actúan en conjunto para proteger al hospedero, la humoral y la celular. La respuesta inmune humoral está mediada por las células B encargadas de sintetizar anticuerpos específicos, estos sirven para neutralizar toxinas, prevenir que organismos se adhieran a superficies mucosas, activan el complemento, opsonizan bacterias para facilitar la fagocitosis y sensibiliza células tumorales e infectadas, o para ataque dependiente de anticuerpos por parte de los linfocitos NK. Así los anticuerpos actúan mejorando los elementos del sistema innato [7], además de participar en la presentación de antígenos; mientras que la respuesta inmune celular depende en gran medida de las células T [10]. Su principal función es amplificar la respuesta inmune celular, colaborando en la activación de diversos tipos celulares mediante la secreción de citocinas, que a la vez participan en el desarrollo de cada subtipo celular [7].

El tipo de célula T depende del estímulo que reciba por parte de las CPA, estas se diferencian en linfocitos T citotóxicos (TCD8+) y cooperadores (TCD4+ ó Th, del inglés helper). Los linfocitos Th se pueden diferenciar en varios subgrupos funcionales, los más ampliamente estudiados son Th1 o Th2, caracterizados, además de sus funciones, por su perfil de citocinas [6].

1.3 Respuesta Th1

La respuesta inmune tipo Th1 (pro-inflamatoria) se presenta contra patógenos como virus, bacterias y parásitos intracelulares, además de eliminar células cancerosas [11], con la participación de las CD, M ϕ y linfocitos NK [10].

Ésta respuesta se caracteriza por la producción de ciertas citocinas como interferón gamma (IFN- γ) que promueve una mayor diferenciación hacia este subgrupo de células e inhibe la diferenciación de los linfocitos Th vírgenes (Th0) a Th1 [12]. Además de la producción de IFN- γ , los linfocitos producen interleucinas (IL-) 8, IL-10, IL-12 [6]. La IL-12 es posiblemente la más potente es liberada por CD y otras CPA, promueve la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos NK, lo que refuerza la polarización hacia este tipo de respuesta, lo que genera un “loop” autocrino [11].

También se producen otros mediadores inflamatorios como óxido nítrico (ON) por parte de los M ϕ para la eliminación de patógenos intracelulares [13].

Entre los patógenos que se ha identificado inducen este tipo de respuesta Th1 se ha descrito el parásito intracelular *Toxoplasma gondii* [14].

1.4. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) es un parásito intracelular obligado, perteneciente al filo Apicomplexa, clase Esporozoa y Subclase Coccidia [15]) que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo y comúnmente infecta a vertebrados de sangre caliente como animales domésticos, de compañía, salvajes e inclusive a humanos [16], normalmente a través de comida contaminada [17].

Este parásito muestra diferentes formas celulares de diferenciación dependiendo de la etapa de su ciclo de vida, tales formas son: 1) Ooquiste, 2) Taquizoito, 3) Bradizoito, 4) Esporozoito y 5) Quiste tisular; estadios que tienen importancia desde el punto de vista de transmisión de la enfermedad y de los mecanismos de invasión por este organismo [15].

1.4.1 Estadios

El ooquiste es el estado clave en la epidemiología de *T. gondii*, exclusivamente producido en el intestino delgado de los miembros de la familia de los gatos que liberan en sus heces como ooquistes inmaduros no esporulados, con lo que contaminan fuentes de agua y suelo [18].

El esporozoito es resultado de la fase de reproducción sexual [3], se desarrollan a partir de los quistes no esporulados en las heces de los gatos que con las condiciones adecuadas de temperatura y humedad ocurre un proceso de diferenciación celular que conduce al estado de ooquiste maduro esporulado que contiene a los esporozoitos [15]; que al igual que los bradizoitos y taquizoitos son infecciosos [3, 19].

El taquizoito (figura 1) (del griego tachos=rápido), para describir el estado de rápida multiplicación en cualquier célula [3], es la forma infectiva asexual [20] que puede infectar casi a todas las células nucleadas y su replicación representa la etapa aguda de la infección o la reactivación de una infección latente [18], es caracterizado por su forma arqueada o de media luna, se desarrolla a partir de los ooquistes y los quistes tisulares y son también ampliamente utilizados en laboratorio [21].

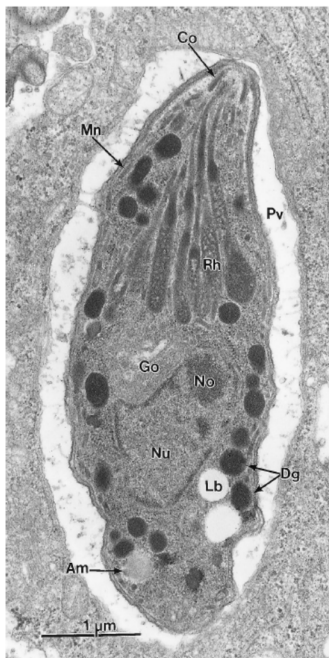


Figura1. Micrografía de transmisión de electrones de un taquizoito de *T. gondii* mostrando los organelos de la célula, en un exudado de células peritoneales. Co, conoide; Dg, gránulos densos; Go, complejo de Golgi; Mn, micronema, No, nucleolo; Nu, nucleolo, Pv, vacuola parasitofora; Rh, roptria [3]

El bradizoito (figura 2) (del griego brady= lento) es el estadio de multiplicación lenta del parásito dentro de los quistes tisulares [3] que persiste durante toda la vida del hospedero, el quiste se asocia con la etapa crónica de la infección, pero se conoce que la formación de quistes comienza desde los 3 días post-infección [20].

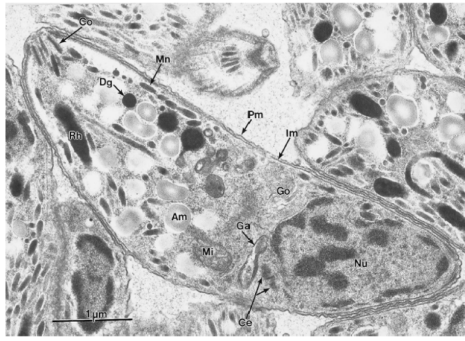


Figura 2. Bradizoito en quiste tisular, macrófago de ratón infectado con *T. gondii*. Am, amilopectina; Ce, centriolos; Co, Cconoide; Dg, granulos densos, Go, complejo de Gondii; Mi, mitocondria; In, complejo membranar interior; Nu, núcleeo; Rh, roptria Tomada de [3]

Quiste tisular, colección de bradizoitos rodeados por una bien definida membrana de la célula del hospedero que pueden estar presentes en órganos [19] viscerales, incluidos los pulmones, hígado y riñones, son más prevalentes en el tejido muscular (esquelético y cardiaco), neural incluyendo cerebro y ojos [3]. Son la principal fuente de infección por medio de la ingestión de carne infectada. Los quistes tienen una forma redonda y pueden medir entre 5 y 70 μm pueden contener desde dos hasta varios miles de bradizoitos contenidos en una membrana (Figura 3) y persisten en los tejidos del hospedero durante toda su vida [22].

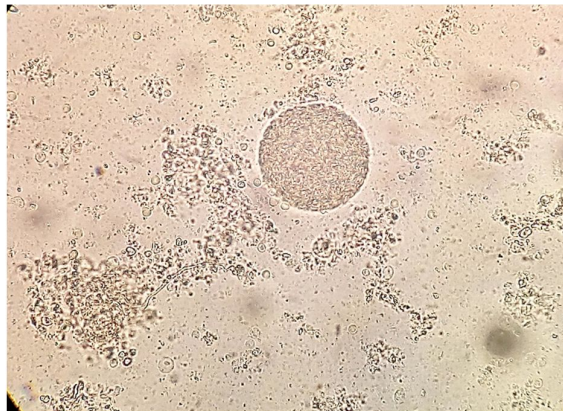


Figura 3. Quiste tisular en macerado de cerebro de ratón C57BL/6 a 10x en microscopio óptico (Unico). Imagen Original tomada en el laboratorio.

1.4.2 Ciclo de vida

T. gondii es un parasito complejo, es decir que desarrolla su ciclo de vida en dos tipos de hospederos, el definitivo y el intermediario [23].

El ciclo de vida inicia cuando el hospedero definitivo (felinos como el gato doméstico), ingieren mediante carnivorismo presas (por, ejemplo aves) en cuyos tejidos se

encuentran alojadas formas infecciosas conocidas como quistes tisulares que contienen bradizoitos en su interior. Al romperse el quiste tisular por las enzimas digestivas intestinales del felino se liberan los bradizoitos, que invaden a los enterocitos del intestino delgado, alojándose en una vacuola parasitófora intracelular, dentro de la cual se diferencia el parásito a sus formas sexuales que son el microgameto y el macrogameto o célula femenina y el microgameto o forma masculina. El microgameto fecunda al macrogameto dando como resultado la formación de cigoto, esta fase genera una cubierta quística rígida conocida como ooquiste.

El ooquiste inmaduro se separa del epitelio intestinal y es liberado en las heces del gato, que con las condiciones adecuadas de humedad y temperatura entre 1-5 días se llevará a cabo un proceso de endiogenia en el que se dará lugar a aproximadamente 8 esporozoitos dentro del ooquiste [15].

Una vez que el ooquiste se encuentre maduro esporulado puede ser infeccioso en el ambiente (suelo y reservorios de agua) por largos periodos, desde meses hasta años, inclusive pueden ser diseminados mecánicamente del suelo por insectos como moscas, cucarachas, escarabajos y gusanos hacia la comida como hortalizas y legumbres, puede ser encontrado en las heces de los gatos domésticos y entrar en contacto con el humano en la rutina de limpieza, aunque la principal forma de infección es a través de los quistes tisulares (Fig. 1) en la carne de mala calidad poco cocinada [19, 22]; que cualquier animal de sangre caliente puede ingerir y resultar infectado con esto *T. gondii* comienza su ciclo de reproducción asexual en el hospedero intermediario [15].

El ciclo de reproducción asexual comienza cuando el ooquiste se rompe y se liberan los esporozoitos infectivos que invaden el epitelio intestinal para posteriormente diferenciarse a taquizoitos, que dejan el epitelio intestinal mediante la destrucción de los enterocitos y atraviesan la barrera de la lámina basal alcanzando el sistema sanguíneo, una vez en la sangre se esparcen a través del cuerpo del hospedero por medio de los Mφ residentes y linfocitos, así como también libremente en el plasma [15, 20].

Los taquizoitos continúan dividiéndose dentro de las células del hospedero por endiogenia (división interna en dos) hasta que las células están llenas de parásitos. En algún tiempo dado los taquizoitos no pueden ser contenidos dentro de la célula del hospedero y esta explota, liberando a los taquizoitos que buscan nuevas células del hospedero para repetir el proceso [24] (Figura 4).

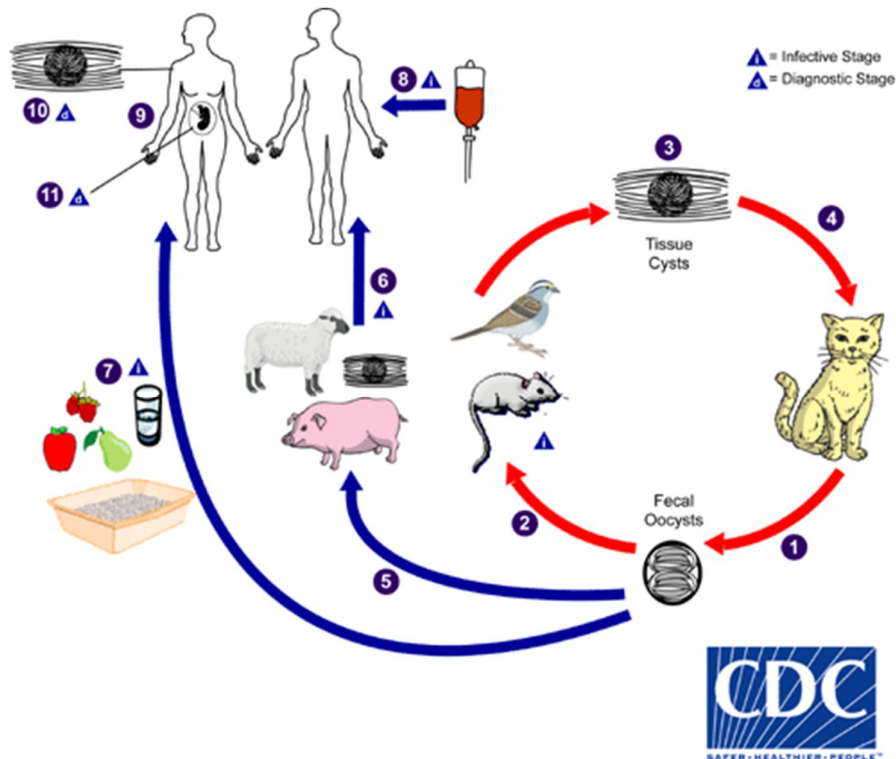


Figura 4, Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*- 1) En el hospedero definitivo (gato) se lleva a cabo la fase de reproducción sexual con lo que libera oocistos en las heces, 2) los oocistos son ingeridos por los hospederos intermediarios pequeños (principalmente roedores y aves), 3) que desarrollan quistes tisulares y es la fase de reproducción asexual del parásito, 4) el hospedero definitivo se alimenta de los hospederos intermediarios e ingiere los quistes tisulares que se diferenciarán en el tracto digestivo para posteriormente depositar heces infectadas con oocistos en el ambiente. 5) El humano se puede contagiar de varias formas 6) por medio de carne infectada con quistes tisulares, 7) por medio de agua y el contacto con las heces (cajas de arena de gatos domésticos), 8) por medio de transfusiones sanguíneas, 9) de forma transplacentaria de la madre al feto, 10) como en los demás hospederos intermediarios en el humano se generan quistes tisulares y el diagnóstico se lleva a cabo por medio de serología y biopsia, 11) el diagnóstico de la infección congénita puede lograrse usando métodos de biología molecular para detectar material genético de *T. gondii* en el líquido amniótico (CDC,2015)

1.4.3 Toxoplasmosis

T. gondii es el agente causal de la toxoplasmosis que permanece de manera crónica y asintomática en 30-50 % de humanos [25]. Aunque la prevalencia de *T. gondii* varía ampliamente dependiendo del lugar. En Estados Unidos de América y el Reino Unido se estima que entre el 16 a 40% de la población se encuentra infectada, mientras que en Centro y Sud-América y en Europa continental se estima un rango de infección entre 50 y 80%. La mayor parte de las infecciones en humanos son asintomáticas [22] excepto en individuos inmunocomprometidos donde causa severos síntomas y aumento considerable en la mortalidad [17].

La importancia de *T. gondii* en humanos también se refiere a los riesgos de la infección durante el embarazo, debido a que el parásito puede atravesar la placenta e

infectar al feto aun cuando la madre sea asintomática. La infección con *T. gondii* antes del embarazo confiere o no un pequeño riesgo para el feto, excepto en mujeres que se infectaron hasta 3 meses antes de la concepción [26]. La infección congénita ocurre solo cuando la mujer se infecta durante el embarazo, las infecciones congénitas adquiridas durante el primer trimestre son más severas que las adquiridas durante el segundo y tercer trimestre [22]. En el neonato las manifestaciones de la toxoplasmosis congénita pueden incluir hidrocefalia, microcefalia, calcificaciones intracraneales, retinocoroiditis, estrabismo, ceguera, epilepsia anemia debida a sangrado interno y retraso mental y psicomotor, si no se trata la infección adecuadamente estos defectos neurológicos se hacen evidentes en la niñez o adultez temprana. Mientras que el riesgo de transmisión fetal es pequeño en la fase inicial del embarazo (menos del 6% de los casos), en el tercer trimestre el rango sube (entre 60% y 81% de los casos) y frecuentemente resulta en recién nacidos asintomáticos [27].

La toxoplasmosis es también una infección que puede permanecer en estado latente, ya que depende de la cepa de *T. gondii* con la que fue infectado el hospedero y la respuesta inmune del hospedero, los taquizoitos pueden encontrarse días o hasta meses después de la infección aguda [19], lo que la convierte en la mayor infección oportunista en condiciones de inmunosupresión tal es el caso de los pacientes de trasplantes de órganos, en estos pacientes la reactivación de una infección latente puede resultar en encefalitis toxoplásmica, que es potencialmente fatal si no es tratada adecuadamente [28]. Esta infección tiene uno de los rangos más altos dentro de las enfermedades que pueden llevar a la muerte a pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y con virus de inmunodeficiencia adquirido (VIH) [22]. Los pacientes infectados con VIH/SIDA presentan principalmente encefalitis, coriorretinitis y neumonitis o la infección por *T. gondii* diseminada. Pueden presentar la enfermedad de forma extracerebral con o sin encefalitis. La presentación más común puede ser la enfermedad ocular y pulmonar. Las manifestaciones pulmonares son similares a la neumonía. En pacientes con VIH/SIDA la toxoplasmosis puede ocurrir con fiebre y síntomas parecidos a la sepsis [29].

Los taquizoitos pueden infectar casi cualquier célula del hospedero y diseminarse a diferentes tejidos fácilmente, causando una infección aguda o primaria, además de la reactivación de una infección que permanecía latente en quistes tisulares en musculo esquelético y estriado, ojo, y sistema nervioso central [28]. Los quistes que contienen bradizoitos pueden transformarse en taquizoitos con el fin de prolongar el estado infectivo, lo que en individuos con VIH/SIDA, trasplantes u otra inmunosupresión significa una reactivación de la infección aguda y posibles graves consecuencias [15].

