

00377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL CERDO
HACIA EL METACÉSTODO DE *Taenia solium* *in situ*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

SANDRA GEORGINA SOLANO GÁLVEZ

TUTORES: DRA. PATRICIA M. TATO ZALDIVAR. Tutor principal.
DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO

2005

COORDINACIÓN

m343974





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DEL CERDO

HACIA EL METACÉSTODO DE *Taenia solium* in situ.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

SANDRA GEORGINA SOLANO GÁLVEZ

TUTORES: DRA. PATRICIA M. TATO ZALDIVAR, Tutor principal.

DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO

2005



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN


Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Solano Gálvez Sandra Georgina** con número de cuenta **99809920** y número de expediente **3991116** con la tesis titulada: "**Regulación de la Respuesta Inmune del Cerdo hacia el Metacéstodo de Taenia Solium In Situ**", bajo la dirección del(a) **Dra. Patricia M. Tato Saldivar**.

Presidente:	Dr. Juan Pedro Laclette San Román
Vocal:	Dr. José Luis Molinari Soriano
Secretario:	Dra. Patricia M. Tato Saldivar
Suplente:	Dra. Eda Scitutto Conde
Suplente:	Dr. Agustín Plancarte Crespo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 3 de mayo del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

DEDICATORIAS.

A mi familia.....

A mis hijos: Sandra Elena y Juan Pedro: porque son lo más maravilloso que Dios me ha prestado, porque han venido a alimentar con nuevos sueños y esperanzas nuestra vida. Los adoro.

A mi esposo: Lino: con todo mi amor porque en todo tiempo me ha brindado su amor, apoyo y comprensión.

A mis padres Álvaro y Susanita con todo mi amor y agradecimiento por su apoyo incondicional y por haberme enseñado el amor al trabajo y al estudio.

A mis hermanos: Álvaro, Alfredo, Ramiro y Martín con todo mi corazón:
Nuestro peligro no surge de la oposición del mundo, sino de la amistad que entablamos con el mundo y de imitar el ejemplo de aquellos que no aman a Dios ni a su verdad. La pérdida de las cosas terrenales por causa de la verdad, el padecimiento de grandes inconvenientes por mantener nuestra lealtad a los principios, no nos pone en peligro de perder nuestra fe y nuestra esperanza, pero sí estamos en peligro de sufrir una derrota al ser engañados y vencidos por las tentaciones de Satanás. Las pruebas han de trabajar en nuestro beneficio si las recibimos y sobrellevamos sin queja, y tenderán a separarnos del amor al mundo y nos conducirán a confiar más plenamente en Dios.

Sólo encontraremos ayuda en Dios. No debemos glorificarnos por nuestra fortaleza o sapiencia, pues nuestra fortaleza es debilidad y nuestro juicio, necesidad. Cristo venció al enemigo en nuestro beneficio, porque se compadeció de nuestra debilidad y comprendió que seríamos derrotados y correríamos el riesgo de perecer si no acudía en nuestro auxilio... (Manuscrito 65, 1894).

A mis sobrinos: Chelito, Daniel, Saúl, Juan Antonio, Marian, Andrés y Maram con inmenso cariño.

A la familia Gálvez Villanazul: Infinitamente gracias por su apoyo incondicional en todo momento. Dios los Bendiga.

A mi querida amiga Silvia: con todo mi cariño. Porque simplemente no me puedo imaginar sin su amistad.

A mis suegros: Con todo mi amor y agradecimiento por que sin su ayuda no hubiera podido lograr este objetivo. ¡Gracias por adorar a mis hijos!

A mis cuñadas (o): Elsa, Alma, Martita, Juan y Victor por ayudarme y querer tanto a mis hijos.

A mis sobrinos (a): Alejandra, Donita, Belen, Carlitos, Martitita, Manuelito, Anaid e Ingrid, con todo mi corazón, muchas gracias por jugar con mis hijos en mi ausencia.

A todos mis compañeros en el laboratorio: Anita, Toño, Teresita, Lilia y José muchísimas gracias por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS:

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. Patricia M. Tato Zaldivar: por su invaluable ayuda en el desarrollo del presente trabajo y por el gran apoyo recibido en todo momento.

Dr. José Luis Molinari Soriano: por su amplia disponibilidad para discutir la escritura de la tesis y por impulsarme cada día a mejorar.

A los miembros del Jurado:

Dra Patricia Tato, Dr. José Luis Molinari, Dr. Agustín Plancarte, Dr. Juan Pedro Laclette, por sus valiosos comentarios y críticas, los cuales enriquecieron el trabajo final.

Dra. Alin S. de Aluja por su valiosa colaboración en el análisis de la reacción inflamatoria para su clasificación necesario para el desarrollo del presente trabajo.

Biólogo Pedro Chávez por su valiosa colaboración en el desarrollo del trabajo experimental. CINVESTAV, IPN.

Dr. Efraín Garrido Guerrero por el gran apoyo recibido durante mi estancia en su laboratorio. CINVESTAV, IPN.

Dra. Ana María Fernández Presas por su invaluable colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

M. en C. Rosalino Vázquez López por su valiosa colaboración en la selección de las secuencias de los oligonucleótidos necesarios para el desarrollo del presente trabajo.

Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata por su apoyo en la realización de la tinción de Hematoxilina – Eosina en cortes de tejido de cerdo.

Dra. Carolina Garay por su apoyo en la realización de este trabajo.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, por la oportunidad que me ha brindado de formar parte de su comunidad y enriquecer mi vida académica y profesional.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I ANTECEDENTES	
1.1 Características del parásito	4
1.2 Ciclo de vida	5
1.3 Cisticercosis humana	6
1.4 Manifestaciones clínicas	8
1.5 Cisticercosis porcina	10
1.6 Epidemiología de la cisticercosis humana	11
1.7 Epidemiología de la cisticercosis porcina	13
1.8 Interacciones huésped parásito	14
1.9 Interacciones con la respuesta inmune celular del huésped.	15
II. HIPÓTESIS	20
III. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo general	
3.2 Objetivos particulares	
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Obtención de cerdos cisticercosos.	22
4.2 Obtención de metacéstodos de <i>Taenia solium</i> y determinación de viabilidad.	22
4.3 Estudio de la reacción inflamatoria.	22
4.4 Marcaje de oligonucleótidos para la detección de ARN mensajeros de citocinas.	23
4.5 Determinación de citocinas en la reacción inflamatoria por hibridación <i>in situ</i> .	27
V. RESULTADOS	
5.1 Clasificación de las muestras de carne de cerdo cisticercoso.	34
5.2 Patrón de citocinas en la reacción inflamatoria.	44
VI. DISCUSIÓN	53
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. BIBLIOGRAFÍA	58
IX. ÍNDICE DE FIGURAS	65

RESUMEN

Estudios realizados en modelos animales han revelado que los linfocitos y las citocinas que producen juegan un papel determinante en la evolución de las infecciones parasitarias. Dependiendo del parásito y la carga genética del huésped, los parásitos pueden inducir la polarización de la respuesta de las células T CD4⁺ hacia alguna de sus subpoblaciones, resultando esta respuesta en la resolución de la infección o la progresión de la enfermedad.