Se ha registrado que además de la ingestión de los quistes tisulares y la transmisión vertical de madre a hijo se ha reportado la posible infección por medio de transfusiones sanguíneas [30, 31].

1.4.4 Respuesta inmune

En el hombre la infección por *T. gondii* provoca alteraciones muy importantes en diversas subpoblaciones celulares del sistema inmune, en los casos de toxoplasmosis aguda sintomática se observa un aumento en el número de células TCD4+ y TCD8+, pudiendo persistir esta alteración durante varios meses, también se pueden observar un número elevado de células NK y de monocitos (Fig, 1) [32].

Se tiene una respuesta del tipo humoral con la producción de anticuerpos inmunoglobulinas (Ig) de los isotipos IgM, IgA e IgG, que, aunque son útiles para el diagnóstico de la parasitosis, no son inmunoprotectores. La aparición de anticuerpos IgM anti-*Toxoplasma* se observa entre 1 y 2 semanas después de la infección, alcanzan su máximo después de 2-3 semanas, y persisten durante algunos meses. Los anticuerpos IgG aparecen más tarde, 2 a 3 semanas después de la infección primaria, alcanzan su concentración máxima 2 meses después, persisten meses o años, y disminuyen después de algunos años. Se piensa que su papel es reducir el número de parásitos en la infección inicial con el fin de impedir una invasión masiva, o bien actuar en paralelo con la inmunidad celular para obtener una protección eficaz [15].

Por el lado de la respuesta inmune celular con la fagocitosis de *T. gondii* se activan las CPA, que producen IL-12 entre otras, con las que disparan la proliferación de células NK, TCD4+ y TCD8+ (Figura 5), que median la citotoxicidad y la producción de altas cantidades de IFN- γ (Sasai *et al*, 2018) y linfocitos con la liberación de diversas citocinas, la más importante para el ciclo de vida del parásito IFN- γ . Por razones que se desconocen, la presencia de IFN- γ , induce la diferenciación de los taquizoitos (que se encuentran proliferando intracelularmente) en bradizoitos con la transformación de la célula infectada en un quiste tisular. Los mecanismos involucrados en la formación del quiste tisular se desconocen, pero el quiste formado permanece en los tejidos por muchos años [33].

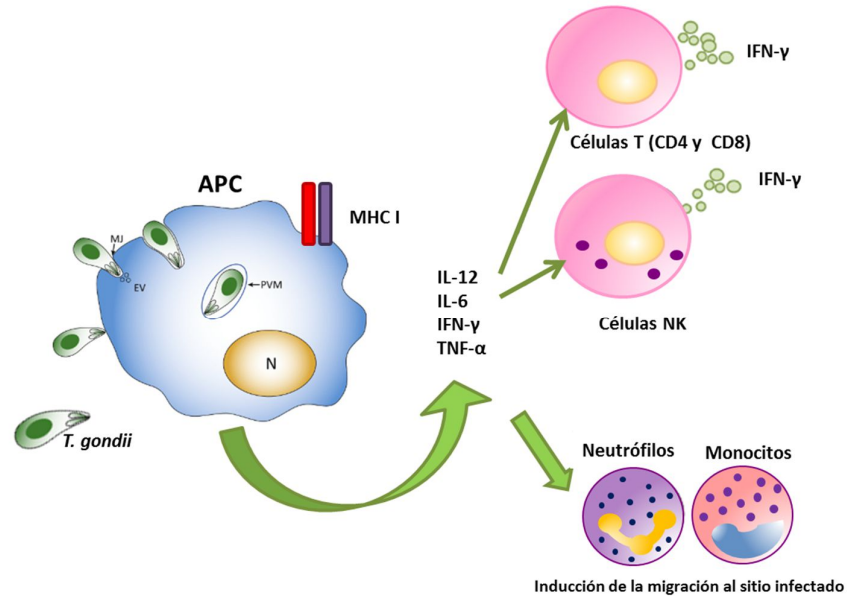


Figura 5. Respuesta inmune ante *T. gondii*. Reconocimiento de *T. gondii* por las células inmunes innatas que llevan a la activación de la inmunidad adquirida. Los Mφ y DCs producen varias citocinas y quimiocinas inflamatorias para promover la producción de IFN-γ por las células T y NK además del reclutamiento de neutrófilos y monocitos inflamatorios al sitio de inflamación. Modificado de [2].

En la fase aguda y crónica la replicación de los taquizoitos es controlada por IFN-γ y TNF-α, que activan las funciones de los Mφ [17]. En contraste las citocinas IL-10 e IL-12 parecen ser cruciales en la fase inicial de la infección y menos importantes durante la toxoplasmosis crónica [14]. A pesar de que el sistema inmune es usualmente suprimido por la producción de IL-10 producido por células T CD4+ reguladoras que mantienen la homeostasis, estas células deben ser activadas una vez que la infección ocurre. El número de células reguladoras es reducido durante la infección de *T. gondii* debido a la baja concentración de IL-12 en el sitio de infección, que es requerido para la inducción de la respuesta inmune Th1 (producción de IFN γ) contra *T. gondii*. Sin embargo, la inmunosupresión seguida de la activación es también un paso importante para prevenir la inmunopatología durante la infección de *T. gondii* [2].

1.5 Respuesta Th2

Para iniciar la respuesta inmune adaptativa, las células del sistema inmune innato deben adquirir antígenos y procesarlos hacia péptidos son presentados a las células T CD4+ vía moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés mayor

histocompatibility complex) clase II. Esto es ampliamente conocido, que los antígenos asociados a la diferenciación celular son adquiridos por la fagocitosis y procesamiento del patógeno invasor. Sin embargo, los patógenos asociados con la respuesta inmune tipo 2 son grandes y es poco probable que sean fagocitados y procesados por las CPA. Como los parásitos extracelulares y sus proteínas liberadas o excretadas [34].

Los helmintos y los alérgenos causan estímulos persistentes o repetidos en los linfocitos T, este tipo de respuesta inmune se caracteriza por la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que proveen las señales para la activación de las células B y la producción de anticuerpos [12, 13]. La diferenciación hacia este perfil celular Th2 es liderado por la IL-4 producida por las células T, aunque en algunas situaciones como las infecciones helmínticas, antes de que estas células la produzcan la IL-4 es producida por otras poblaciones celulares inmunes como los mastocitos, basófilos y eosinófilos que promueve la diferenciación hacia este subgrupo celular [6].

Las células Th2 regulan el cambio de células B a IgE a través de la producción de IL-4. Los complejos de IgE activan la respuesta inmune celular (incluidos basófilos y mastocitos, resultando en su degranulación). Los basófilos activados y los mastocitos secretan varios productos incluidos citocinas, quimiocinas, histamina, heparina, serotonina y proteasas, que resultan en la constricción de musculo liso, permeabilidad vascular y reclutamiento celular inflamatorio [35].

Los parásitos helmintos han desarrollado mecanismos complejos y versátiles para evadir la respuesta inmune de sus hospederos, utilizando estrategias inmunorreguladoras para evadir los mecanismos inmunes efectores. En general, estos procesos son necesarios para que los parásitos completen sus ciclos de vida y/o a favor de la sobrevivencia del hospedero. A pesar de su gran divergencia evolutiva en cuanto a estadios, ciclos de vida y mecanismos patogénicos e invasivos, los helmintos han desarrollado estrategias similares que inducen respuestas inmunes sorprendentemente similares, a lo que se llama la "estereotípica respuesta Th2" [5].

Una de las infecciones helmínticas que pueden desencadenar este tipo de respuesta antiinflamatoria es la infección murina con el parásito *Taenia crassiceps*.

1.6 *Taenia crassiceps*

Es un parásito cestodo cosmopolita endémico del hemisferio norte, incluyendo Europa, América del norte y Asia. Puede transmitirse y ser encontrado en una gran variedad de hospedadores en su forma adulta dentro del intestino delgado de carnívoros, roedores y

excepcionalmente en humanos [36], así como su estado larval (cisticerco) se reproduce de manera asexual y puede ser encontrado en músculos, cavidad peritoneal y pleural en roedores [5].

Los humanos son hospederos intermedios, normalmente la fase larval se desarrolla en el tejido subcutáneo, generando una afección llamada cisticercosis y a pesar de que, es rara se llega a presentar en humanos con alguna forma de inmunosupresión que han consumido agua o alimentos contaminados por heces de animales infectados [36]. Debido a la gran similitud antigénica entre los helmintos *T. crassiceps* y *T. solium* puede ser usada para diagnosticar por medio de pruebas inmunológicas la cisticercosis de *T. solium* en humanos [37]. Por su bajo costo y rápida producción de cisticercos en la cavidad peritoneal *T. crassiceps* ha sido usado en gran cantidad de experimentos como una fuente de antígenos y como modelo para estudios inmunológicos de la cisticercosis asociada a *T. solium* [37, 38]. La cepa ORF de *T. crassiceps* en la que se ha perdido el scolex produce larvas estériles, incapaces de desarrollar taenias adultas en el hospedero definitivo, lo que le llevado a ser ampliamente utilizada [39].

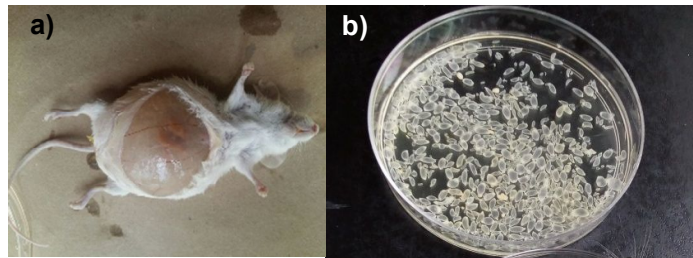


Figura 6. Mantenimiento de *T. crassiceps* en laboratorio. a) larvas (cisticercos) estériles de *T. crassiceps* dentro de cavidad peritoneal de ratón BALB/c; b) cisticercos extraídos. Imagen original tomada de experimentos realizados en el laboratorio.

1.6.1. Ciclo de vida de *T. crassiceps*

Se ha reportado que *T. crassiceps* tiene una de las más altas capacidades reproductivas entre las especies de invertebrados. Se han encontrado varias cepas en el hemisferio norte, en hospederos definitivos que incluyen a varios géneros de vertebrados como *Vulpes*, *Alopex*, *Canis*, *Mustela* y *Felis*, en ambientes naturales, así como en animales de laboratorio experimentalmente infectados, como, perros, gerbos, ratones y hámsters de laboratorio. En hospederos intermediarios, se presentan estadios larvales que han sido encontrados principalmente en roedores salvajes, y se han propagado extensivamente en ratones para el estudio de propiedades biológicas tanto en el estado adulto como en el larval [39].

El ciclo de vida natural los huevos son producidos por el helminto adulto localizado en el intestino de zorros, donde prolifera hasta convertirse en adulto y produce huevos infectivos que son liberados al ambiente por medio de las heces con las que los hospederos intermediarios entran en contacto e ingieren los huevos, las larvas se multiplican asexualmente en el hospedero intermediario y son ingeridas por el hospedero definitivo carnívoro donde crecen en el duodeno para comenzar el ciclo de nuevo (Figura 7). En algunos casos se ha visto que el parásito *T. crassiceps* logra establecerse en el humano de forma atípica, principalmente en extremidades como los brazos, este establecimiento del parásito se asocia a inmunodepresión en seis de cada diez casos [4].

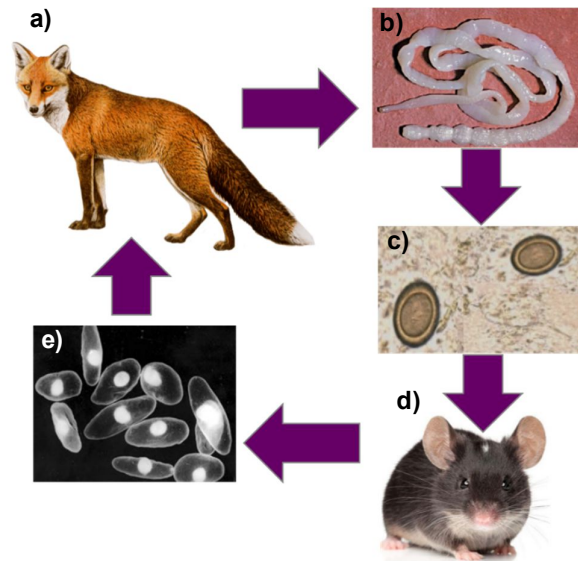


Figura 7. Ciclo de vida natural de *T. crassiceps*. a) hospedero definitivo; b) Gusano adulto en el intestino del hospedero; c) huevos producidos por el gusano adulto; d) Ingestión de huevos por el hospedero intermediario; e) Crecimiento de larvas en el hospedero definitivo que también son ingeridas por el hospedero definitivo carnívoro que alberga el crecimiento de las taenias en el duodeno, editado de [4].

1.6.2 Epidemiología

La cisticercosis por *T. crassiceps* no se da de manera natural en humanos. En individuos inmunocomprometidos se ha observado principalmente en los brazos y ojos (Figura 8), e infecta principalmente a adultos jóvenes o adolescentes [36].

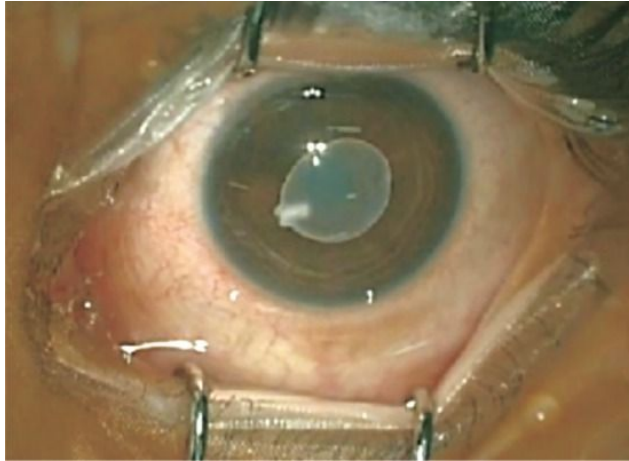


Figura 8. Fotografía clínica de cisticercosis ocular, cisticerco con el escólex invaginado. Tomado de [1].

Mientras que la cisticercosis relacionada a *Taenia solium*, afecta principalmente a la salud y sustento de comunidades ganaderas en países en vías de desarrollo en África, Asia y Latinoamérica. Esto también reduce el valor de cerdos y ganado en el mercado, y hace al cerdo inseguro para consumo. El número total de personas con neurocisticercosis, incluyendo casos sintomáticos y asintomáticos, se estima entre 2.56-8.30 millones. Por su parte la cisticercosis fue añadida a la lista de las mayores enfermedades tropicales desatendidas por la organización mundial de la salud (OMS, 2019)

1.6.3 Respuesta inmune a la infección por *T. crassiceps*

La infección murina por este parásito se caracteriza por una polarización de la respuesta inmune; en la etapa inicial de la infección un alto porcentaje de M ϕ aparecen secretando NO₂⁻ y conduciendo a las células T hacia una respuesta pro-inflamatoria Th1 transitoria, se producen citocinas asociadas esta respuesta inmune como (IFN- γ) IL-18, IL-10, IL-12, además de la producción de IgG2a; que restringen la reproducción de *T. crassiceps* y normalmente se asocian a infecciones parasitarias intracelulares [40], esto durante las primeras 2-3 semanas de la infección [5], cuando parece haber un control temporal del crecimiento de larvas [41].

La resistencia a este parásito depende del adecuado y rápido desarrollo de la respuesta Th1 inicial [5] pero conforme la infección progresa, la respuesta inmune se polariza hacia el tipo anti-inflamatoria Th2 con la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. *T. crassiceps* posee una inherente habilidad, o sus antígenos para inducir esta respuesta después de las tres o cuatro semanas posteriores a la infección, lo que se asocia a un ambiente permisivo para la sobrevivencia y reproducción del helminto [40]. Actualmente se

cree que las proteínas liberadas o excretadas durante el ciclo de vida del parásito son fagocitadas y presentadas a las células T CD4+ [34].

En resumen, *T. crassiceps* induce una respuesta pro-inflamatoria durante la fase inicial de la infección, dando lugar a una respuesta del tipo Th2 anti-inflamatoria en la fase crónica de la infección, asociada a la sobrevivencia de los parásitos (Figura 9).

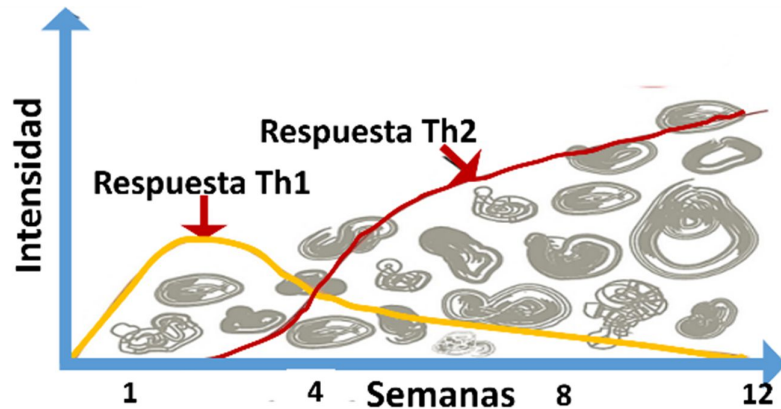


Figura 9. Respuesta Th1 pro-inflamatoria inicial a *T. crassiceps* es rápidamente reemplazada por una respuesta Th2 anti-inflamatoria entre la tercera o cuarta semana de la infección. Este giro está acompañado de un cambio en el fenotipo de M ϕ , además de la producción de citocinas, tomado de [5].

1.7 Co-infecciones helminto- *Toxoplasma*

El multiparasitismo es la regla en poblaciones de países tropicales y subtropicales. En particular las infecciones protozoarias y las infecciones helmínticas coexisten en este tipo de regiones.

A pesar de que las co-infecciones helminto-protozoario son comunes, las implicaciones de su coexistencia en la respuesta inmune del hospedero y el resultado de la enfermedad son escasamente entendidas [42].

La interacción que envuelve la respuesta inmunológica entre protozoarios unicelulares inductores de respuesta Th1 y helmintos multicelulares inductores de Th2 es compleja. Específicamente las co-infecciones *Toxoplasma-helmintos*, ya que estos dos parásitos ocupan diferentes nichos en el hospedero y provocan distintas respuestas inmunes; ya que estas respuestas pueden tener propiedades contrarreguladoras recíprocas [43].

Se ha visto que sin importar si la infección de un helminto como *Fasciola hepatica* es precedida o sucedida por la infección por *T. gondii*, existe un pequeño impacto en la

producción de citocinas Th1 (IL-12, IFN- γ y en la temprana activación clásica de M ϕ) inducidas por *T. gondii*. En contraste con la producción de citocinas Th2 específicas, como IL-4 e IL-5, que fueron suprimidas por la infección de *T. gondii*. Además del reclutamiento y activación alternativa de los M ϕ por *F. hepatica* fue bloqueado o revertida por la infección subsecuente con *T. gondii* [13].

Estudios previos han sugerido que los parásitos helmintos podrían tener influencia en el curso de la respuesta a *T. gondii*. Sin embargo no hay un consenso claro de los resultados de esta interacción.

Por ejemplo, en la co-infección con el helminto *Nippostrongylus brasiliensis*, sin importar el orden de infección (primero o simultáneo) no alteró el curso de la infección por *T. gondii* no se observó alteración en el desarrollo de la respuesta Th1 y tampoco en la patología. Los ratones co-infectados producían altos niveles de IL-12 e IFN- γ , murieron al mismo tiempo que los infectados únicamente con *T. gondii*. Mientras que los infectados únicamente con *N. brasiliensis* tuvieron una respuesta Th2 con alta producción de IL-4, IL-5; esto fue notablemente más bajo en los individuos co-infectados. En la co-infección en la que *T. gondii* fue inoculado antes que *N. brasiliensis* inhibió el desarrollo de la respuesta Th2 inducida por el helminto, y esto fue asociado con la alta cantidad de huevos de *N. brasiliensis*. De igual manera, la administración de lisado de *T. gondii* antes que la infección con *N. brasiliensis* también inhibió la respuesta Th2. Sin embargo, la respuesta Th2 inducida por *N. brasiliensis* fue incapaz de alterar la respuesta Th1 inducida por *T. gondii*, sin importar si la infección es simultánea o previa [43].

Por otro lado, la co-infección con el enteroparásito *Heligmosomoides polygyrus* en ratones previamente infectados con *T. gondii*, se observó que cada parásito suscitó la clásica respuesta relacionada: *T. gondii* una del tipo Th1 con altas concentraciones de IFN- γ , IL-12 y anticuerpos IgG2a, mientras que *H. polygyrus* una del tipo Th2 con alta producción de IL-4, IL-5, IL-13 y anticuerpos IgE e IgG1. Sin embargo, la respuesta Th2 mostró una notable reducción, en contraste la respuesta Th1 a *T. gondii* que no fue afectada por la infección del helminto. Con lo que se llegó a la conclusión que la infección previa de *T. gondii* limita la respuesta Th2 específica a *H. polygyrus*, mientras promueve la prevalencia de la respuesta Th1 (Ahmed *et al*, 2017).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que no hay un consenso claro de cómo influye la co-infección de un helminto sobre la respuesta inmune a *T. gondii*, nosotros estudiamos el efecto que tiene el helminto *T. crassiceps* sobre la respuesta inmune a *T. gondii* ME49 en diferentes momentos de co-infección, tomando en cuenta que podría haber diferentes grados de modulación de la respuesta inmune acorde al tiempo de pre-existencia de la infección por el helminto *T. crassiceps*. Para esto, nosotros examinamos cómo la infección aguda o crónica con *T. crassiceps* afecta el curso de la infección por *T. gondii*.

3. OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar el efecto que tienen el helminto *T. crassiceps* en la respuesta inmune a *T. gondii* en diferentes momentos de co-infección.

3.1 Objetivos Particulares:

- 1) Determinar la carga parasitaria de *T. crassiceps* en diferentes momentos de la infección en un modelo murino de infección.
- 2) Establecer el perfil de citocinas de la respuesta Th1 y Th2 en suero de los ratones infectados con *T. crassiceps* en diferentes momentos de la infección.
- 3) Co-infectar con *T. gondii* a las 2, 4, 8 y 12 semanas post-infección con *T. crassiceps*
- 4) Determinar el número de quistes de *T. gondii* alojados en cerebro de los ratones coinfectados en diferentes momentos.
- 5) Medir la cantidad de citocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias (IL-12, IL-10, IL-4, IFN- γ , y TNF- α) en suero a diferentes tiempos durante la co-infección *T. gondii*-*T. crassiceps*.
- 6) Observar efecto de las infecciones y co-infecciones en la morfología de bazo y determinar nivel de esplenomegalia.
- 7) Realizar tinción H&E y observar cortes histológicos para determinar daños en tejido de bazo e hígado ocasionados por las co-infecciones.
- 8) Contabilizar los quistes presentes en tejido de bazo e hígado.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

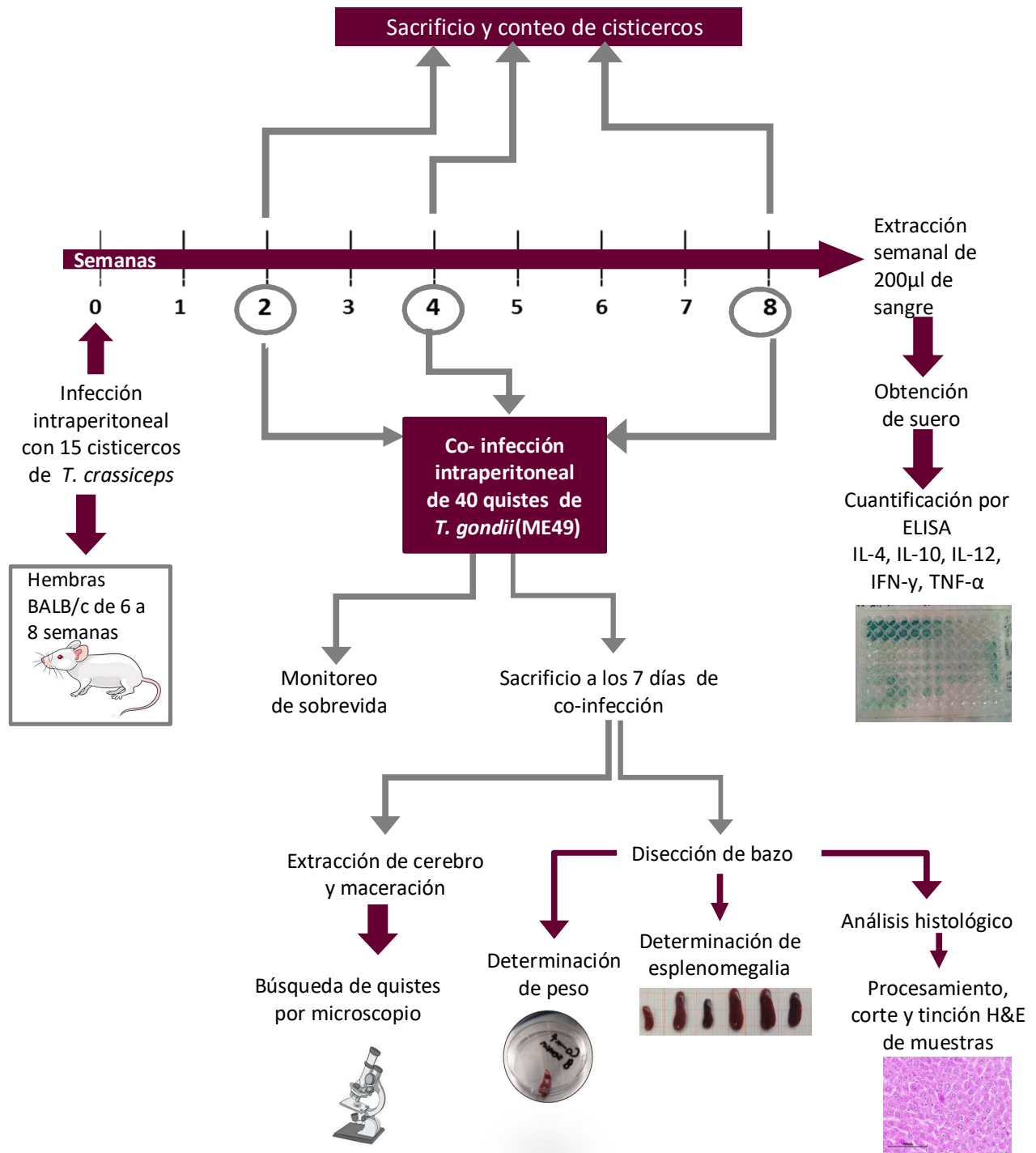


Figura 10. Plan de trabajo

5. MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembras con fondo genético BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Se mantuvieron en condiciones estándares de bioterio en la FES Iztacala.

Cisticercos de *T. crassiceps*.

Se obtuvieron los cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF de rápido crecimiento) de ratones stock que se han mantenido infectados por pasajes intraperitoneales subsecuentes en ratones BALB/c [44]. De cada grupo se sacrificaron dos ratones al momento de la co-infección para conocer la carga parasitaria (número de cisticercos) en la cavidad peritoneal. Para conocer la carga parasitaria se inyectaron 8-10 ml de solución salina (Pisa) en la cavidad peritoneal, posteriormente se separó y cortó la piel y el musculo con tijeras quirúrgicas dejando expuesto el peritoneo, el cual se seccionó para extraer la mayor cantidad de cisticercos y contabilizarlos en una caja Petri grande.

Parásitos de *T. gondii*

Cepa semi-virulenta ME94 mantenida en ratones C57BL/6 por medio de pasajes intraperitoneales consecutivos, parásitos obtenidos de macerado de cerebro de ratón C57BL/6 e inoculados por vía intraperitoneal a diferentes momentos (2, 4 y 8 semanas) de la infección previa de *T. crassiceps* [44].

Co-infección.

Infección con *T. crassiceps*. Los ratones se infectaron vía intraperitoneal con 15 cisticercos de 2 mm de diámetro sin brotes de *T. crassiceps* en 1ml de solución salina (Pisa), y se coinfectaron con 40 quistes de *T. gondii* en 200µl de solución salina (Pisa) la semana dos, cuatro y ocho. Como controles se utilizaron ratones únicamente infectados con 15 cisticercos de 2 mm de diámetro sin brotes de *T. crassiceps* y ratones únicamente infectados con 40 quistes de *T. gondii* en 200µl de solución salina (Pisa) y ratones sanos.

Obtención de suero.

Durante la co-infección los ratones fueron sangrados semanalmente. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Phillips) para inducir dilatación en la vena caudal. Se realizó un corte en la en la vena y se obtuvieron aproximadamente 500µl de sangre en tubos eppendorf. Los tubos fueron mantenidos inmóviles y a baja temperatura para hasta la formación de coágulos, para posteriormente centrifugarlos (ependorf 541B) a 2500 rpm

durante diez minutos dos veces. Se obtuvieron los sueros a -20°C hasta su utilización para determinación de citocinas.

Determinación de quistes de *T. gondii*.

Se contabilizaron los quistes a los ratones infectados por medio de observación al microscopio óptico (UNICO G380). Se sacrificó y extrajo el cerebro a los ratones, se llevó a cabo una maceración en 2mL de solución salina, dicho macerado se observó al microscopio en tres muestras de 10ul cada una tomada aleatoriamente a aumentos de 10x y 40x. Se contabilizaron por muestra, se obtuvo un promedio y se realizó la relación numérica a la cantidad total de muestra.

Determinación de citocinas en suero.

El suero obtenido previamente se descongeló y se utilizó para medir distintas citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , se utilizó el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) tipo sándwich conforme las indicaciones del fabricante. Brevemente, se sensibilizó con anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ l/ml (Reprotech) respectivo placas de 96 pozos Maxisorp toda la noche a 4°C. Se hicieron 3-5 lavados con PBS-Tween al 0.05% (Anexo1), se bloqueó con Blocking buffer (PBS-BSA al 1%) por 2 h, se lavó 3-5 veces con PBS-Tween, posteriormente se realizó una curva por duplicado con el anticuerpo recombinante (Reprotech) respectivo a una concentración inicial de 25000 pg/ml, se agregaron 30 μ l de suero a analizar en los demás pozos, se incubó toda la noche. Se lavó con PBS-Tween al 0.05%, y se agregó el anticuerpo biotinilado (Reprotech), se incubó a temperatura ambiente por dos horas. Se lavó con PBS-Tween al 0.05% se agregó streptoavidina (Biolegend) a una concentración de 1:4000, y se incubó por 45 min. Se lavó 3-5 veces con PBS-Tween al 0.05%, posteriormente se le agregó ABTS (Anexo 1) con H₂O₂ al 3%, se dejó desarrollar la reacción, se procedió a leer la placa a 405 nm en un espectrofotómetro para placa (EPOCH, BioTek).

Medición y pesaje de bazos.

Se extrajo el bazo a cada ratón co-infectado, o infectado. El bazo se lavó con PBS y se pesó en una balanza analítica (Ohaus TA302), se fotografió con una cámara digital (LG, 12MP), para después ser medido con el software de procesamiento de imagen digital ImageJ 1.52a en Windows 10, para obtener el área.

Análisis histológico

Se extirparon los bazos e hígados de los ratones y se fijaron en formol al 10% (Sigma-Aldrich) por 48 hrs. Posterior a esto se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno con

agua corriente para eliminar el fijador. Después se deshidrataron los tejidos en una serie de alcoholes, empezando con alcohol 70%, alcohol 80%, alcohol 96%, alcohol 96%, alcohol 100%, xilol (Anexo2). Se embebieron en parafina por 48 horas en un horno de convección por gravedad (BG-Pronalab H33BG) a 56°C y se incluyeron en Paraplast (Leica).

Posteriormente se realizaron cortes de 5µm en un micrótomo (Leica, modelo RM 2125RT). Los cortes se extendieron en un baño de flotación (Pathvicka modelo Bh601), se desparafinaron en un horno de convección por gravedad a 56°C (BG-Pronalab H33BG) y se realizó una tinción clásica con hematoxilina de Harris (Hycel) y eosina acidificada (preparada en el laboratorio) (H&E) Anexo 2.

6. Resultados

6.1 Parasitemia de *T. crassiceps*

Con la finalidad de conocer la carga parasitaria en las semanas dos, cuatro y ocho de los ratones infectados intraperitonealmente con 15 cisticercos de *T. crassiceps* se sacrificó y se diseccionó una parte de los ratones de los grupos experimentales. Se realizó un conteo de los cisticercos contenidos en la cavidad peritoneal.

En la figura 11 se puede observar que desde la semana dos hubo presencia de cisticercos en la cavidad peritoneal, un promedio de 23 cisticercos. En la semana 4 se observó una replicación moderada de los mismos que alcanzó un promedio de 218 cisticercos. Para las semanas subsecuentes de la infección, sobre todo de la semana 8 hubo una replicación exponencial de cisticercos que alcanzó en promedio dos mil cisticercos aproximadamente, y posteriormente en la semana 12 no se apreció una replicación tan elevada como en las semanas anteriores teniendo un promedio de aproximadamente 2500 parásitos.

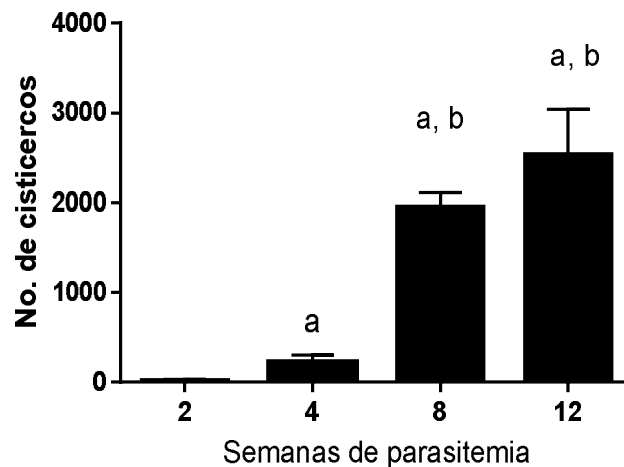


Figura 11. La carga parasitaria de *T. crassiceps* aumento conforme avanzaba la infección. Numero de cisticercos en la cavidad peritoneal de ratones infectados inicialmente con 15 cisticercos de *T. crassiceps* en ratones hembras BALB/c. * $p \leq 0.05$ a) comparado con la semana 2. b) comparado con la semana 4; prueba *t* de student. GraphPad software 6.