Las subpoblaciones de células T CD4⁺ han sido identificadas con base en su patrón de secreción de citocinas, las células Th1 producen interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ) y las Th2 producen interleucina 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10) y 13 (IL-13). En infecciones crónicas producidas por helmintos se ha reportado la generación de una respuesta Th2 acompañada de una disminución de la respuesta Th1. En el modelo de *Taenia crassiceps* se ha encontrado que la respuesta sistémica y la localizada que desarrollan los ratones parasitados es distinta. A nivel sistémico se observa inmunodepresión con niveles altos de IL-4 y una disminución de IL-2 mientras que, a nivel local, los granulomas tempranos se asocian a una respuesta Th1 y los tardíos, cuando el parásito está completamente destruido, a una mezcla de Th1 con niveles altos de IL-4. Al analizar lesiones de pacientes con neurocisticercosis, se encontró que a nivel local hay un predominio de citocinas pro-inflamatorias (IL-12) con presencia de citocinas Th1.

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la respuesta inmune en la reacción inflamatoria que rodea a los metacéstodos de *Taenia solium* en cerdos parasitados naturalmente. Se buscó la presencia de células Th1 y/o Th2

utilizando hibridación *in situ*. Para alcanzar este objetivo se utilizaron oligonucleótidos específicos complementarios a los ARN mensajeros de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-10 porcinos. Nuestros resultados revelaron que, en la reacción inflamatoria de los cerdos naturalmente parasitados con una reacción inflamatoria mínima alrededor del metacéstodo existe un predominio de IL-10 sobre la ausencia del resto de las citocinas. Por otro lado, en los cerdos donde la reacción inflamatoria fue mas intensa, los porcentajes de células productoras de IL10 e IFN- γ fueron semejantes (13.85% y 11.68% respectivamente). Finalmente, cuando el metacéstodo estaba completamente destruido, se mantuvo esta mezcla de citocinas Th1 y Th2 aunque con valores menores. Estos resultados nos permiten concluir, que en la reacción inflamatoria porcina el parásito desarrolló una respuesta Th2, mientras se encontraba viable y rodeado de una escasa reacción inflamatoria (grado 1). Cuando las reacciones inflamatorias se intensifican hasta grado 3 se observa una respuesta mixta Th1/Th2 *in situ*. Se detecta una diferencia significativa en la expresión de ARN mensajeros para IFN- γ entre los grados 3 y 5. Posteriormente, en las reacciones inflamatorias porcinas de los grados 4 y 5 se mantiene la mezcla de citocinas Th1 / Th2 aunque con un menor porcentaje de células positivas. Recientemente, se reportó que la implantación subcutánea de metacéstodos de *T. solium* en ratones o el tratamiento con F1 afectó la producción de citocinas por las células de bazo de estos animales estimuladas con Con A *ex vivo*. Adicionalmente, en estudios de RT-PCR se encontró que todas las células presentaban mensajeros para IFN- γ , IL-2 e IL-4 y en estudios de citometría, al estimar las citocinas intracelulares encontraron que la producción de

IL-2 e IL-4 en células CD8+ y de IFN- γ en células CD4+ de ratones implantados con metacístodos estaban significativamente disminuidas (Hernández-Mendoza *et al.* 2005).

Este es el primer trabajo que estudia la reacción inflamatoria utilizando *T. solium* y el huésped intermediario natural (el cerdo) y trata de correlacionar la respuesta inmune con el estado biológico del parásito.

ANTECEDENTES

1.1 Características del parásito

La teniosis es una infección producida por helmintos de la familia Taenidae en su fase adulta. Existen dos especies de estos gusanos que afectan a los seres humanos: *Taenia solium* y *Taenia saginata*; éstas requieren de dos hospederos intermediarios (el cerdo y la vaca, respectivamente), para completar sus ciclos de vida. El ser humano es el hospedero definitivo de ambas tenias.

La tenia se encuentra en el intestino delgado del hombre, y puede llegar a vivir hasta 25 años. El adulto de *T. solium* es un gusano plano que normalmente mide entre 1.5 y 5 m de longitud. Está constituido por una cabeza o escólex, cuello y estróbilo. El escólex posee cuatro ventosas y un rostelo coronado por dos hileras de ganchos; estas estructuras son las que fijan y permiten a la tenia mantenerse anclada a la pared del intestino. El estróbilo está formado por cientos de proglótidos y constituye la unidad de reproducción. Se distinguen 3 tipos de proglótidos: los inmaduros, cercanos al cuello, no muestran órganos sexuales diferenciados; los maduros, ubicados en la región media del estróbilo con sus órganos reproductores femeninos y masculinos bien diferenciados; y los grávidos, ubicados en la región distal, sólo muestran un útero ramificado tubular repleto de huevos.

Los huevos contenidos en los proglótidos grávidos tienen diferentes grados de madurez y contienen embriones hexacantos llamados "oncosferas" que darán lugar a nuevos parásitos. Los huevos poseen varias envolturas que hacen posible

la sobrevivencia de la oncosfera en el medio en que se encuentran. La envoltura más externa es el vitelo y es seguida del embrióforo, que protege a la oncosfera. El embrióforo es producido por una envoltura celular más profunda, llamada célula embriofoal. Finalmente se encuentra la membrana oncosferal, que rodea directamente a la oncosfera.

Si el cerdo o el hombre ingieren estos huevos, la pared externa es desintegrada por el pH ácido y las enzimas en el estómago del huésped y se activa el embrión, mismo que rompe la membrana y sale de ella. La oncosfera liberada penetra la pared intestinal y a través de los vasos sanguíneos o linfáticos es transportada al sistema muscular y nervioso, donde se desarrolla como cisticerco, que es el estado larval de la tenia (Miyasato T *et al.* 1977).

El cisticerco está constituido por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido, con un pequeño escólex invaginado. Cuando un cisticerco viable es ingerido por el ser humano, el contenido del tubo digestivo activa el escólex que evagina, y posteriormente se fija a la pared intestinal, donde se desarrolla la tenia (Slais J. 1970, Miyazato *et al.* 1977, de Aluja *et al.* 1987).

1.2 Ciclo de vida

El hombre adquiere la teniosis por el consumo de carne de cerdo parasitada con metacéstodos de *Taenia solium*. En el intestino, el proto-escólex evagina y se une a la pared intestinal haciendo uso de los ganchos y las ventosas. El parásito se desarrolla en el intestino formando segmentos llamados proglótidos. Los proglótidos gradualmente maduran desarrollando testículos y

ovarios. Los huevos son fecundados dentro de los proglótidos (hermafroditas). Los proglótidos terminales o grávidos, contienen cientos de miles de huevos y se liberan intermitentemente en las heces. El cerdo se infecta por la ingesta de huevos del parásito o proglótidos que se encuentran en las heces humanas. Los huevos en el aparato digestivo se activan por acción de los fluidos gástricos e intestinales, la oncosfera escapa del huevo y penetra en la mucosa intestinal. Poco se conoce acerca del mecanismo que utilizan las oncosferas de *Tenia* para invadir la mucosa intestinal aunque se ha demostrado que producen peptidasas de excreción / secreción, las cuales pudieran facilitar este proceso (White *et al.* 1996).

Después de la invasión, las oncosferas migran a través del torrente sanguíneo a tejidos específicos o a tejidos con alto flujo de sangre (por ejemplo: músculo y cerebro). Sin embargo, en un periodo de 3-8 semanas, éstas se alargan y maduran en cisticercos. El ciclo de vida se cierra cuando los humanos consumen carne de cerdo parasitada con cisticercos e insuficientemente cocida y desarrollan la tenia (White *et al.* 1997).

Los humanos también pueden llegar a desarrollar cisticercosis si se infectan de la misma forma que el cerdo, es decir por la ingesta de huevos en alimentos contaminados con materia fecal u ocasionalmente por retro-infección de proglótidos grávidos (Tay 2003).

1.3 Cisticercosis humana

El hombre adquiere la cisticercosis cuando ingiere huevos de *T. solium*. Las manifestaciones clínicas debido a estas parasitosis son variadas y poco específicas, dependen de la localización, el número de cisticercos y de la respuesta inmune. La enfermedad mas grave se produce cuando los cisticercos se alojan en el cerebro produciendo la neurocisticercosis (NC). La NC presenta generalmente un periodo asintomático largo (4-5 años) antes del inicio de los síntomas clínicos (Dixon y Lipscomb 1961). Durante este periodo se observa una escasa reacción inflamatoria alrededor de los cisticercos (Rabiela *et al.* 1982 Ridaura 1987). La enfermedad se manifiesta generalmente cuando el cisticerco se muere y se genera una intensa reacción inflamatoria alrededor de la larva.

Por otro lado, los cisticercos viables parecen suprimir la respuesta inflamatoria del huésped ya que, en autopsias de individuos que murieron por otras causas y que tenían cisticercos, éstos se encontraron rodeados de una mínima reacción inflamatoria (Gutiérrez 1990; Sanz 1987). Observaciones similares se han reportado en la reacción inflamatoria que rodea a cisticercos viables en músculo de cerdos (de Aluja y Vargas 1988).

Los análisis macroscópicos de cortes de cerebro de pacientes con NC parenquimatosa detectan una gran variedad de localizaciones y varios grados de infiltrado inflamatorio que pueden ir desde lesiones ligeras con intenso exudado hasta lesiones granulomatosas. En lesiones inflamatorias tempranas, los infiltrados están compuestos de grupos multifocales de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos localizados en la cápsula del tejido conectivo fibroso que rodea al parásito (Escobar y Nieto 1972). La intensidad de la reacción parece

estar asociada con el grado de daño o deterioro del parásito. Durante la etapa de hialinización y calcificación, el infiltrado inflamatorio se localiza en el interior del parásito. La etapa final de este proceso se caracteriza por la presencia de células epitelioides y células gigantes multinucleadas que persisten hasta la calcificación completa del parásito. La composición del exudado inflamatorio claramente sugiere el inicio de una respuesta inmune local hacia el parásito (de Aluja y Vargas 1988). Otras lesiones patológicas, secundarias a la respuesta inflamatoria son vasculítis, necrosis fibrinoide y necrosis isquémica de los vasos sanguíneos adyacentes, lo cual puede deberse a la deposición de complejos inmunes (Willms 1998). Los cisticercos se observan como vesículas llenas de líquido rodeadas de una pared delgada y transparente. El escólex está invaginado y aparece como un nódulo opaco de 4-5 mm de diámetro. El tamaño y la forma de los cisticercos varían por la presión que ejerce el tejido que los rodea. En el cerebro, los cisticercos son redondos con un diámetro de 1 cm aproximadamente y algunas veces se encuentran rodeados por una delgada cápsula compuesta de astrocitos y fibras de colágena (Gutiérrez 1990).

1.4 Manifestaciones Clínicas

La neurocisticercosis ha sido reconocida como la principal causa de epilepsia en varios países endémicos (Escobedo 1988; del Bruto y Sotelo 1988; García *et al.* 1993). Las manifestaciones clínicas son secundarias a la localización, número de cisticercos y respuesta inflamatoria del huésped. La mayoría de los trabajos apoyan el hecho que mientras el cisticerco se encuentra

viable está rodeado de una reacción inflamatoria muy discreta y sin infiltrado inflamatorio y que los síntomas aparecen solamente después de un periodo latente de varios años (Dixon y Lipscomb 1961). Aunque varios autores han reportado la existencia de NC asintomática, no se han publicado datos sobre su frecuencia o distribución. Sin embargo, Escobedo (1988) ha estimado que, de acuerdo a su experiencia en México, aproximadamente una tercera parte de pacientes con NC son asintomáticos.

Las manifestaciones clínicas más comunes de la NC son las convulsiones (Del Brutto y Sotelo 1988; McCormick 1985; Earnest *et al.* 1987; Shandera 1994; Carpio *et al.* 1994) que casi siempre son generalizadas. Sin embargo, pueden ocurrir también las convulsiones locales y de generalización secundaria. De acuerdo a los trabajos publicados, los pacientes con convulsiones invariablemente tienen evidencia de inflamación en estudios de neuro-imagen (por ejemplo, aumento de contraste, edema o calcificaciones) (Shandera *et al.* 1994, Ridaura 1987, Gardner *et al.* 1984, Mitchell y Crawford 1988). La tomografía computarizada o las imágenes de resonancia magnética muestran lesiones aumentadas con un área central hipodensa o lesiones calcificadas. Algunas veces el escáner revela áreas focales aumentadas que frecuentemente se resuelven sin tratamiento.

Aproximadamente 20% de los casos de NC presentan cisticercos en los ventrículos (McCormick 1985; Shandera *et al.* 1994; Carpio *et al.* 1994; Bandres *et al.* 1992). La NC ventricular comúnmente presenta hidrocefalia debido a la obstrucción de la circulación del líquido cefalorraquídeo, generalmente requiere

intervención quirúrgica y puede ser fatal (Bandres *et al.* 1992; Estañol *et al.* 1983). La hidrocefalia aguda es un síndrome que se caracteriza por el aumento de la presión intracraneal, dolor de cabeza, vómito, visión débil, mareo e irregularidad en la coordinación (Willms 1998).