7.2 Citocinas en infección primaria de *T. crassiceps*

7.2.1 Citocinas pro-inflamatorias

Con el objetivo de establecer el perfil de citocinas durante la infección intraperitoneal de *T. crassiceps* en los ratones, se les extrajo sangre por medio de la vena caudal de forma semanal, desde la semana uno hasta la ocho post-infección. Se procesó para extraer el suero, con el que posteriormente se realizaron pruebas de Elisa sándwich para determinar la concentración de citocinas.

La respuesta pro-inflamatoria se pudo observar en las primeras semanas de la parasitemia de *T. crassiceps*. La citocina IL-12 (figura 12a) alcanzó su concentración más alta en la semana uno post-infección, y disminuyó en las semanas subsecuentes.

TNF- α (figura 12b) tuvo sus niveles más altos en la semana 3, y en las semanas posteriores bajo, para finalmente subir un poco en la semana 7. Finalmente, el IFN- γ (figura 12c) presento un aumento constante desde la semana uno hasta la semana 5, cuando alcanzó su máximo nivel. Disminuyó en la semana 6 y 7; y hubo un pequeño incremento en la semana 8.

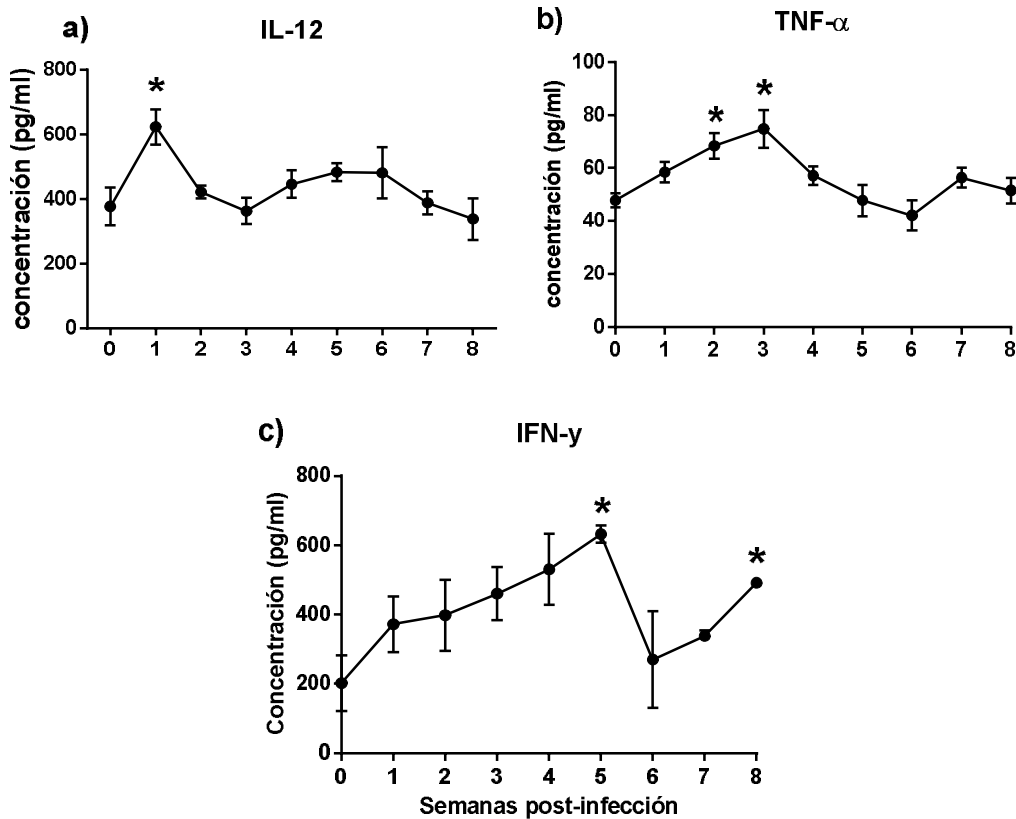


Figura 12. Los ratones infectados con *Taenia crassiceps* desarrollan un perfil de citocinas Th1 al inicio de la infección. Concentración de citocinas pro-inflamatorias en suero de ratones BALB/c hembras infectados con 15 cisticercos de *T. crassiceps*. a) IL-12; b) TNF- α ; c) IFN- γ . * $p < 0.05$ datos estadísticamente significativos con prueba de *t* de student, con respecto a la semana cero (no infectados). GraphPad software 6.

6.2.2 Citocinas anti-inflamatorias

La infección de *T. crassiceps* produjo una polarización de la respuesta inmune del tipo Th1 a Th2 conforme avanzó la infección.

En la figura 13a se muestra la concentración de IL-4 durante 8 semanas post-infección; en las primeras semanas, hasta la semana 5, se registraron niveles bajos de IL-4, y a partir de la semana seis se registró un aumento que fue creciendo hasta la semana 8 post-infección.

En la figura 13b se muestra la concentración de IL-10, en las primeras semanas post-infección, hasta la semana 4, no se observaron diferencias significativas con respecto a la semana cero de parasitemia. A partir de la semana 5 se observó un aumento significativo de esta citocina, y siguió aumentando en las semanas posteriores hasta la semana 8 post-infección.

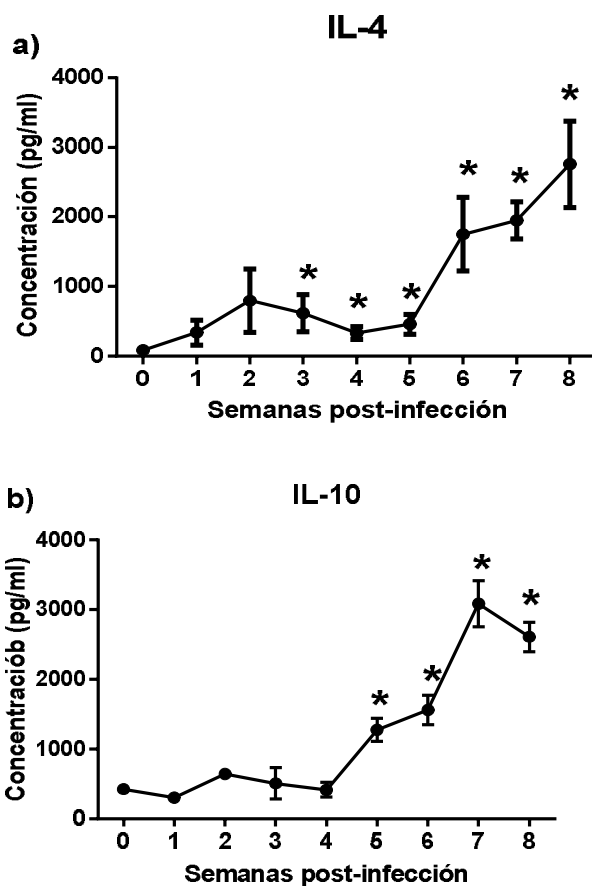


Figura 13. Los ratones infectados con *Taenia crassiceps* desarrollan un perfil de citocinas Th2 en la fase crónica de la infección. Concentración de citocinas anti-inflamatorias en suero de ratones BALB/c hembras infectados con 15 cisticercos de *T. crassiceps*. a) Producción de IL4; b) Producción de IL-10. * Resultados estadísticamente significativos con respecto a la semana cero, con *t* de student $p < 0.05$ respecto a semana 0 (no infectados). GraphPad software 6.

6.3 Sobrevida de ratones infectados y co-infectados

Se monitoreo la sobrevida de los ratones infectados con 15 cisticercos de *T. crassiceps* y co-infectados en diferentes momentos con 40 quistes de *T. gondii*.

Como se muestra en la figura 14, los ratones controles infectados únicamente con *T. gondii* tuvieron una alta mortalidad, ya que presentaban desde muy temprano síntomas de caquexia y murieron entre los días 6 y 7 post-infección con *T. gondii*.

El grupo co-infectado en la semana 2 sobrevivió uno o dos días más que el grupo control infectado solo con *T. gondii*, murieron entre el día 7 y 8.

El grupo co-infectado en la semana 4 prolongó la sobrevida, pues si bien, algunos individuos sucumbieron en el día 7 y otros en los días posteriores, el ultimo ratón sucumbió hasta el día 14.

Finalmente, el grupo co-infectado en la semana 8 tuvo una sobrevida que fluctuó entre los días 7-11.

Sobrevida de ratones infectados y co-infectados

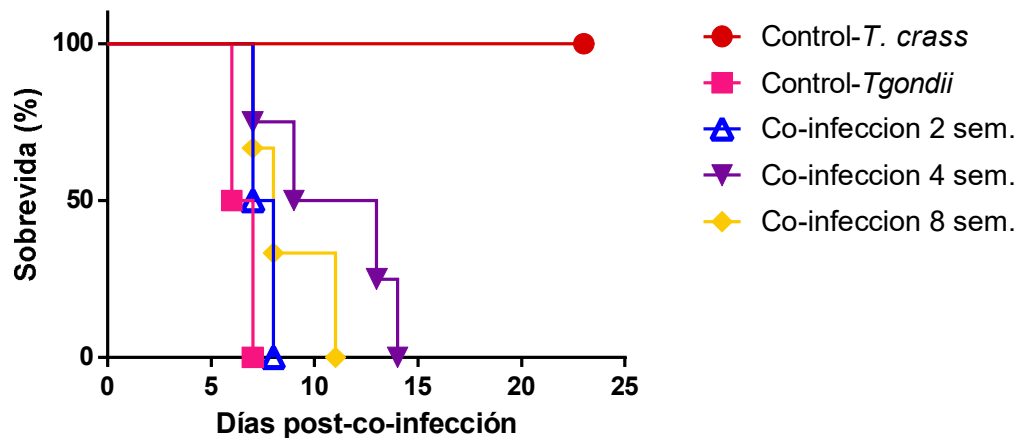


Figura 14. La pre-infección por 4 semanas con *Taenia crassiceps* prolongo la sobrevida de los ratones infectados con *T. gondii*. Se muestran los días de sobrevida de los ratones BALB/c hembras infectados con *T. crassiceps* y coinfectados con *T. gondii*; y la sobrevida de los ratones control infectados únicamente con *T. gondii* o con *T. crassiceps*. * $P < 0.05$ prueba Log-rak Mantel cox. GraphPad software 6.

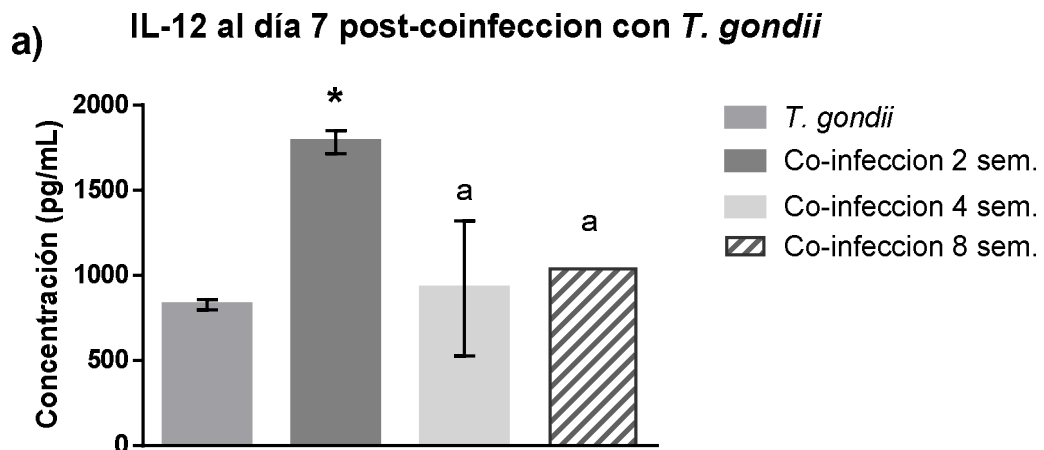
6.4 Citocinas en ratones co-infectados

6.4.1 Citocinas pro-inflamatorias en la co-infección

Dada la alta mortalidad de los ratones infectados con *T. gondii* y los co-infectados *T. crassiceps-T. gondii* en los primeros días pos-infección con *T. gondii*, se tomó como día de muestreo para la obtención del suero el día siete.

La producción de IL-12 a los 7 días pos-infección con solo *T. gondii* alcanzó niveles de alrededor de 800 pg/mL, mientras que en la co-infección a la semana 2, la concentración de esta citocina prácticamente se duplicó alcanzando niveles de alrededor de 1700 pg/mL. En las co-infecciones de las semanas 4 y 8, los niveles de esta citocina fueron muy similares a los observados en la infección con solo *T. gondii*, entre 800-1000 pg/mL (figura. 15a).

La producción de TNF- α a los 7 días post-infección con solo *T. gondii* alcanzó niveles de alrededor de 170 pg/mL. En la co-infección a la semana 2 los niveles de esta citocina fueron también de alrededor de 170 pg/mL, muy similares a la infección con solo *T. gondii*. Es importante destacar que en las co-infecciones de las semanas 4 y 8, los niveles de TNF- α disminuyeron significativamente respecto a lo observado en el grupo con solo *T. gondii* y en la co-infección de la semana 2. Esto sugirió que las co-infecciones en la semana 4 y 8 pudieron regular negativamente la producción de esta citocina (Figura 15b).



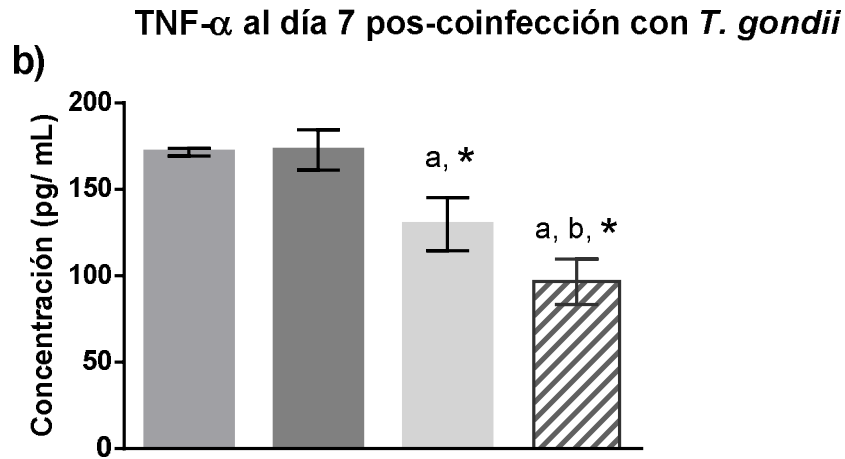


Figura 15. La co-infección en la semana 2 incrementó el perfil de citocinas pro-inflamatorias, mientras que las co-infecciones en la semanas 4 y 8 el perfil de citocinas pro-inflamatorias fue ligeramente menor respecto a la infección con solo *T. gondii*. Concentración de citocinas pro-inflamatorias a los siete días de los ratones co-infectados con *T. crassiceps-T. gondii*. a) IL-12; b) TNF- α . $p < 0.05$, * respecto al grupo infectado únicamente con *T. gondii*; a) respecto a la co-infección en la semana 2; b) respecto a la co-infección en la semana 4. Prueba ANOVA y Tukey, GraphPad software 6.

6.4.2 Citocinas anti-inflamatorias en la co-infección.

Se tomó como indicador del perfil anti-inflamatorio la citocina IL-4, se puede observar en la figura 16 que la producción en los ratones co-infectados a las 2 semanas que tuvieron una producción en promedio de 20 pg/mL, después los de la co-infección a las 4 semanas, seguido de los co-infectados a las 8 semanas, mientras la producción por parte de los infectados únicamente con *T. gondii* fue la más baja con un promedio de 20 pg/mL.

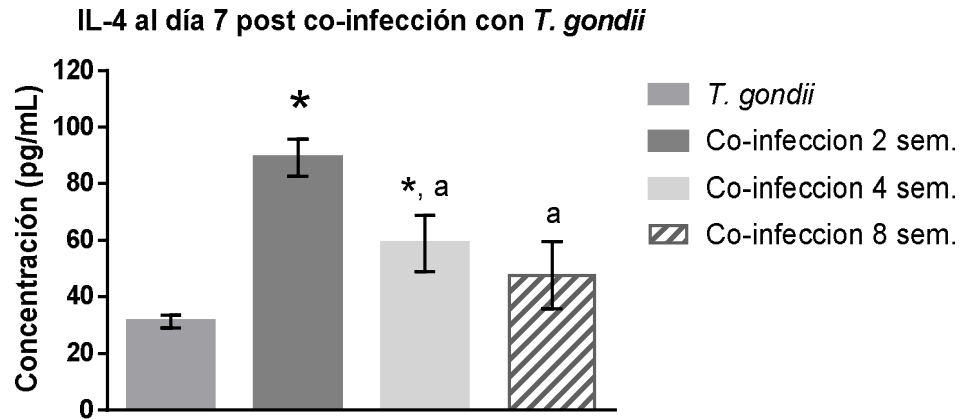


Figura 16. La presencia *T. crassiceps* previo a la infección con *T. gondii* favorece la producción de IL-4. Producción de IL-4 a los siete días post-co-infección con *T. gondii*. $p < 0.05$, * respecto al grupo infectado únicamente con *T. gondii*; a) respecto a la co-infección en la semana 2. ANOVA y Tukey. GraphPad software 6.

6.5 Tamaño de los bazos de los diferentes grupos infectados y co-infectados

El bazo es esencial para la respuesta inmune tanto para la infección por *T. crassiceps* como para la infección por *T. gondii*. El crecimiento del bazo se utiliza comúnmente como un indicador de la intensidad de la respuesta inmune celular. A los siete días post-co-infección con *T. gondii* se llevó a cabo una disección y extracción de bazo de los ratones infectados y co-infectados, se fotografiaron y se midieron en el programa Image J 1.52a en Windows 10 para calcular el área de los mismos.

Como se puede apreciar en la figura 17 el tamaño del bazo de un ratón sano corresponde al más pequeño, su tamaño promedio fue de 1.5 cm de largo x 0.5 cm de ancho.

Los bazos de los ratones infectados por 7 días con solo *T. gondii* mostraron un crecimiento significativo, en comparación al grupo de sanos, el tamaño promedio alcanzado fue de 2.3 cm de largo x 0.9 cm de ancho.

Los bazos de los ratones infectados por 7 días con *T. crassiceps*, tuvieron un crecimiento moderado alcanzando en promedio 1.8 cm de largo x 0.6 cm de ancho.

En las co-infecciones, el tamaño de los bazos fue más grande que el alcanzado por una sola infección, ya fuera de *T. gondii* o por *T. crassiceps*. Fue significativamente importante observar que los bazos del grupo coinfestado en la semana 2, desarrollaron bazos muy grandes que alcanzaron en promedio 2.5 cm de largo x 0.9 cm de ancho. Los bazos del grupo coinfestado en la semana 4, tuvieron un crecimiento similar al observado en la co-infección de la semana 2, alcanzando en promedio 2.4 cm de largo x 0.9 cm de ancho. Mientras que los bazos de la co-infección en la semana 8 desarrollaron bazos de menor tamaño que los coinfestados en la semana 2 o 4, alcanzaron en promedio 2.0 cm de largo x 0.8 cm de ancho.

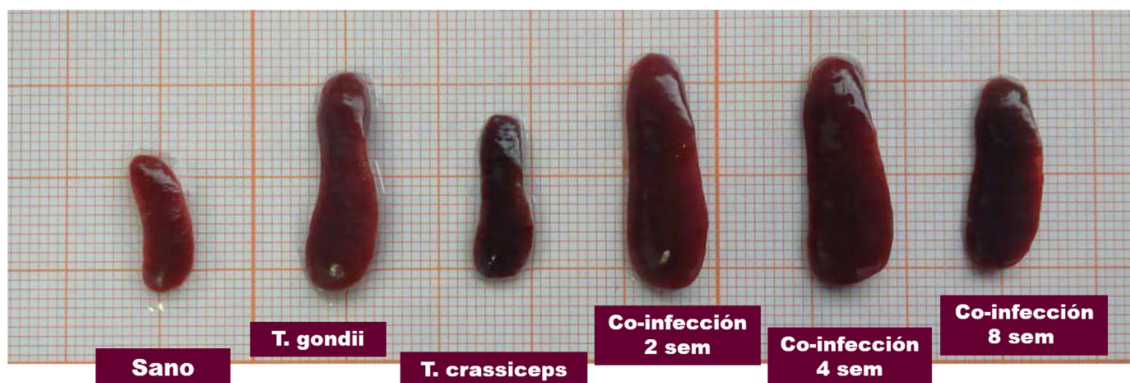


Figura 17. El bazo de los ratones co-infectados a la semana 8 tuvo un crecimiento menor que el de las demás co-infecciones y que el infectado únicamente con *T. gondii*. Fotografía representativa del tamaño de los bazos extraídos a los ratones de todos los grupos experimentales de infección y co-infección, sobre una base de papel milimétrico.

Con el fin de establecer con más exactitud el tamaño de los bazos extraídos se midieron por medio del programa de fotografía científica Image J 1.52a en Windows 10, con el que se obtuvo el área en milímetros de los mismos. En la figura 18 se muestran los resultados de la medición de bazos, mostraron la misma tendencia que en la figura 17, donde los mas grandes fueron de los ratones co-infectados a las 2 semanas.

Bazos de los grupos infectados y co-infectados en el día 7 post-coinfección

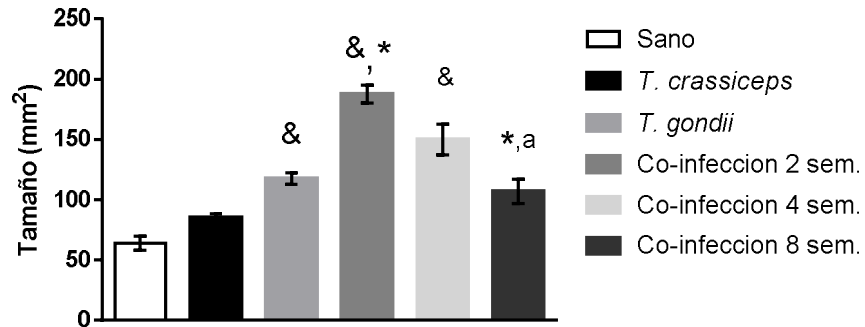


Figura 18. La coinfección a las 8 semanas presentó menor área de bazo que el de las demás coinfecciones. Área de los bazos extraídos a los ratones sanos, infectados y coinfectados, sacrificados a los siete días, bazos medidos con el programa Image J 1.52a. &) $p < 0.05$ diferencia significativa con respecto al sano, *) diferencias significativas con respecto al grupo con *T. gondii*, a) diferencias significativas con respecto a coinfección 2 semanas. Prueba ANOVA postprueba de Tukey. GraphPad software 6.

6.5.1 Peso de bazos

A los bazos extraídos de los grupos experimentales se procedió a pesarlos para establecer el nivel de esplenomegalia.

Como se observó en la figura 19, los bazos del grupo sano y el infectado solo con *T. crassiceps* fueron los de menor peso con menos de 200 mg, mientras que los bazos de los ratones solo infectados con *T. gondii* presentaron un peso promedio de 350 mg.

Los bazos más pesados de todos fueron los del grupo co-infectado a las dos semanas con un peso promedio de 550 mg. La co-infección a las cuatro semanas tuvo un promedio de peso de 500 mg, un poco más bajo que el peso observado en la co-infección de dos semanas, pero más alto que todos los demás grupos.

El grupo de co-infección con pesos de bazo más bajo fue la que se realizó en la semana ocho de co-infección que tuvo un promedio de peso de 300 mg, sin embargo, fue más alto que el de la infección única con *T. crassiceps*.

Los pesos registrados para cada grupo confirmaron la observación descrita respecto a los tamaños calculados por la regla milimétrica del papel. Y dio un precedente a la fuerte respuesta inmune que se desarrolla en la infección por *T. gondii* y la influencia de la pre-existencia de la infección de *T. crassiceps*.

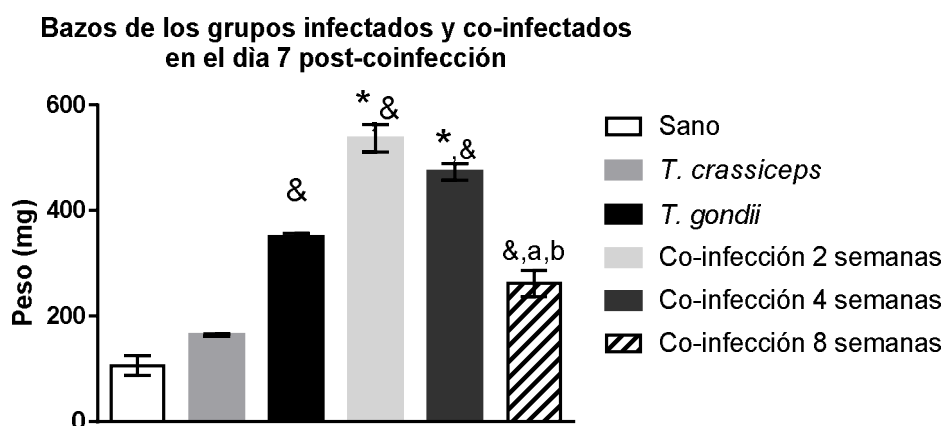


Figura 19. Los ratones co-infectados a las ocho semanas presentaron un menor peso del bazo que la infección con *T. gondii* y las demás co-infecciones. Peso de los bazos extraídos a los ratones sanos, infectados y co-infectados, sacrificados a los siete días. &) p (0.05) estadísticamente significativo con respecto al sano, *) diferencias significativas con respecto al grupo con *T. gondii*, a) diferencias significativas con respecto a co-infección 2 semanas, b) con respecto a la co-infección en la semana 4. Prueba ANOVA postprueba de Tukey. GraphPad software 6.

6.5.2 Índice esplénico

El índice esplénico se calculó a partir de los pesos de cada ratón y el peso de su bazo respectivo al día 7 post-co-infección con *T. gondii*. Con los datos se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice esplénico} = \frac{\text{peso del bazo}}{\text{peso del ratón}}$$

El índice esplénico de los ratones sanos y el de los infectados (Figura 20) únicamente fueron los más bajos con valores menores a 0.01, mientras que los infectados con *T. gondii* presentaron valores cercanos a 0.02, por su parte la co-infección a las 2 semanas fue la de índice más alto con valores arriba de 0.26, muy cercano a la co-infección a las 4 semanas, se puede observar una gran disminución del índice en la co-infección a las 8 semanas, parecido a la infección única con *T. crassiceps*.

Bazos de los grupos infectados y co-infectados en el día 7 post-coinfección

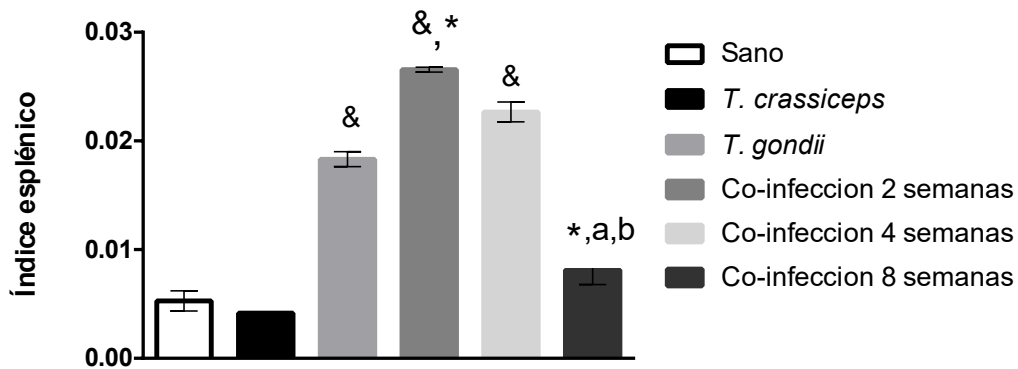


Figura 20. La preexistencia de la infección de 8 semanas de *T. crassiceps* evita el crecimiento del bazo relacionada a la co-infección. Índice esplénico de los ratones sanos, infectados con *T. crassiceps* o *T. gondii*, y co-infectados *T. crassiceps-T. gondii*, &) $p < 0.05$ estadísticamente significativos respecto al grupo sano respecto al sano, *) diferencias significativas con respecto al grupo con *T. gondii*, a) diferencias significativas con respecto a co-infección 2 semanas, b) con respecto a la co-infección en la semana 4. Prueba ANOVA postprueba de Tukey. GraphPad software 6.

6.6 Análisis histológico

Con el fin de apreciar con más detalle la influencia de las co-infecciones se revisó la integridad del tejido de algunos órganos como bazo e hígado. Se diseccionó el bazo de todos ratones de todos los grupos a los 7 días post-co-infección con *T. gondii*, se procedió a fijarlos con formol, enjuagarlos, pasarlos por una serie de alcoholes para su deshidratación y posteriormente teñirlos con el método de H&E.

6.6.1 Histología de bazo

En la figura 21 se hace una descripción de la morfología de un bazo proveniente de un roedor sano con la intención de ocuparla como referencia comparativa para los otros bazos obtenidos de los grupos infectados y co-infectados.

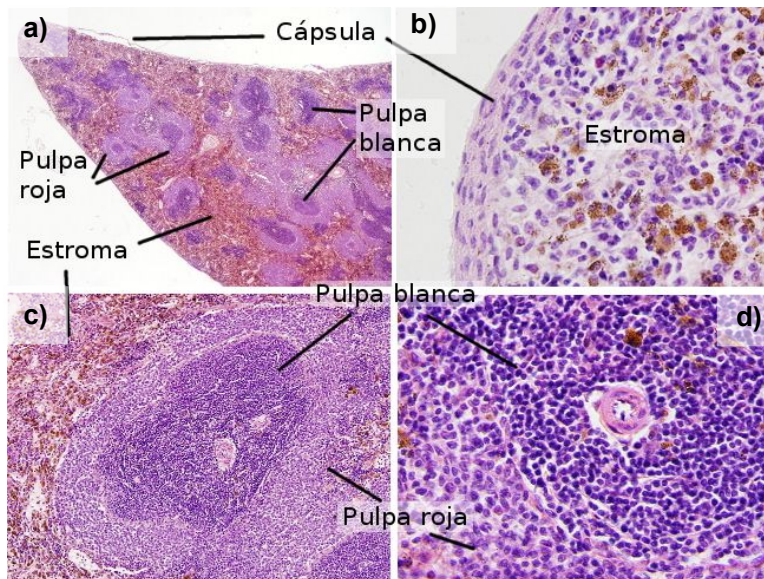


Figura 21. Fotografías representativas de vistas al microscopio con diferentes aumentos de tejido esplénico de roedores sanos. a) fotografía con aumento 4x donde están señaladas la pulpa roja, capsula, estroma y pulpa blanca. b) fotografía con aumento 10x mayormente estroma y señalada la capsula del bazo. c) imagen con aumento 40x donde se aprecian claramente la pulpa roja, pulpa blanca y el estroma. d) fotografía con aumento 100x de la pulpa blanca y pulpa roja. Imagen tomada de <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/linfatico-bazo.php#n>

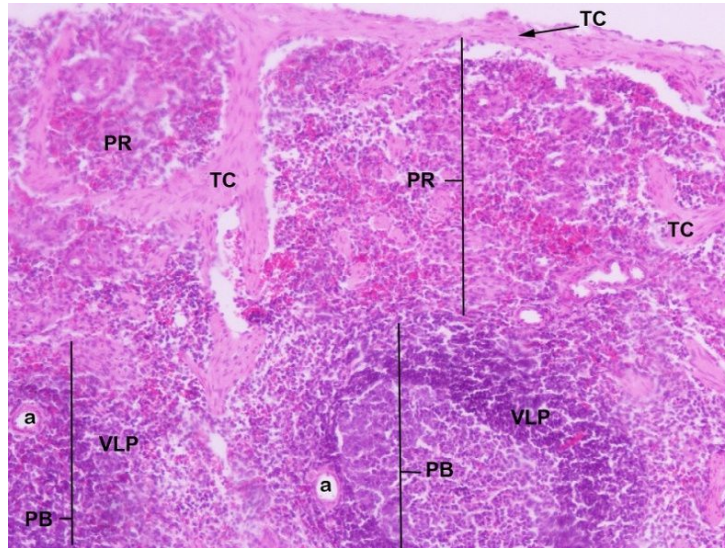


Figura 22. Fotografía representativa de microscopía óptica de bazo de roedor sano teñido con H&E a un aumento de 10x con las estructuras señaladas y descritas en el texto inferior. Imagen tomada de <http://bibbiologia.usal.es/imagenes/picture.php?/1587>

Esta imagen (figura 22) de microscopía óptica corresponde a bazo de roedor teñido con Hematoxilina-Eosina, a un aumento de 10x. El bazo está recubierto de una capa de tejido conectivo (TC) o capsula. En la imagen se observa que desde la cápsula parten trabéculas de tejido conjuntivo que se distribuyen entre la pulpa. Ésta tiene dos partes: la pulpa roja (PR) y la pulpa blanca (PB). La pulpa roja (PR) está formada esencialmente por sinusoides venosos, separados por cordones esplénicos, con gran cantidad de eritrocitos. Además, en ella se puede observar la presencia de arteriolas (a). La pulpa blanca (PB) contiene una alta concentración de linfocitos, que forman una vaina linfoide periarteriolar (VLP).

En la figura 21 se observan fotografías representativas a aumentos de 4x, 10x y 40x de los cortes realizados de los grupos experimentales teñidos con la técnica de H&E, se realizó la comparación con las fotografías de referencia de las figuras 21 y 22, así como con tejidos de ratones sanos de los grupos experimentales de este proyecto.

En el grupo sano se observó que la morfología del bazo en cuanto a la distribución de las pulpas blanca y roja, trabéculas y la capsula, fue similar a la presentada en las figuras 21 y 22 de fotografías representativas de bazos de roedores sanos.

La figura 23 muestra as fotografías de los grupos experimentales, el grupo infectado solo con *T. crassiceps* tuvo una morfología similar al grupo sano, con una leve diferencia en la delimitación de la pulpa blanca y roja. En la infección con *T. gondii* se observó que la morfología resultó severamente afectada, ya que no se apreciaron claramente las pulpas roja y blanca, aunado a un aumento en el tamaño de la vaina linfoide periarteriolar. La co-

infección de la semana 2 al igual que en la infección con *T. gondii* la morfología de las pulpas y la vaina periarteriolar resultó seriamente afectada.. En la co-infección de la semana 4 se observaron alteraciones menos severas en las pulpas roja y blanca en comparación con la infección con *T. gondii*. Finalmente en la co-infección de la semana 8 el tejido tuvo una morfología más similar a los bazos sanos que las otras co-infecciones.