Los pacientes que cursan con enfermedad parenquimal tienen un buen pronóstico y no necesitan someterse a tratamiento anti-parasitario (Carpio *et al.* 1994; Mitchell y Crawford 1988; Gardner *et al.* 1984). En la literatura reciente se reporta un incremento de casos de NC como causa de enfermedad neurológica autolimitada (Chandy *et al.* 1989; Rajshekhar 1991).

Las manifestaciones menos frecuentes de la NC incluyen cisticercos en las meninges basales (con meningitis crónica o hidrocefalia comunicativa), lesiones en la espina dorsal e infartación localizada (Del Brutto y Sotelo 1988; McCormick 1985; Shandera *et al.* 1994). Los cisticercos también pueden ser causa de sintomatología en los ojos, tejido subcutáneo y músculo (Del Brutto y Sotelo 1988; McCormick 1985; Cárdenas *et al.* 1992).

1.5 Cisticercosis porcina.

La historia natural de la cisticercosis porcina es poco conocida. Pocos días después de la infección experimental de los cerdos, las oncosferas producen lesiones hemorrágicas focales en el hígado e infiltrado con eosinófilos que eventualmente llegan a ser fibrosas (de Aluja 1994). Cuatro semanas después de la infección, pequeñas vesículas (0.3 cm) se pueden encontrar en el músculo esquelético, pero el escólex y el sistema canalicular no están completamente

desarrollados. Seis a ocho semanas mas tarde, el tamaño de las vesículas varía de 0.6 - 0.8 cm de largo y todas las estructuras están completamente formadas. Después de un periodo variable de tiempo y dependiendo de ciertos factores, la mayoría de las larvas degeneran. Este proceso puede ser influenciado por el estado de nutrición ya que parece que ocurre más rápidamente en los animales bien alimentados que en animales desnutridos. El fluido vesicular llega a ser, más tarde, turbio y gelatinoso (forma coloidal) y la larva se rodea por una reacción inflamatoria caracterizada por la presencia de neutrófilos, linfocitos y numerosos eosinófilos. Las células inflamatorias entonces penetran la vesícula a través del tegumento, e invaden el canal espiral. Todo lo anterior correlaciona con la clasificación de las lesiones generadas en la larva de *T. solium* en grados del 0 al 6 clasificó las lesiones generadas por la etapa larvaria de *T. solium* en tejido de cerdo en grados desde 0 hasta 6 de acuerdo a la intensidad de la respuesta inflamatoria, a la degeneración de la larva y a la sustitución por tejido de cicatrización (de Aluja y Vargas 1988).

1.6 Epidemiología de la cisticercosis humana

Las condiciones sociales, económicas y culturales están intrínsecamente vinculadas con esta zoonosis, ya que en cada una de las etapas del ciclo de vida del parásito existen actividades humanas que tienen que ver con su reproducción. En primer lugar, dado que la teniosis es una enfermedad exclusiva del hombre, éste es el único responsable de la dispersión de los huevos del parásito. El hábito de defecar al aire libre o la inadecuada eliminación de excretas es la principal

práctica de riesgo, aunque la crianza de cerdos que tolera o promueve el contacto de éstos con el excremento humano también es un factor importante. La falta de control sanitario de la carne de cerdo y los hábitos de alimentación (que incluyen el consumo de carne poco cocida o cruda) son causas que contribuyen a la teniosis. Finalmente, la ausencia de higiene personal, especialmente el hecho de no lavarse las manos antes de comer y/o después de ir al baño, o el consumo de agua y de alimentos contaminados con materia fecal, son hábitos que permiten la ingestión de huevos por el hombre y causan la cisticercosis (Schantz y Sarti 1989; Sarti 1997a, 1989; Schantz 1991; Sarti *et al.* 1992a, 1989, 1992b, 1994; Correa *et al.* 1994; Díaz *et al.* 1990).

La cisticercosis humana es un problema de salud pública en varios países en Asia, Europa Oriental y América Latina (Flisser *et al.* 1997). Sin embargo, también se han detectado casos en países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica, aunque su ocurrencia es esporádica y local (Earnest *et al.* 1987; Schantz *et al.* 1992).

En México, hay regiones donde las condiciones socioeconómicas y culturales propician la transmisión y el mantenimiento de esta parasitosis. La neurocisticercosis ocupa un lugar preponderante entre las enfermedades del Sistema Nervioso Central (SNC). Mediante el análisis de casos de autopsia, se ha reportado una prevalencia de alrededor del 2% (Villagran y Olvera 1989). En estudios recientes, empleando la técnica de IET (inmuno-electrotransferencia), se han reportado sero-prevalencias de 4.9 - 22.6% en América Latina (Schantz *et al.* 1994; Sarti *et al.* 1994; Tsang *et al.* 1995). En México, a partir de 1979, la

cisticercosis es una enfermedad de notificación obligatoria, lo que ha permitido tener datos epidemiológicos más confiables de esta parasitosis, pese a que la subnotificación sigue siendo uno de los problemas principales para la valoración de la enfermedad (Sarti 1989; Sarti *et al.* 1997).

1.7 Epidemiología de la cisticercosis porcina

La prevalencia se calcula en base a los cerdos que llegan a los rastros y no refleja la de los animales criados y sacrificados rústicamente. La crianza de traspatio corresponde hasta el 60% de la porcicultura e informa una tasa cruda anual de 0.22 por cada 100 cerdos (1991). Por otro lado, los estudios epidemiológicos indican frecuencias de 1.4 - 4 por cada 100 cerdos diagnosticados por inspección visual o palpación de lengua y por la presencia de anticuerpos anti-cisticerco (mediante la prueba IET) de 4.1 a 7.0 por cada 100 cerdos (Sarti *et al.* 1992a,1992b).

Estudios epidemiológicos de cisticercosis porcina han mostrado que a mayor edad mayor tasa de cisticercosis, con un pico máximo a los 11 meses de edad, probablemente como consecuencia del aumento de exposición al parásito. Se ha demostrado que desde los 2 meses se pueden descubrir huellas que dejan el paso de las larvas por el hígado, y a los 4 meses se localizan cisticercos en el músculo. También se ha observado que un mayor número de lechones de 2 meses se infectan en la época de sequía, cuando hace mucho calor (de Aluja 1994).

1.8 Interacciones huésped-parásito.

La relación entre los helmintos y sus huéspedes es compleja e interesante (Molinari JL y Tato P 2002). Para persistir en los tejidos del huésped, los cisticercos requieren de diversos procesos para adquirir nutrientes. Desde el momento en que los cisticercos maduran en los tejidos, necesitan de aminoácidos del huésped para producir proteínas estructurales. La pared de la larva del cisticerco de *Taenia crassiceps* contiene vesículas pinocíticas que transportan las proteínas del huésped al interior del fluido del cisticerco. Algunas de estas vesículas llegan a fusionarse con lisosomas, sugiriendo que las proteasas ácidas podrían estar involucradas en digerir el material del huésped. Se sabe que los parásitos desencadenan respuestas inmunes en sus hospederos y que son capaces de evadirlas mediante distintos mecanismos, como consecuencia, los parásitos pueden sobrevivir por largos períodos de tiempo en los hospederos inmunocompetentes (Threadgold y Dunn 1983).

Kalinna y McManus (1993) aislaron de *T. crassiceps* un receptor similar al Fc de las IgG y se identificó como paramiosina. Una interpretación de este dato es que la paramiosina es una molécula fuertemente cargada que se puede unir con baja afinidad a las proteínas del huésped y facilitar la endocitosis. Se ha demostrado que la paramiosina del parásito inhibe la vía clásica del sistema de complemento al unirse a C1q, proveyendo al cisticerco de un mecanismo para resistir el daño del complemento dependiente de anticuerpos (Laclette JP *et al.* 1987).

Después de la incorporación de las proteínas del huésped al fluido vesicular, éstas son ligeramente degradadas (Ambrosio *et al.* 1994; Damián 1987; Hayunga *et al.* 1989). Además se han identificado varias proteasas, localizadas principalmente en la pared del cisticerco (White *et al.* 1992). En *T. crassiceps* la degradación de las IgG parece estar mediada por cisteína proteasas (White *et al.* 1998)

1.9 Interacciones con la respuesta inmune celular del huésped.

Una de las funciones más importantes del sistema inmune es proteger a los organismos contra enfermedades infecciosas. Dado que una sola respuesta no puede ser efectiva contra todos los patógenos, la diversidad de los mecanismos efectores y su regulación son absolutamente esenciales para la supervivencia del huésped (Mossman y Sad 1996; Reiner y Seder 1995; Abbas *et al.* 1996).

Los linfocitos del huésped y sus citocinas juegan un papel determinante en la evolución de las infecciones parasitarias. La identificación de subpoblaciones de células T CD4⁺ funcionalmente distintas llamadas Th1 y Th2 (Mossman *et al.* 1986) que producen diferentes patrones de citocinas, ha permitido entender mejor la relación huésped-parásito. Se considera que las células Th1, que secretan interferón-gamma (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) están involucradas en la respuesta inflamatoria mediada por macrófagos mientras que, las citocinas derivadas de células Th2 (productoras de IL-4, IL-5 e IL-10) fomentan la producción de anticuerpos (incluyendo la respuesta de IgE), promueven la proliferación de células cebadas y la función de los eosinófilos (Mossman y Sad

1996; Reiner y Seder 1995; Abbas *et al.* 1996). En estudios realizados con el receptor de células T (TCR) en ratones transgénicos se ha demostrado claramente que el micro-ambiente de citocinas presente durante la activación temprana de las células T determina el perfil de citocinas dominante. Así, se ha mostrado que la IL-12, derivada de células presentadoras de antígeno, promueve la diferenciación de células T hacia una respuesta de fenotipo Th1, mientras que IL-4, que es producida en una respuesta temprana por células cebadas, basófilos y/o subpoblaciones de CD4⁺ NK1.1⁺ y/o NK1.1⁻, (Nishimura *et al.* 1997) favorece el desarrollo de una respuesta de fenotipo Th2 (Mossman y Sad 1996; Reiner y Seder 1995; Abbas *et al.* 2003). De acuerdo a este esquema, la diferenciación de células Th a partir de sus precursores está regulada por el balance de IL-4 e IL-12 que se encuentra al inicio de la respuesta. Se ha inferido la polarización de las respuestas inmunes hacia Th1 o Th2 *in vivo* a partir de la observación de que las citocinas producidas por células Th2 (IL-4, IL-10) inhiben la inducción de respuestas Th1 mientras que, citocinas derivadas de Th1 (principalmente IFN- γ) son capaces de contrarrestar el desarrollo de células Th2 (Mossman y Sad 1996; Reiner y Seder 1995; Abbas *et al.* 1996).

Se han desarrollado modelos animales para estudiar las interacciones huésped-parásito en cisticercosis. Así, células de bazo de ratones implantados con metacístodos de *T. solium* en la cavidad peritoneal mostraron respuestas deprimidas hacia la Con A (Willms *et al.* 1980). Estudios en ratones infectados con *T. crassiceps* mostraron que las respuestas inflamatorias tempranas estaban asociadas a respuestas Th1 (IFN- γ e IL-2) mientras que en granulomas, en los

cuales el parásito estaba completamente destruido, se encontró una mezcla de respuesta Th1 e IL-4 (Robinson *et al.* 1997). Terrazas *et al.* (1998), y Toenjes *et al.* (1999) reportaron una activación secuencial de las respuestas Th1 y Th2 y respuestas mixtas Th1/Th2 en cisticercosis murina por *T. crassiceps*. Interesantemente, en estas infecciones se ha encontrado un incremento significativo de IL-10 en infecciones tanto tempranas (2-4 semanas) como tardías (16 semanas) (Terrazas *et al.* 1998). Resultados mas recientes mostraron un aumento inicial de la producción de IL-4 en células de ratones estimuladas con Con A, 24 h después de la infección con *T. crassiceps* y una producción predominante de citocinas Th2 a los 7 días de infección (Toenjes y Kuhn 2003).

Letonja y su grupo (1987) observaron que, el plasma de ratones infectados con *Taenia taeniaeformis* suprimía las respuestas proliferativas de células de bazo de ratones no infectados hacia la Con A y sugirieron la presencia de factores supresores en el plasma de estos animales. Igualmente, se ha reportado que factores liberados *in vitro* por larvas de *T. crassiceps* obtenidas de infecciones tempranas (10-30 días) tienen la habilidad de inhibir las respuestas proliferativas de células T y la producción de IFN- γ e IL-4 pero no de IL-10 (Spolski *et al* 2000).