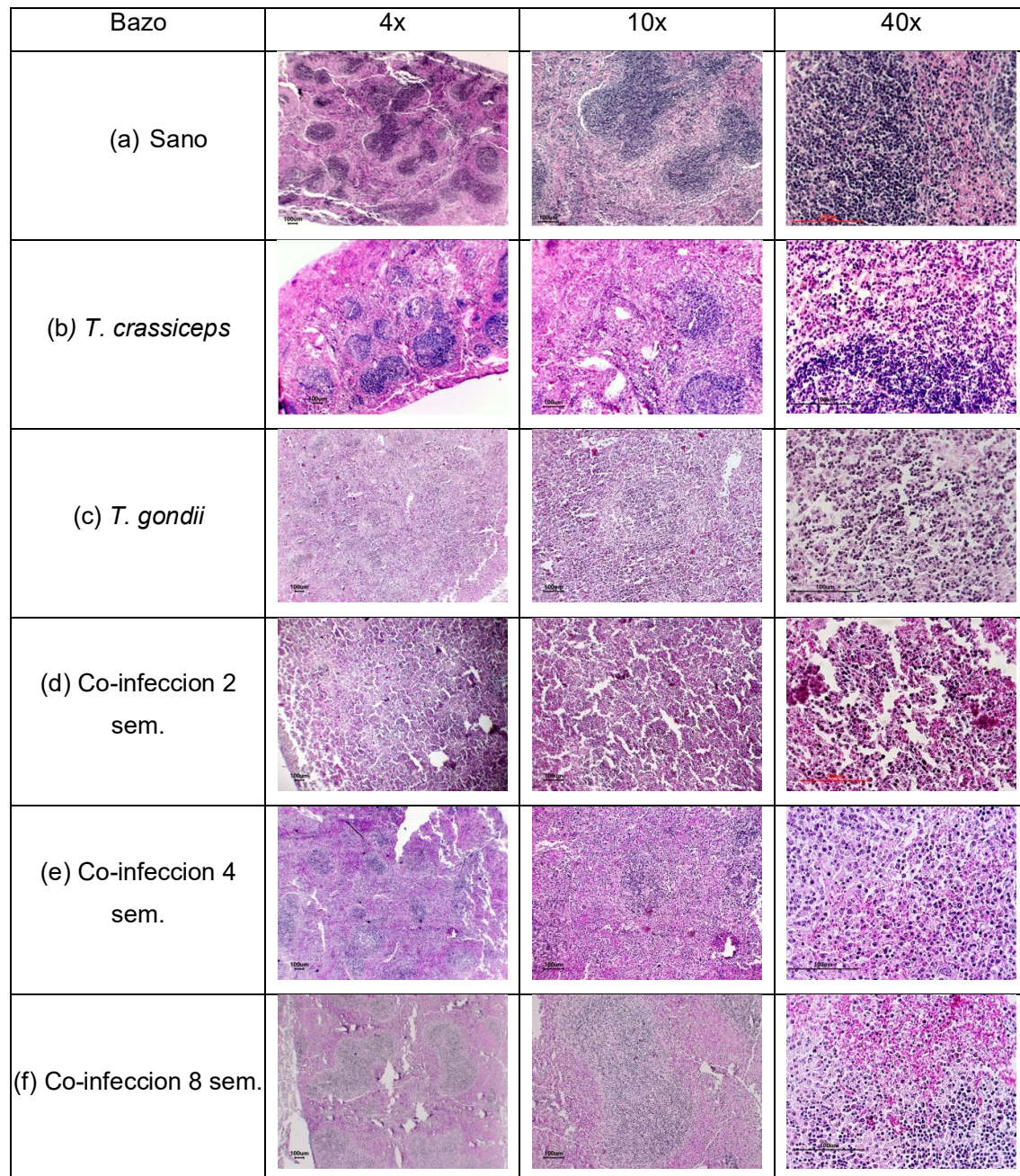


Figura 23. La presencia previa de *T. crassiceps* por 8 semanas reduce el daño en al bazo por la infección por *T. gondii*. Fotografías representativas de cortes histológicos de bazo de todos los grupos experimentales observado a diferentes aumentos en microscopio óptico. a) ratones sanos, b) ratones infectados con *T. crass*, c) ratones infectados con *T. gondii*, d) ratones infectados con 2 sem. de *T. crass* + *T. gondii*, e) ratones infectados con 4 sem de *T. crass* + *T. gondii*, f) ratones infectados con 2 sem de *T. crass* + *T. gondii*.

6.6.2 Histología de hígado

En la figura 24 se hace una breve descripción de la morfología de un hígado proveniente de un roedor sano con la intención de ocuparla como referencia comparativa para los otros hígados obtenidos de los grupos infectados y co-infectados.

Se observa la composición del tejido hepático de roedor sano. El hígado principalmente, está compuesto de lóbulos hepáticos, los cuales están revestidos de células mesoteliales del peritoneo visceral que cubre una fina capa de tejido conjuntivo.

El interior del hígado está dividido en lobulillos hepáticos separados por tejido conectivo. El tejido conectivo de la cápsula penetra en los espacios interlobulillares dando sostén al sistema vascular (vena intralobular y vasos sanguíneos) y a los conductos biliares.

Entre lobulillos contiguos, se encuentran los espacios portaes formados por tejido conectivo y por las denominadas triadas portaes, compuestas por una rama de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conductillo biliar. Una fina red de fibras reticulares rodea los hepatocitos y capilares sinusoides. Los hepatocitos tienen forma poliédrica con uno o dos núcleos.

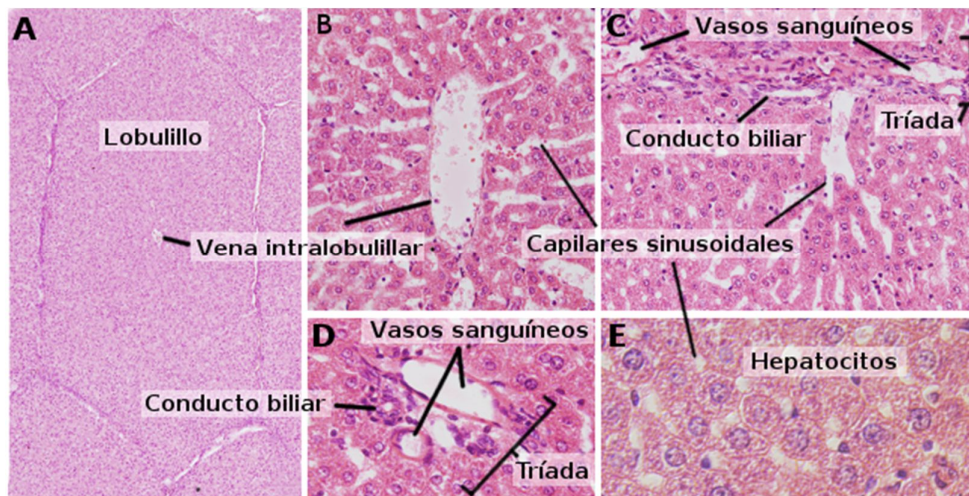


Figura 24. Micrografías de tejido hepático de roedor sano con tinción H&E en diferentes aumentos. A) Fotografía con aumento de 10x en el que se observan los lobulillos hepáticos, vena intralobular y conducto biliar; B) micrografía con aumento 40x que se observan capilares sinusoides y vena intralobular; C) fotografía a un aumento de 40x de los vasos sanguíneos, conducto biliar, capilares sinusoides y triada; D) fotografía con aumento de 100x de vasos sanguíneos, conducto biliar y triada; E) fotografía con aumento de 100x de hepatocitos y capilares sinusoides. Tomada de <https://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php#n>

En la figura 25 se presentan fotografías representativas a aumentos de 4x, 10x y 40x de los cortes realizados de todos los grupos experimentales teñidos con la técnica de H&E, se observó la alteración de los tejidos hepáticos debidos principalmente de la infección con *T. gondii*.

En los ratones sanos se pudo observar una morfología similar a la presentada en la figura 13, sin alteraciones en los hepatocitos con forma y núcleos normales (figura 25 a).

En la infección con *T. crassiceps* se observaron crecimiento de los hepatocitos, un poco de infiltrado celular e inflamación (figura 25 b).

En el grupo de ratones únicamente infectados con *T. gondii* se observó necrosis principalmente presencia de cariólisis (difuminación del núcleo), cariorrexis (fragmentación nuclear), con infiltrado celular, inflamación severa, además detectamos presencia de quistes en el tejido (figura 25 c).

En los ratones de la co-infección de las 2 semanas se observaron características menos severas que en la infección con *T. gondii*, menos necrosis en el tejido, hepatocitos menos dañados, aunque sigue prevaleciendo una gran cantidad de infiltrado celular (figura 25 d).

En el grupo de co-infección a las 4 semanas se observó una menor cantidad de necrosis, infiltración celular e inflamación que en los ratones infectados con *T. gondii* (figura 25 e).

En la co-infección de las 8 semanas se distinguieron menores niveles de necrosis, inflamación y una mejora en la apariencia de los hepatocitos, que en las demás co-infecciones y que la infección con *T. gondii* (figura 25 f).

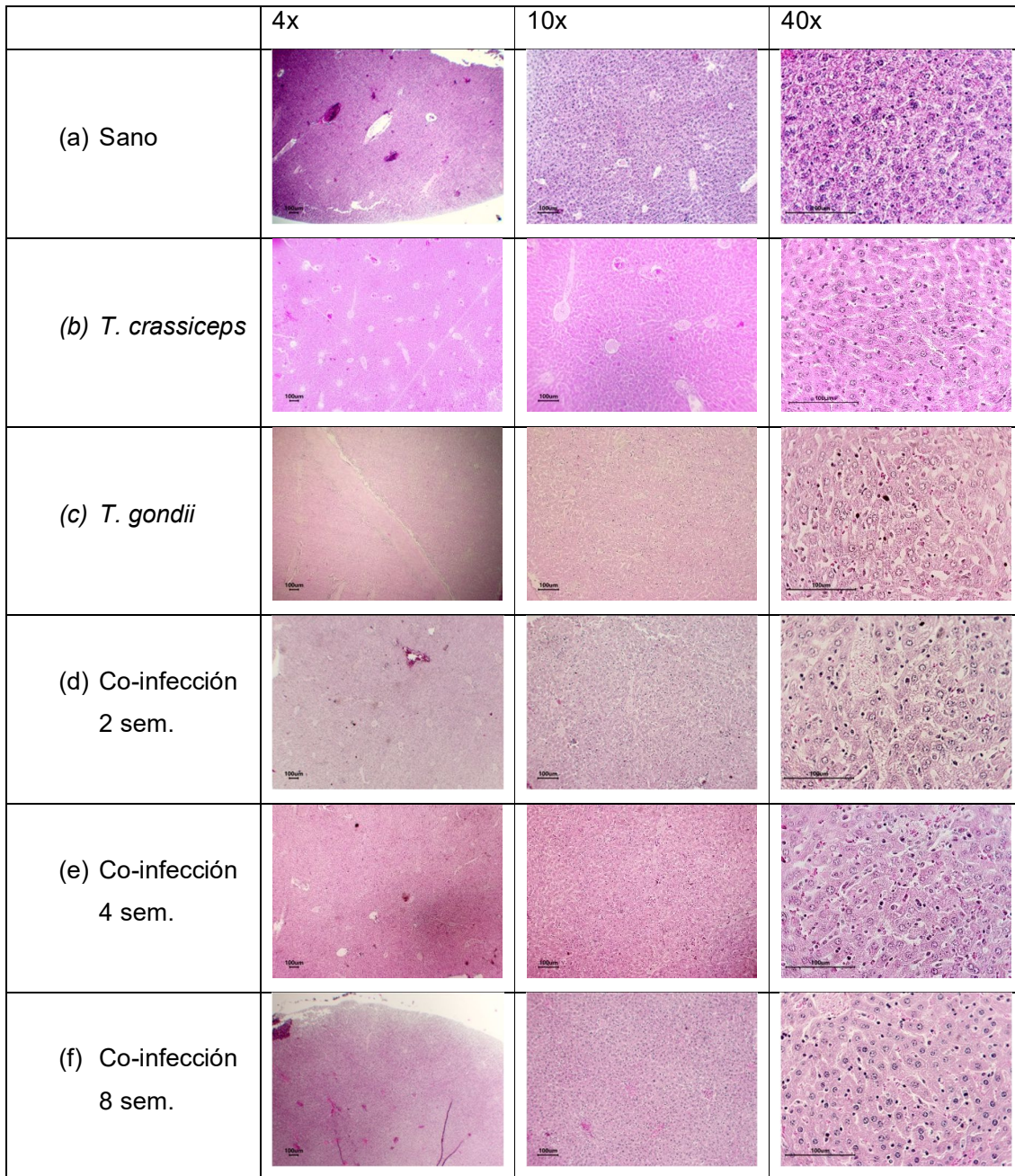


Figura 25. La infección con *T. gondii* presento mayor cantidad de necrosis. Infamación e infiltrado celular. Fotografías representativas de cortes histológicos de hígado de todos los grupos experimentales observado a diferentes aumentos en microscopio óptico. a) hígado de ratones sanos, b) hígado de ratones infectados con *T. crassiceps*, c) hígado de ratones infectados con *T. gondii*, d) hígado de ratones infectados con 2 sem de *T. crassiceps*+*T. gondii*, e) hígado de ratones infectados con 4 sem de *T. crassiceps*+*T. gondii*, f) hígado de ratones infectados con 8 sem de *T. crassiceps*+*T. gondii*.

6.7 Conteo de quistes de *T. gondii*

Se realizaron cortes histológicos y tinción H&E de bazo e hígado de todos los grupos infectados con *T. gondii* y co-infectados. Se procedió a contar 100 campos por triplicado para conocer el número de quistes alojados en estos órganos. Los quistes en los cortes obtenidos se apreciaron mejor a un aumento de 100x, como se ve en la figura 26.



Figura 26. Fotografía representativa de un quiste de *T. gondii* en bazo, encerrado en un círculo amarillo, a 100x. Tomada del grupo experimental infectado únicamente con *T. gondii*.

6.7.1 Quistes de *T. gondii* en bazo

Como se puede ver en la figura 27 el número de quistes, los ratones infectados únicamente con *T. gondii* alojaron más quistes en el tejido, seguido de los ratones co-infectados a las dos semanas con *T. crassiceps*, mientras que los co-infectados a la semana cuatro presentaron menos quistes al igual que los co-infectados en la semana ocho.

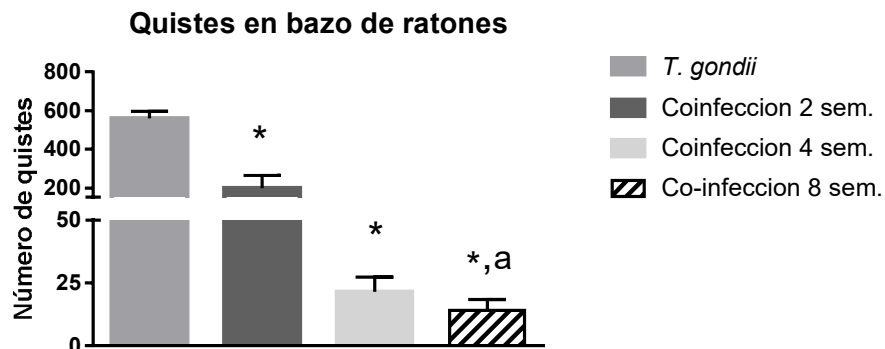


Figura 27. La co-infección previno el número de quistes desarrollados en el bazo, mientras mayor fue el tiempo de preexistencia de *T. crassiceps* menor fue la carga parasitaria de *T. gondii*. Numero de quistes de *T. gondii* en el bazo de ratones infectados y co-infectados $p < 0.05$, * respecto al grupo infectado únicamente con *T. gondii*; a) respecto a la co-infección en la semana 2. ANOVA y Tukey. GraphPad software 6.

6.7.2 Quistes de *T. gondii* en hígado

Como se puede ver en la figura 28 el número de quistes en el hígado fue aparentemente más alto en la infección con *T. gondii*, mientras que los grupos co-infectados con *T. crassiceps* mostraron significativamente menos quistes en el tejido hepático.

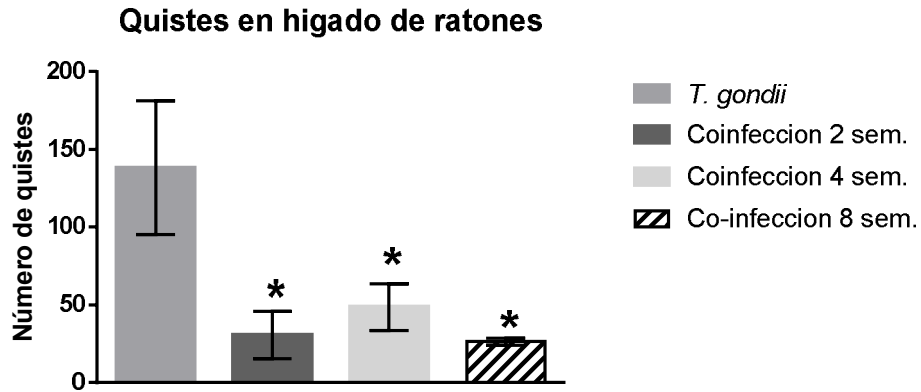


Figura 28. La co-infección impidió el establecimiento de quistes de *T. gondii* en el tejido hepático. Numero de quistes de *T. gondii* en el hígado de ratones infectados y co-infectados. $p < 0.05$, * respecto al grupo infectado únicamente con *T. gondii*;. ANOVA y Tukey. GraphPad software 6.