Los metacéstodos de *T. solium* producen sustancias inmunosupresoras que regulan la respuesta inmune del huésped. Dentro de estas sustancias está la paramiosina que inhibe la activación del complemento por vía clásica; el factor de metacéstodos que inhibe la proliferación de linfocitos estimulados con Con A, la producción de citocinas por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y la reacción inflamatoria

alrededor del parásito; y las cisteína proteasas que digieren IgG humana y que in vitro disminuyen la cantidad de CD4⁺ e inducen apoptosis en estas células (Laclette *et al.* 1992; Tato *et al.* 1995; Molinari *et al.* 1990; Tato *et al.* 2004). Otros mecanismos de evasión de la respuesta inmune por este parásito que se han descrito son la presencia de un componente que une inmunoglobulinas y de fragmentos Fc en extractos crudos de metacéstodos (Mandujano *et al.* 1990) y la presencia en productos de excreción/secreción de una sustancia que afecta la viabilidad de los eosinófilos (Medina y Escutia 1992; Alvarado y Rodríguez 1995). Todas estas sustancias pueden contribuir a la persistencia del parásito en el huésped.

Se ha reportado que cerdos cisticercosos tienen disminuido el número de células T CD4⁺ en sangre periférica y que, esta disminución es inversamente proporcional al número de cisticercos encontrados después del sacrificio de los animales. (Molinari *et al.* 1987). Por otro lado, estudios de patología muestran que los cisticercos extraídos de músculo que son viables están rodeados de una reacción inflamatoria discreta compuesta por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas y eosinófilos. Esto sugiere que, mientras el metacéstodo está viable regula la respuesta del huésped inhibiendo la inflamación. Sin embargo, los cerdos natural o experimentalmente infectados con *T. solium* fueron capaces de eliminar su infección si eran estimulados con una vacuna preparada con antígenos de metacéstodos, estos antígenos indujeron una reacción inflamatoria intensa alrededor de los cisticercos que fue capaz de destruirlos. Esta reacción inflamatoria estaba principalmente constituida por eosinófilos aunque se

observaban algunos macrófagos, linfocitos y células plasmáticas (Molinari *et al.* 1983a y 1983b).

Con base en estos antecedentes, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar los perfiles de citocinas encontrados en la reacción inflamatoria del músculo que rodea a los metacéstodos viables y en diferentes estados de destrucción con el fin de entender mejor los procesos inmunes que permiten la permanencia del parásito en el huésped o su eliminación.

HIPÓTESIS

El estado inmune del huésped intermediario en la cisticercosis se correlaciona con el grado de inflamación y el daño estructural del parásito.

Esta hipótesis se verificará estudiando el perfil de citocinas en cada grado inflamatorio cuyo resultado dará una secuencia de la historia inmunológica en la cisticercosis porcina.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de citocinas Th1 y Th2 en las reacciones inflamatorias que rodean a los metacéstodos en cerdos cisticercosos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Clasificar las reacciones inflamatorias de los cerdos cisticercosos de acuerdo al criterio de Aluja y Vargas (1988).
2. Determinar la viabilidad de los metacéstodos en estos cerdos.
3. Determinar la integridad estructural de los parásitos de los cerdos.
4. Determinar el perfil de citocinas producido por las células de la reacción inflamatoria que rodea al parásito en cerdos naturalmente parasitados utilizando la técnica de hibridación *in situ*.
5. Correlacionar los patrones de mensajeros de citocinas con el estado biológico del parásito (viabilidad e histopatología).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de cerdos cisticercosos

Los cerdos cisticercosos se consiguieron en una zona endémica en el estado de Guerrero y en el rastro de la Ciudad de Toluca en México.

2. Obtención de metacéstodos de *Taenia solium* y determinación de viabilidad.

Los metacéstodos se obtuvieron por disección de los músculos de carne de cerdo parasitada. Se determinó la carga parasitaria (número de parásitos / kg de carne) y la viabilidad de los parásitos, utilizando la técnica de evaginación (Cañedo, Laclette y Morales, 1982). Brevemente, la viabilidad se determinó al incubar por 4h, 20 metacéstodos en 20 ml de medio RPMI 1640 (Sigma) que contenía glucosa (1 μg /ml) y tripsina (0.5 μg /ml) a 37°C y 5% de CO₂. Los metacéstodos viables evaginaron y mostraron movilidad en su tegumento.

Los metacéstodos que se utilizaron para las pruebas de evaginación se disecaron cuidadosamente para evitar los tejidos del huésped, mientras que, los utilizados para estudiar la reacción inflamatoria se extrajeron en bloques 1.0 – 1.5 cm con el tejido del huésped que los rodeaba.

3. Estudio de la reacción inflamatoria.

Preparación de las muestras de tejido

Las muestras de tejido tanto para estudios patológicos como para hibridación *in situ* se prepararon por métodos histoquímicos. Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS - DEPC por 4 h, a 4°C, se lavaron con PBS y deshidrataron con alcoholes al 50% hasta 100% (una hora en cada uno de los alcoholes) y en agitación. Posteriormente, se aclararon con xileno para después proceder al tratamiento con parafinas e incluirlas en esta misma.

Las muestras se cortaron con 5 µm de grosor y se desparafinaron a 60°C durante toda la noche. Después se sumergieron en xileno durante 1 h para posteriormente hidratarse con los alcoholes desde 100% hasta 50% y terminar con PBS 7.2.

Unas muestras se tiñeron con hematoxilina – eosina para determinar el grado de la reacción inflamatoria y analizarlas de acuerdo a la clasificación de De Aluja y Vargas (1988). Otras fueron procesadas para estudiar los perfiles de citocinas por hibridación *in situ*.

4. Marcaje de oligonucleótidos para la detección de ARN mensajeros de citocinas.

Obtención de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en pruebas de hibridación *in situ* deben ser pequeños para tener una buena penetración y de cadena única para prevenir que la sonda rehibride. Las sondas de ADN para la detección de secuencias específicas de ARN mensajeros (ARNm) de las diferentes citocinas porcinas en los cortes de tejido fueron sintetizados por Lakeside (Boehringer Mannheim). Las

secuencias de las sondas de las citocinas que se detectaron, así como, la del gen constitutivo que actuó como control positivo se obtuvieron a partir de secuencias de ARNm de citocinas de cerdo reportadas en la literatura y en el Gene-Bank y apoyándonos en el programa "Primer" para selección de las mejores secuencias. Se eligieron 2 secuencias de 30 nucleótidos cada una para cada citocina que se deseaba estudiar. Los controles negativos fueron 2 oligonucleótidos de 30 bases cada uno que pertenecían a la secuencia del Virus de Papiloma humano.

Se marcaron los oligonucleótidos mediante un procedimiento no radiactivo con un hapteno de digoxigenina (Dig-Oligonucleotide-Tailing-Kit). La marca se introdujo enzimáticamente a través de la enzima terminal transferasa por la incorporación de varias moléculas de digoxigenina en el extremo 3'. Para la generación de sondas de oligonucleótidos marcados se utilizó una mezcla de deoxinucleótidos-trifosfato (dNTP) y DIG-dUTP en una reacción independiente del templado. Se estima que 4-5 moléculas de digoxigenina-dUTP modificadas se incorporan en el extremo 3' del oligonucleótido. Como resultado de la densidad del marcaje por cada 10-12 bases (mer) se tiene un nucleótido marcado.