7. Discusión

El modelo murino de infección de *T. crassiceps* ha sido estudiado desde hace más de 50 años, y ha sido útil para la comprensión de la respuesta inmune en la cisticercosis e interacciones de con otros parásitos relacionados y no relacionados [39].

Se ha observado en roedores que la susceptibilidad e intensidad de la respuesta inmune en la infección por *T. crassiceps* depende de una combinación de factores genéticos, sexuales e inmunológicos del hospedero.

Los resultados de este trabajo muestran primeramente el crecimiento de la carga parasitaria a partir de la reproducción asexual de los cisticercos inoculados de *T. crassiceps* (figura 1) en ratones hembras de fondo genético BALB/c. En las primeras cuatro semanas post-infección hubo un crecimiento limitado de los cisticercos. Después de este tiempo hubo un aumento estadísticamente significativo del número de cisticercos, el cual fue muy evidente en y la semana ocho de post-infección, donde los cisticercos inundaron toda la cavidad peritoneal, dada su capacidad replicativa [12, 45-47]. Este cambio en la carga parasitaria se relacionó con la respuesta inmune, ya que en las primeras semanas de infección por *T. crassiceps* se observó una respuesta pro-inflamatoria que inició con la producción de citocinas pro-inflamatorias por los macrófagos del hospedero para el control temporal de la replicación del parásito [12].

La respuesta pro-inflamatoria se caracterizó por la producción de las citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ [48], las cuales alcanzaron sus puntos máximos en las primeras 4 semanas post-infección con el helminto.

La respuesta inflamatoria observada en las primeras semana cambio a partir de la semana cinco post-infección, las citocinas pro-inflamatorias disminuyeron significativamente y se observó un incremento de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10. Así, el microambiente inmunológico se hizo más permisivo para la replicación del cisticerco [48, 49]. La producción de IL-4 aumentó considerablemente a partir de la semana seis de infección. Previamente se ha demostrado en estudios *in vivo* que IL-4 es una citocina que tiene una correlación inversa entre los niveles de esta y la parasitemia en los ratones, ya que juega un rol esencial en la diferenciación en las células T CD4⁺ naive para su diferenciación hacia el perfil Th2 anti-inflamatorio [34, 50]. De la misma manera, la IL-10 se vio incrementada después de 5 semanas post-infección, lo que caracteriza la respuesta crónica [45].

La IL-10 fue inicialmente descrita como una citocina Th2, pero evidencia sugiere que la producción de IL-10 está asociada a la respuesta reguladora por Tregs, es conocido que IL-10 no es específica de células Th1 o Tregs [51], es producida por macrófagos,

células dendríticas, células B y otros subconjuntos de células CD4 y CD8, es un inmunoregulador, clave durante infecciones por helmintos como en *Tenia crassiceps* y otros patógenos regulando la excesiva respuesta celular Th1 y CD8 (tipificados por la sobreproducción de IFN- γ y TNF- α) que son responsables de gran parte de la patología asociada con infecciones.

En la infección por *T. crassiceps* la producción de IL-10 está asociada con el poco control del parásito y la severidad de la enfermedad [52]. En este trabajo se pudo observar una acción reguladora de la respuesta Th1 en la semana 6 post-infección, lo cual correlacionó con el aumento de la carga parasitaria.

La infección con el cisticercos de *T. crassiceps* polariza la respuesta inmune de un perfil Th1 hacia un perfil Th2, después de la semana 4 post-infección, lo que refleja la habilidad de este parásito para modular la respuesta inmune del hospedero. En este sentido, se ha reportado anteriormente que los antígenos de *T. crassiceps* son capaces de inhibir la secreción de citocinas pro-inflamatorias mientras que preservan la producción de IL-10 acompañado por un aumento de la producción de IL-4, por lo tanto regulando negativamente la respuesta Th1 inicial [53].

Por el contrario, el parásito intracelular *T. gondii*, en especial la cepa ME49, induce una respuesta inmune con alta producción de citocinas pro-inflamatorias producida por los macrófagos, particularmente citocinas que favorecen la respuesta tipo Th1, como la IL-12.

En la infección primaria por *T. gondii*, ambos tipos de células T (CD4⁺ y CD8⁺) participan en la respuesta inmune contra el parásito. Las células T CD8⁺ pueden determinar el número que quistes en los modelos murinos infectados. Mientras que las células T CD4⁺ pueden controlar el crecimiento del número de taquizoitos y con la estimulación adecuada todas las células T CD4⁺ pueden producir IL-12 e IFN- γ , que son centrales en la resistencia a la infección con *T. gondii* [54].

El control de la toxoplasmosis ha sido estudiada ampliamente en el modelo murino, se ha observado que presenta una vigorosa respuesta regulada por las citocinas Th1 para controlar la infección. La producción de IL-12 es inducida tempranamente, lo que potencializa la producción de IFN- γ por células NK y T. La respuesta innata está relacionada en la producción temprana de citocinas durante la infección, se ha demostrado que células dendríticas, neutrófilos y macrófagos responden directamente al parásito produciendo IL-12 y TNF- α , importantes para controlar la resistencia a la infección aguda y crónica de *T. gondii* [55].

La mortalidad del parásito depende de factores como, la edad del hospedero, sexo, vía de inoculación, cepa de ratón y cepa de *T. gondii*. Se ha reportado que la cepa de ratones BALB/c inoculados de forma intraperitoneal son susceptibles a generar patología, otro factor que entra en juego en la virulencia del parásito es la cantidad de pasajes

continuos en ratones, aunque no es muy clara la relación causa-efecto en las variaciones genéticas y fenotipos, existe el fenómeno de cambios fenotípicos durante los pasajes continuos o cultivos celulares. Además la respuesta a *T. gondii* Me49 es dosis-dependiente [21, 56, 57]

Como previamente se mencionó, en los ratones BALB/c, la toxoplasmosis aguda puede llegar a ser fatal debido a la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias, la fatalidad de la infección se ve reflejada en la figura 14, se observó en la sobrevida de los ratones solamente infectados con *T. gondii* ya que no fue más allá del día 7 después de la inoculación, las co-infecciones presentaron sobrevidas similares [21]. La fuerte respuesta Th1 hacia *T. gondii* puede generar una alta mortalidad debido a alta producción de citocinas pro-inflamatorias, como IL-12, TNF- α INF- γ , siendo la principal causa de síntomas de una condición llamada caquexia, que además de consistir en la sobreproducción de citocinas, incluye otros síntomas como pérdida de peso debido a deshidratación excesiva y desgaste desproporcionado de musculo, disfunción cognitiva, anemia y debilidad [58]. Los ratones de este modelo presentaron los síntomas referidos anteriormente y sin importar el grupo de co-infección, los individuos terminaron por sucumbir a los pocos días del contacto con nuestra cepa de *T. gondii*, estos resultados de la sobrevida nos aproximan a conocer la virulencia de esta cepa de *T. gondii* y concuerdan con reportes anteriores de co-infecciones helminto-toxoplasma [13, 42, 43, 59, 60].

En cuanto a la respuesta inmune, se midió la cantidad de citocinas en el suero de los infectados con *T. crassiceps*, *T. gondii* y los co-infectados, se encontró que la infección con *T. gondii* estimuló la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y TNF- α . Se sabe que una de las funciones de INF- γ es estimular la producción de TNF- α , que es producido por varios tipos celulares, TNF- γ es crucial para el control in vivo de *T. gondii*, principalmente en el control de la replicación del parasito en los órganos blanco como el cerebro y es esencial para la sobrevivencia de toxoplasmosis murina aguda [61], mientras que IL-12 es inhibida al comenzar la producción de citocinas Th2 como IL-4 e IL-10 [2].

La producción de citocinas en las co-infecciones mostró que la infección con *T. gondii* fue mortal sin importar si se realizaba en la fase pro-inflamatoria o anti-inflamatoria, lo que concuerda con un estudio anterior realizado con el helminto *N. brasiliensis* que al igual que *T. crassiceps* induce una respuesta Th2 cuando la infección se hace crónica, y observaron que la respuesta a la co-infección con *T. gondii* sin importar el tamaño del inoculo, el punto de la co-infección y la calidad de la respuesta Th2 previa (protector de la respuesta perjudicial) fueron insuficientes para contra regular la respuesta Th1 inducida por *T. gondii*, lo que provocó la muerte de los ratones. En contraste con la infección con *T. gondii* que sin importar el tamaño del inoculo demostró una marcada regulación negativa hacia la respuesta Th2 inducida por *N. brasiliensis*. [43]. Estudios con una co-infección *H.*

polygyrus y *T. gondii* en ratones demostraron que una infección previa con helmintos, la respuesta de células T CD4+ y CD8+ contra *T. gondii* se suprime en ratones. En etapas posteriores de la infección la respuesta de las células T CD4+ se recupera, mientras que la respuesta TCD8+ permanece interrumpida [60]. Otro estudio realizado con co-infección *T. crassiceps-T. gondii* confirmó la disminución de la respuesta Th2 establecida en la fase crónica de la infección por *T. crassiceps* debido a la co-infección posterior con *T. gondii*, mientras que la respuesta Th1 presentada contra *T. gondii* no se vio afectada por la infección previa con el helminto [59]. Los estudios anteriores respaldan lo que se puede observar en las gráficas 5 y 6, ya que se puede observar una elevada producción de citocinas pro-inflamatorias tanto en la infección solo con *T.gondii* como en las co-infecciones, siendo la más alta la de las 2 semanas y más baja la de las 8 semanas, pero sin importar la diferencia que se pudo observar en las gráficas, el resultado de la parasitemia fue mortal para los ratones infectados y co-infectados. [13, 42, 60].

Con los resultados anteriores procedimos a observar los efectos en la morfología del bazo, es el órgano linfoide secundario más grande, contiene un cuarto de los linfocitos del cuerpo, inicia la respuesta inmune presentando a los antígenos transportados en la sangre, lleva a cabo la diferenciación de los linfocitos [62], en el caso de una infección aguda donde se suscita una respuesta inmunológica robusta, el bazo crece de tamaño debido al aumento de funciones, para observar el efecto de infecciones y co-infecciones en el tamaño de los bazos se procedió a extraerlos y compararlos, se colocaron encima de una base de papel milimétrico, se pudo observar en la figura 17 el bazo sano y el infectado únicamente con *T. crassiceps* son los más pequeños, mientras que el de la co-infección a las dos semanas junto con el de *T. gondii* fue el más grande, seguido de el de la co-infección a las cuatro semanas. Para tener una medición más aproximada se midió el área en el programa Image J, en esta medición se pudieron observar resultados concordantes con las fotografías representativas de la figura 17, donde la infección con *T. gondii* y las co-infecciones propician el crecimiento del bazo, y que en especial las co-infecciones a las dos y cuatro semanas son las que generan mayor crecimiento de este órgano, siendo estadísticamente diferentes a los demás grupos. Posterior a la medición con el software se procedió a pesar los bazos (figura 19) extraídos y los resultados tuvieron las mismas tendencias de las mediciones anteriores con el software de imagen digital ImageJ 1.52a. Con la información antes referida se calculó el índice esplénico (peso del bazo/peso del ratón) en la figura, para determinar la existencia de esplenomegalia en los ratones infectados, que se define como el incremento del tamaño del bazo debido al aumento de sus funciones para contrarrestar el crecimiento del parásito, en la infección con *T. gondii* se dispara el índice esplénico, esto aumenta en las co-infecciones a las dos y cuatro semanas, pero disminuye de manera significativa en la co-infección a la semana 8, lo que pudo ayudar a estimar el tamaño de la

respuesta inmune presente en el momento del sacrificio, se ha asociado la toxoplasmosis a caquexia por la alta producción de IL-12 y TNF- α , además de esplenomegalia debido a la fuerte respuesta Th1 del hospedador [54, 63].

Después de la infección con *T. gondii*, el sistema lleva tan alto los niveles de citocinas Th1, lo que incrementa la apoptosis y daño a órganos [55].

Además de las pruebas anteriores se realizaron tinciones con la técnica H&E para explorar la patología a nivel tisular inducida por la toxoplasmosis aguda en bazo e hígado, se examinaron los tejidos de los individuos sano, infectados con *T. crassiceps*, *T. gondii* y los co-infectados en la semana 2, 4 y 8.

El bazo está rodeado por una capsula y se ubica en el trayecto del torrente sanguíneo, filtra sangre y dentro de él se inicia la respuesta inmune. La pulpa esplénica está compuesta por la pulpa blanca y a pulpa roja, llamadas así por su aspecto en el tejido fresco. La pulpa blanca contiene una gran cantidad de linfocitos, que forman una vaina linfática periarterial (PALS) alrededor de las ramas de la arteria esplénica que la penetran y están formados por linfocitos [64]; se colocaron las figura 21 y 22 como representativas de tejido de bazo de roedor sano. En la figura 23 se pueden observar fotografías representativas del tejido de bazo del ratón sano de este proyecto, se aprecian claramente las pulpas blanca y roja, además de la zona marginal alrededor de la pulpa roja, el grupo infectado con *T. crassiceps* mostro una morfología similar. Mientras que en los ratones infectados solo con *T. gondii*, la histología mostro severa alteración en las pulpas, ya que no se apreciaron con claridad, además de aumento en la vaina linfoide periarteriolar, esto se puede relacionar a la fuerte respuesta Th1 que incrementa la apoptosis y genera daño en los órganos [65]. En las co-infecciones a las 2 y 4 semanas, se observaron alteraciones menos severas, que la infección solo con *T. gondii*, finalmente, la co-infección a las 8 semanas fue la que presentó menos alteraciones en la morfología de las pulpas, además de una apariencia similar a la presentada por los bazos sanos.

Se describió que la patología severa durante la toxoplasmosis aguda letal fue restringida al hígado y tejidos linfáticos. Las infecciones letales con una alta dosis de ME49 generalmente inducen una patología similar a la presentada contra la cepa altamente virulenta. Mientras que una dosis baja de la cepa ME49 induce una pequeña patología en los tejidos durante la infección aguda [55].

De la misma manera, los tejidos del hígado se colocaron imágenes representativas del tejido hepático sano en roedor (figura 24) donde se ejemplifican los lobulillos, triadas portales, vasos sanguíneos, conductos biliares y los hepatocitos que constituyen el tejido hepático casi en su totalidad.

En la figura 25 se muestran fotografías representativas del tejido hepático, las imágenes muestran que el tejido obtenido de los ratones sanos en este proyecto no difiere a

lo mostrado en las imágenes representativas, (figura 24) mientras que la infección solo con *T. crassiceps* si tiene afectaciones en cuanto a la inflamación de los hepatocitos y también se puede observar un ligero infiltrado celular. El tejido que presenta serias alteraciones morfológicas fue el infectado únicamente con *T. gondii* ya que se puede observar necrosis, cariorexis y cariólisis, infiltrado celular y presencia de quistes tisulares. Las co-infecciones en las semanas 2 y 4 mostraron las alteraciones anteriormente referidas con menos severidad. Finalmente, la co-infección a las 8 semanas fue la que presento menos necrosis y mejora en la apariencia de los hepatocitos. El estado del tejido está directamente atribuido a la replicación intracelular del parásito. Se ha reportado que las infecciones letales con *T. gondii* inducen extensas alteraciones en los hepatocitos, incluyendo alargamiento, vacuolización citoplasmática y liberación de enzimas hepáticas [43, 55], lo que coincide con los resultados de este proyecto.

Las mediciones de citocinas se realizaron utilizando los sueros, por lo tanto, de una respuesta sistémica. En el grupo infectado solo con *T. gondii* y en las co-infecciones de las semanas 2 y 4, se observó una alta concentración de citocinas proinflamatorias relacionadas con daño tisular, mientras que en los ratones de la co-infección en la semana 8 se observaron menos afectaciones en el espacio pulpar y la zona marginal, lo que indica un mejor estado del hígado; al igual que menos alteraciones en el tejido hepático.

Para finalizar, se contabilizaron los quistes presentes en los cortes histológicos de bazo e hígado, como se puede ver en la figura 27, los ratones infectados solo con *T. gondii* alojaron mayor cantidad de quistes en el tejido esplénico, mientras que los co-infectados a la semana cuatro y ocho tuvieron menos quistes. Por otra parte, el hígado en la mayoría de de los grupos alojó una cantidad menor de quistes, el grupo infectado solo con *T. gondii* tuvo una mayor cantidad de alojamiento celular, todas las co-infecciones mostraron menor cantidad, aunque no estadísticamente significativas. Por lo reportado anteriormente la cantidad de quistes encontrados en los primeros días en el tejido hepático va disminuyendo conforme avanza la co-infección [55, 66].