Las secuencias seleccionadas fueron las siguientes:

IFN- γ (Vandenbroeck y col. 1991)

5'-AGAGGTCCACCATTAGGTAC -3'

5'-TAGTCTGACTTCTCTTCCGC -3'

IL-2 (Inumaru y Takamutsu, 1995).

5'- CATAGTGCTTGGCCAACAGA -3'

5'- GCCGCTGTGTCATTACTGTT -3'

TNF- α (Choi y col. 1991)

5'- AGCAACCTACAGTTCAGCTC -3'

5'- CACTGAGTCGATCATCCTTC -3'

IL-10 (Blanco y col 1995)

5'- AGTTGGCTCCTGAAGGAACA -3'

5'- AGTCGTCATCCTGGAAGGTT -3'

GAPDH (Control positivo)

5'- TGATGGTACATGACGAGGCA -3'

5'- ACAACCTGGTCCTCAGTGTA -3'

VPH (Control negativo)

p16-1 5'-AAGGGCGTAACCGAAATCGGT -3'

p16-2R 5'-GTTTGCAGCTCTGTGCATA -3'

Marcaje de oligonucleótidos con DIG-dUTP.

La enzima transferasa terminal (Lakeside) se usó para adicionar una mezcla de dUTP y dATP en el extremo 3' de un oligonucleótido en una reacción independiente del templado (Schmitz *et al.* 1990). En la reacción de marcaje, las concentraciones de dUTP marcado y dATP sin marcar se ajustan para generar la incorporación más alta de haptenos, el espaciamiento óptimo del hapteno y la mayor sensibilidad. Este procedimiento produce una cola en un rango de longitud de 10-100 nucleótidos (promedio 50) con un promedio de 5 moléculas marcadas

de dUTP. Alternativamente, este procedimiento se puede modificar mediante la adición de 2-3 moléculas marcadas de dUTP, sin intervención de dATP.

Valoración de la eficiencia del marcaje con digoxigenina por Dot-Blot.

Con la finalidad de analizar la eficiencia del marcaje de los oligonucleótidos y calcular su concentración, se realizó la comparación de nuestros oligonucleótidos con un estándar para detección de ácidos nucleicos marcados con digoxigenina (Lakeside) a una concentración conocida del oligonucleótido marcado (2.5 pmol/ μ l). Brevemente, se depositó 1 μ l de cada oligonucleótido por analizar en una membrana de nylon con sus correspondientes controles negativo (oligonucleótido no marcado) y positivo (oligonucleótido marcado con digoxigenina a una concentración de 1250 μ g/50 μ l). Se fijaron los ácidos nucleicos a la membrana de Nylon en horno durante 2 h a 80°C y se incubó en amortiguador 1 (100mM Tris-HCl pH 7.5 que contenía 150mM NaCl = TN) por 2 min. Posteriormente con una solución bloqueadora al 5% por 30 min a temperatura ambiente (Lakeside) se bloquearon los sitios en los que no había oligonucleótidos, después de este tiempo se adicionó el anticuerpo anti-digoxigenina a una dilución 1:5000 en solución de bloqueadora. Se lavó la membrana de nylon con amortiguador 1 TN (Tris-HCl 100mM pH 7.5 y NaCl 150mM) 2 veces durante 5 min cada vez. Después se incubó en amortiguador 3 (Tris-HCl 0.1M pH 9.5, NaCl 0.1M y MgCl₂ 0.05M) durante 5 min, se reveló la reacción de color con la solución de enzima-cromógeno NBT/BCIP y finalmente se detuvo la reacción con Tris-EDTA pH 8.0.

5. Determinación de citocinas en la reacción inflamatoria por hibridación *in situ*.

Preparación de portaobjetos para estudios de hibridación in situ

Diversos portaobjetos se sumergieron en una solución de silano [3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma)] al 2% en acetona durante 60 min, se lavaron 2 veces por 10 min cada vez en agua destilada y se mantuvieron a 37°C toda la noche. Estos portaobjetos se pueden almacenar por varios meses en condiciones libres de humedad y polvo hasta su uso.

Preparación de las muestras de tejido

Tejidos con las reacciones inflamatorias como se describió anteriormente se capturaron en los portaobjetos preparados con silano. Las preparaciones se desparafinaron, hidrataron y utilizaron para determinar los mensajeros de citocinas que se encontraban en la reacción inflamatoria por hibridación *in situ*.

Detección de ARNm con sondas marcadas.

La detección de mensajeros con sondas marcadas se realizó en los tejidos siguiendo cuatro pasos (prehibridación, hibridación, posthibridación y detección inmunológica), siguiendo la metodología descrita por Komminoth (1996).

Prehibridación

Una incubación de prehibridación es necesaria para prevenir el fondo de la tinción. La mezcla de prehibridación contiene todos los componentes de la mezcla de hibridación excepto la sonda y el dextrán sulfato. Los cortes se hidrataron de forma gradual en alcoholes en rangos 100 – 70% y luego se incubaron en PBS (NaCl 140mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1.8mM). Posteriormente, se les trató con proteasas, para incrementar la accesibilidad de la sonda, ya que digiere la proteína que rodea al ácido nucleico de la muestra. Para digerir la muestra, se incubaron las preparaciones con proteinasa K (10µg/m) en una solución de Tris 10mM pH 7.5. Después, las preparaciones se incubaron en PBS que contenía glicina al 0.2 % para bloquear la actividad de la proteasa y otra vez con PBS (2 veces durante 5 min cada vez). Se trataron los cortes con trietanolamina y anhídrido acético; esta reacción de acetilación le resta cargas positivas tanto al tejido como al portaobjetos y esto hace que se reduzca el fondo de la reacción (Hayashi *et al.* 1978). Se incubaron las preparaciones en PBS y se deshidrataron en alcoholes al 70, 90 y 100% para dejarlos secar durante 1 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz, el propósito de este paso es que los cortes estén completamente secos para que el tejido absorba la solución de hibridación cuando sea aplicada. Se cubrieron los cortes perfectamente con solución de prehibridación (SSC 4X, dextran, solución denhardtts 1X, EDTA 2mM, formamida al 50%, 500ug/ml ADN de esperma de salmón, agua-DEPC). Desnaturalizar el ARN del tejido por calentamiento durante 5-10 min a 92°C y

enfriamiento posterior en hielo durante 10 min. Finalmente los cortes se prehibridan por 1–2 h a 65°C en una cámara húmeda (SSC2X + 15% de formamida).