Todo esto se puede resumir en las siguientes aseveraciones:

1. Los ratones infectados con *T. crassiceps* desarrollan un perfil de citocinas Th1 al inicio de la infección.
2. Los ratones infectados con *T. crassiceps* desarrollan un perfil de citocinas Th2 en la fase crónica de la infección.
3. La pre-infección por 4 semanas con *T. crassiceps* prolongo la supervivencia de los ratones infectados con *T. gondii*.
4. La co-infección en la semana 2 incrementó el perfil de citocinas proinflamatorias, mientras que las co-infecciones en las semanas 4 y 8 el perfil de citocinas proinflamatorias fue ligeramente menor respecto a la infección con solo *T. gondii*.
5. La presencia *T. crassiceps* por más de 5 semanas favoreció producción de IL-4 e IL10 y redujo la patología por la infección de *T. gondii*.
6. Los ratones de la co-infección a las 8 semanas presentaron menor área de bazo que los de las demás co-infecciones y los de la infección con *T. gondii*.
7. Los ratones coinfectados a las ocho semanas presentaron un menor peso del bazo que la infección con *T. gondii* y las demás co-infecciones.
8. La preexistencia de la infección de 8 semanas de *T. crassiceps* evita el crecimiento del bazo relacionada a la co-infección.
9. La co-infección previno el número de quistes desarrollados en el bazo, mientras mayor fue el tiempo de preexistencia de *T. crassiceps* menor fue la carga parasitaria de *T. gondii*.
10. La co-infección impidió el establecimiento de quistes de *T. gondii* en el tejido hepático.

8. Conclusión

La infección crónica por helmintos aumenta las tasas de supervivencia en la co-infección por *T. gondii*, y que este fenómeno depende de la modulación del perfil inmunológico provocado por los helmintos según el tiempo de infección preexistente antes de la infección por *T. gondii*. La polarización de las células T en las infecciones por *T. gondii* se puede modular por factores preexistentes, incluidas las citocinas y las células reguladoras inducidas por los helmintos. Sin embargo, se requieren estudios futuros para lograr una mejor comprensión de los mecanismos involucrados en la respuesta celular reguladora antiinflamatoria inducida por los parásitos helmintos durante la co-infección con *T. gondii*.

Bibliografía

1. Dhiman, R., et al., *Cysticercosis of the eye*. International journal of ophthalmology, 2017. **10**(8): p. 1319.
2. Sasai, M., A. Pradipta, and M. Yamamoto, *Host immune responses to Toxoplasma gondii*. Int Immunol, 2018. **30**(3): p. 113-119.
3. Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer, *Structures of Toxoplasma gondii tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(2): p. 267-99.
4. Ntoukas, V., et al., *Cerebellar cysticercosis caused by larval Taenia crassiceps tapeworm in immunocompetent woman, Germany*. Emerg Infect Dis, 2013. **19**(12): p. 2008-11.
5. Peon, A.N., A. Espinoza-Jimenez, and L.I. Terrazas, *Immunoregulation by Taenia crassiceps and its antigens*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 498583.
6. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Immunología celular y molecular* Septima ed, ed. Elsevier. 2012, España.
7. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
8. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Inmunología de Janeway*. Tercera edición ed. 2009, México.
9. Beutler, B., *Innate immunity: an overview*. Mol Immunol, 2004. **40**(12): p. 845-59.
10. Warrington, R., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2011. **7 Suppl 1**: p. S1.
11. Kidd, P., *Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease*. Altern Med Rev, 2003. **8**(3): p. 223-46.
12. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability*. Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3656-64.
13. Miller, C.M., et al., *Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan Toxoplasma gondii and the Th2-inducing helminth Fasciola hepatica*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5692.
14. Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli, *Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(4): p. 569-88.
15. Galvan, R.M., *Toxoplasmosis animal*, ed. U.d. Guadalajara. 2014, México: Amaya Ediciones.
16. Behnke, M.S., J.P. Dubey, and L.D. Sibley, *Genetic Mapping of Pathogenesis Determinants in Toxoplasma gondii*. Annu Rev Microbiol, 2016. **70**: p. 63-81.
17. Yarovinsky, F., *Innate immunity to Toxoplasma gondii infection*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(2): p. 109-21.
18. Tenter, A.M., A.R. Heckeroth, and L.M. Weiss, *Toxoplasma gondii: from animals to humans*. Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1217-58.
19. Joynton, D.H.M. and T.G. Wreghitt, *Toxoplasmosis a comprehensive clinical guide*. 2001, New York: Cambridge University.
20. Olguin, H.E.J., *Papel de las células T reguladoras en la respuesta inmune contra Toxoplasma gondii en el modelo murino*, ed. T. doctoral. 2016, UNAM: Instituto de investigaciones biomédicas
21. Szabo, E.K. and C.A.M. Finney, *Toxoplasma gondii: One Organism, Multiple Models*. Trends Parasitol, 2017. **33**(2): p. 113-127.
22. Hill, D. and J.P. Dubey, *Toxoplasma gondii: transmission, diagnosis and prevention*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(10): p. 634-40.
23. Dubey, J.P., *Bradyzoite-induced murine toxoplasmosis: stage conversion, pathogenesis, and tissue cyst formation in mice fed bradyzoites of different strains of Toxoplasma gondii*. J Eukaryot Microbiol, 1997. **44**(6): p. 592-602.

24. Hunter, C.A. and L.D. Sibley, *Modulation of innate immunity by Toxoplasma gondii virulence effectors*. Nat Rev Microbiol, 2012. **10**(11): p. 766-78.
25. Clough, B. and E.M. Frickel, *The Toxoplasma Parasitophorous Vacuole: An Evolving Host-Parasite Frontier*. Trends Parasitol, 2017. **33**(6): p. 473-488.
26. Pappas, G., N. Roussos, and M.E. Falagas, *Toxoplasmosis snapshots: global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. Int J Parasitol, 2009. **39**(12): p. 1385-94.
27. Chaudhry, S.A., N. Gad, and G. Koren, *Toxoplasmosis and pregnancy*. Can Fam Physician, 2014. **60**(4): p. 334-6.
28. Saadatnia, G. and M. Golkar, *A review on human toxoplasmosis*. Scand J Infect Dis, 2012. **44**(11): p. 805-14.
29. Basavaraju, A., *Toxoplasmosis in HIV infection: An overview*. Trop Parasitol, 2016. **6**(2): p. 129-135.
30. Raisanen, S., *Toxoplasmosis transmitted by blood transfusions*. Transfusion, 1978. **18**(3): p. 329-32.
31. Karimi, G., A. Mardan, and M. Zadsar, *Toxoplasma and blood transfusion*. Iran J Parasitol, 2014. **9**(4): p. 597-8.
32. Munoz, M., O. Liesenfeld, and M.M. Heimesaat, *Immunology of Toxoplasma gondii*. Immunol Rev, 2011. **240**(1): p. 269-85.
33. Beaman, M.H., S.Y. Wong, and J.S. Remington, *Cytokines, Toxoplasma and intracellular parasitism*. Immunol Rev, 1992. **127**: p. 97-117.
34. Oliphant, C.J., J.L. Barlow, and A.N. McKenzie, *Insights into the initiation of type 2 immune responses*. Immunology, 2011. **134**(4): p. 378-85.
35. Paul, W.E. and J. Zhu, *How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 225-35.
36. Lescano, A.G. and J. Zunt, *Other cestodes: sparganosis, coenurosis and Taenia crassiceps cysticercosis*. Handb Clin Neurol, 2013. **114**: p. 335-45.
37. Lightowlers, M.W., *Fact or hypothesis: Taenia crassiceps as a model for Taenia solium, and the S3Pvac vaccine*. Parasite Immunol, 2010. **32**(11-12): p. 701-9.
38. Toledo, A., et al., *Towards a Taenia solium cysticercosis vaccine: an epitope shared by Taenia crassiceps and Taenia solium protects mice against experimental cysticercosis*. Infect Immun, 1999. **67**(5): p. 2522-30.
39. Willms, K. and R. Zurabian, *Taenia crassiceps: in vivo and in vitro models*. Parasitology, 2010. **137**(3): p. 335-46.
40. Terrazas, L.I., *The complex role of pro-and anti-inflammatory cytokines in cysticercosis: immunological lessons from experimental and natural hosts*. Current topics in medicinal chemistry, 2008. **8**(5): p. 383-392.
41. Toenjes, S. and R. Kuhn, *The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type*. Parasitology research, 2003. **89**(5): p. 407-413.
42. Salazar-Castañón, V.H., et al., *Co-infection: the outcome of Plasmodium infection differs according to the time of pre-existing helminth infection*. Parasitology research, 2018. **117**(9): p. 2767-2784.
43. Liesenfeld, O., I.R. Dunay, and K.J. Erb, *Infection with Toxoplasma gondii reduces established and developing Th2 responses induced by Nippostrongylus brasiliensis infection*. Infection and immunity, 2004. **72**(7): p. 3812-3822.
44. Rangel Ruiz, L., *Estudio de la respuesta inmune generada por la co-infección Taenia crassiceps y Toxoplasma gondii*, in Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2011, Universidad Nacional Autónoma de México: Mexico. p. 57.
45. Spolski, R., et al., *Parasite-secreted products regulate the host response to larval Taenia crassiceps*. Parasite Immunology, 2000. **22**(6): p. 297-305.
46. Reyes, J.L., et al., *Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to Taenia crassiceps infection*. Infection, Genetics and Evolution, 2009. **9**(6): p. 1115-1127.

47. Arteaga-Silva, M., et al., *Taenia crassiceps* infection disrupts estrous cycle and reproductive behavior in BALB/c female mice. *Acta tropica*, 2009. **109**(2): p. 141-145.
48. Terrazas, L.I., et al., *Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps)*. *The Journal of parasitology*, 1998. **84**(1): p. 74-81.
49. Gaspar, E.B., Y.I. Sakai, and E. De Gaspari, *A mouse air pouch model for evaluating the immune response to Taenia crassiceps infection*. *Experimental parasitology*, 2014. **137**: p. 66-73.
50. Bouchery, T., et al., *The differentiation of CD4+ T-helper cell subsets in the context of helminth parasite infection*. *Frontiers in immunology*, 2014. **5**: p. 487.
51. Saraiva, M. and A. O'garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. *Nature reviews immunology*, 2010. **10**(3): p. 170.
52. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(9): p. 5771-5777.
53. Souza, A.J., et al., *Taenia crassiceps* antigens induce a Th2 immune response and attenuate injuries experimentally induced by neurotoxoplasmosis in BALB/c mice. *Parasitology international*, 2018. **67**(1): p. 16-22.
54. Zhang, Y., et al., *Toxoplasma gondii* Genotype Determines Tim-3 Expression Levels in Splenic and Circulatory T Cells in Mice. *Frontiers in microbiology*, 2018. **9**.
55. Mordue, D.G., et al., *Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines*. *The Journal of Immunology*, 2001. **167**(8): p. 4574-4584.
56. Saraf, P., et al., *On the determination of Toxoplasma gondii virulence in mice*. *Experimental parasitology*, 2017. **174**: p. 25-30.
57. Watson, G.F. and P.H. Davis, *Systematic review and meta-analysis of variation in Toxoplasma gondii cyst burden in the murine model*. *Experimental parasitology*, 2019. **196**: p. 55-62.
58. Morley, J.E., D.R. Thomas, and M.-M.G. Wilson, *Cachexia: pathophysiology and clinical relevance*. *The American journal of clinical nutrition*, 2006. **83**(4): p. 735-743.
59. Ahmed, N., et al., *Toxoplasma* co-infection prevents Th2 differentiation and leads to a helminth-specific Th1 response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2017. **7**: p. 341.
60. Khan, I.A., et al., *Coinfection with Heligmosomoides polygyrus fails to establish CD8+ T-cell immunity against Toxoplasma gondii*. *Infection and immunity*, 2008. **76**(3): p. 1305-1313.
61. Schlüter, D., et al., *Both lymphotoxin- α and TNF are crucial for control of Toxoplasma gondii in the central nervous system*. *The Journal of Immunology*, 2003. **170**(12): p. 6172-6182.
62. Cesta, M.F., *Normal structure, function, and histology of the spleen*. *Toxicologic pathology*, 2006. **34**(5): p. 455-465.
63. JONES, T.C., S. ALKAN, and P. ERB, *Murine spleen and lymph node cellular composition and function during cyclophosphamide and splenectomy induced resistance to Toxoplasma gondii*. *Parasite immunology*, 1987. **9**(1): p. 117-131.
64. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histología: texto y atlas. Correlacion con biología molecular y celular. 7a edición ed.* 2015, Philadelphia, PA: Wolters Kluwer.
65. Chen, X.-Q., et al., *Profiling of the perturbed metabolomic state of mouse spleen during acute and chronic toxoplasmosis*. *Parasites & vectors*, 2017. **10**(1): p. 339.
66. Dadimoghaddam, Y., et al., *Tissue tropism and parasite burden of Toxoplasma gondii RH strain in experimentally infected mice*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014. **7**(7): p. 521-524.

Anexos

Anexo 1

- Buffer de fosfatos para 10 litros y pH 7.4

80 g	NaCl	(J.T. Baker)
11.6 g	Na ₂ HPO ₄	(Fermont)
2 g	KH ₂ PO ₄	(J.T. Baker)
2 g	KCl	(J.T. Baker)
- Sustrato ABTS para revelado de ELISA
Adicionar 150 mg de ABTS 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (MP Biomedicals Inc.) en 500 ml de ácido cítrico (J.T. Baker) al 0.1% en H₂O destilada y con NaOH (Reasol), llevar a pH 4.53, realizar alícuotas de 11ml en tubos y mantener en congelación a -70°C hasta su uso.
- PBS-Tween
0.5 ml de Tween 2 (Signa-Aldrich) en 1lt de PBS, mantener en agitación por 30 minutos.

Determinación de citocinas por el método de ELISA

- Sensibilizar
 - 1) Diluir el anticuerpo de captura (Reprotech) a una concentración de 2µg/ml en 10ml de PBS. Agregar 100µl de la dilución del anticuerpo (Reprotech) a cada pozo de una placa de ELISA (Marxisorp).
 - 2) Cubrir la placa para prevenir la evaporación e incubar toda la noche a 4°C.
- Bloquear
 - 3) Llevar la placa a temperatura ambiente y remover el anticuerpo de captura, lavar 2 veces con PBS-Tween, secar y agregar 200µl de Blocking-Buffer por pozo para bloquear las uniones inespecíficas.
 - 4) Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente de 1-2 horas
 - 5) Lavar la placa 4 veces con PBS-Tween
- Curva y muestras
 - 6) Agregar los estándares de anticuerpo recombinante (Reprotech) y las muestras diluidas en PBS- BSA, 100µ por pozo.
 - 7) Cubrir la placa e incubar de 2-4 horas a temperatura ambiente toda la noche a 4°C.
 - 8) Lavar 4 veces con PBS-Tween

- Detección
 - 9) Diluir el anticuerpo biotinilado a 1 µg/ml en blocking buffer. Agregar 100 µl de la dilución a cada pozo.
 - 10) Cubrir la placa e incubar 2 horas a temperatura ambiente
 - 11) Lavar 4 veces con PBS-Tween
 - 12) Diluir la avidina o estreptavidina a 1:4000 en blocking buffer. Agregar 100 µl a cada pozo.
 - 13) Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente por 45 minutos
 - 14) Lavar 5 veces la placa con PBS-Tween
 - 15) Preparar el sustrato ABTS 20 minutos antes de su uso. Agregar 100 µl de H₂O₂ 3% a 11ml de ABTS y mezclar. Inmediatamente poner 100 µl en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente (5-30 minutos) hasta que desarrollen color.
 - 16) Leer la placa a 405 nm

Anexo 2

Histología

Fijadores

- Paraformaldehído al 10%

Paraformaldehído (Sigma)	10g
H ₂ O	90ml

Técnica de deshidratación

4 lavados con agua corriente sin agitación	15 minutos cada uno
OH-70%	45-60 minutos
OH-80%	45-60 minutos
OH-96%	45-60 minutos
OH-96%	45-60 minutos
OH-100%	45-60 minutos
OH-100%	45-60 minutos
Xilol I	1 hora
Xilol II	1 hora

Tinción H&E

Eosina acidificada	
Eosina amarillenta (metrix)	20 g
Agua destilada	500 ml
Acido clorhídrico (J.T. Baker)	10 ml

Mezclar la eosina en agua destilada, agregar el ácido lentamente por las paredes del recipiente y dejar asentar toda la noche. Lavar el precipitado bien con varios cambios de

ague pasándolo por el papel filtro. Secar el papel en el horno a 60°C durante 24 horas.
 Despues macerar el polvo de la eosina filtrado y agregar poco a poco 1000ml de alcohol de 96°C. Esta es la solución stock.

Solucion de trabajo

1 parte de eosina stock	100 ml
2 partes de alcohol del 96°C	200ml

Tren de reactivos para tinción H&E

	Desparafinado	
Xilol (J.T. Baker)		5 minutos
Xilol (J.T. Baker)		2 minutos
	Hidratación	
OH-100%		2 minutos
OH-100%		2 minutos
OH-96%		2 minutos
OH-96%		2 minutos
Lavado en agua corriente		10 lavados
	Coloración nuclear	
Hematoxilina de Harris		3-5 minutos
Lavado agua corriente		10 lavados
	Diferenciación	
Alcohol acido 1%		2 a 3 inmersiones
Lavado en agua corriente		10 lavados
	Virado	
Carbonato de litio (J.T. Baker) al 0.1%		Hasta que cambie de color
Lavado en agua corriente		10 lavados
	Coloración de citoplasma	
Eosina amarillenta		1 a 2 minutos
OH-96%		10 lavados
	Deshidratación	
OH-96%		2 minutos
OH-96%		2 minutos
OH-100%		2 minutos
OH-100%		2 minutos
	Aclarado	
Xilol (J.T. Baker)		Hasta montar
Xilol (J.T. Baker)		Hasta montar
	Montaje	
Entellan (EMD Milipore)		