Hibridación in situ

La hibridación depende de la habilidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse con una cadena complementaria, justo por debajo de su punto de disociación (T_m). La T_m es la temperatura a la cual la mitad del ADN está presente en forma de una sola cadena (desnaturalizado) y su valor varía para el ADN genómico aislado de varios organismos, por ejemplo, para *Pneumococcus* es de 85°C, y el de *Serratia* es de 94°C. La temperatura media puede calcularse midiendo la absorción de luz ultravioleta a 260 nm. La estabilidad del ADN es directamente proporcional al contenido de G-C. Las cadenas de ADN con gran cantidad de pares de G-C requieren temperaturas en promedio mas altas para lograr una buena hibridación. La T_m y la hibridación del ADN son influenciados principalmente por cuatro parámetros:

Temperatura: El máximo rango de renaturalización (hibridación) del ADN es de 25°C. Sin embargo, el rango de hibridación relacionado con la curva en forma de campana y la temperatura es amplio con un máximo de 16 a 32 °C por debajo de la T_m .

pH: En pHs de 5 - 9, el rango de la renaturalización es casi independiente de esta variable.

Concentración de cationes monovalentes: Los cationes monovalentes (por ejemplo; iones sodio) interactúan electrostáticamente con los ácidos nucleicos (principalmente con los grupos fosfato) de tal manera que, la repulsión electrostática entre las dos cadenas del duplex disminuye cuando se incrementa la concentración de sal. Por lo tanto, las bajas concentraciones de sodio afectan la T_m , así como también el rango de hibridación, drásticamente.

Presencia de solventes orgánicos: La formamida ha sido el solvente orgánico de elección durante años. Este reduce la temperatura media de los híbridos ADN-ADN y ADN-ARN en una forma lineal de 0.72°C por cada porcentaje de formamida. Además la hibridación puede realizarse a $30-45^\circ\text{C}$ con un 50% de formamida presente en la mezcla de hibridación. El rango de hibridación decrece en presencia de formamida. La temperatura media de los híbridos en presencia de formamida puede calcularse de acuerdo a la siguiente ecuación:

Para $0.01 - 0.2\text{M}$ de Na^+ :

$$T_m = 16.6 \log M + 0.41 (\text{GC}) + 81.5 - 0.72 (\% \text{ formamida}).$$

Para concentraciones de Na^+ por arriba de 0.4M :

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\text{GC}) - 0.72 (\% \text{ formamida}).$$

M = concentración molar de sal

GC = porcentaje molar de Guanina-Citocina.

Para llevar a cabo la hibridación, las preparaciones se cubren con solución de hibridación que contiene SSC 4X, Dextran Sulfato al 10%, Solución Denhardtts 1X, EDTA 2mM, Formamida al 50%, ADN de esperma de salmón 500ug/ml, agua-

DEPC y oligonucleótidos marcados con digoxigenina (cada sonda se utilizó a una concentración de 50ng por corte de tejido).

Nota: la solución de SSC 20X contiene citrato de sodio 0.3M y NaCl 3M pH 7.0.

Para hibridación *in situ*, el ARN de la muestra y la sonda deben ser desnaturalizados a 80-90°C por 5-10 min en un horno de calor seco y posteriormente enfriada la preparación sobre hielo durante 10 min. Después, se deja hibridando toda la noche a 65°C en una cámara húmeda en (SSC 2X + 15% de formamida). En solución acuosa, el dextran sulfato está fuertemente hidratado y las macromoléculas no tienen acceso al agua de hidratación, lo cual causa un aparente incremento en la concentración de la sonda y como consecuencia los rangos de hibridación son más altos. Las sondas u oligonucleótidos marcados corresponden a las citocinas: IL-2, IL-10, IFN- γ , TNF- α y a los controles GAPDH (Glyceraldehido – 6 – fosfato deshidrogenasa) como positivo y una sonda irrelevante como control negativo (Virus Papiloma Humano, VPH). Cada sonda se utilizó a una concentración de 50ng por corte de tejido.

Nota: la solución de SSC 20X contiene citrato de sodio 0.3M y NaCl 3M pH 7.0.

Posthibridación

Se lavaron los cortes 2 veces con SSC 2X, 5 min cada vez. Se trató el tejido con RNAsa "A"(100ug/ml) en amortiguador (Tris HCl 0.01M pH 7.5 y NaCl 0.015M) durante 30 min a 37°C para degradar el ARN de cadena sencilla que hubiera quedado sin hibridar. Se lavaron las preparaciones con SSC 2X, 30 min a 37°C y dos lavados de 10 min a 65°C con formamida al 60% para despegar el

oligonucleótido unido inespecíficamente y finalmente con SSC 2X a temperatura ambiente.

La sonda marcada puede hibridar inespecíficamente con secuencias parcialmente homologas a la secuencia de la sonda. Tales híbridos son menos estables que los híbridos perfectamente apareados y se pueden disociar con lavados de varias astringencias. La astringencia de los lavados puede ser manipulada variando la concentración de formamida, la concentración de sal y la temperatura. Por lo general, los lavados que contienen SSC 2X y formamida al 50% son suficientes. Se recomienda hibridar astringentemente mas que lavar astringentemente.

Detección Inmunológica de mARN para citocinas.

Primeramente, se equilibraron los tejidos en solución de TN (Tris-HCl 100mM pH 7.5 y NaCl 150mM) y se bloquearon con suero normal de cerdo (Gibco) por 30 min a temperatura ambiente, en cámara húmeda. Se realizó un segundo bloqueo con mezcla bloqueadora (Roche DIG Nucleic Acid Detection Kit) al 5% disuelto en TN durante 1 h a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Los cortes de tejido se pusieron en contacto con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP) en una dilución 1:250 disuelto en solución bloqueadora al 5% y a 4°C toda la noche en cámara húmeda. Se realizaron 2 lavados de 10 min cada uno con TN y Tween 20 al 0.3% a temperatura ambiente para quitar el exceso de anticuerpo y se incubaron las muestras en amortiguador 3 (Tris-HCl 100mM pH 9.5, NaCl 100mM, MgCl₂

50mM). Posteriormente, se desarrolló la reacción de color mediante la catálisis de la enzima sobre el 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato (X-fosfato) y una sal: Nitro azul de Tetrazolium que produce un precipitado azul insoluble con el cual se visualiza la molécula híbrida de ARNm en el citoplasma de la célula. Después se incubó en la oscuridad y en cámara húmeda durante 16 h, monitoreando cada 15 min el avance de la reacción colorimétrica. Finalmente, se detuvo la reacción de color sumergiendo las muestras en Tris-EDTA pH 8.0, se contratificaron los tejidos con el colorante Rojo Rápido Nuclear (disuelto en Sulfato de Aluminio al 5%) durante 7-10 min, se eliminó el exceso de colorante en agua destilada y las muestras se deshidrataron en alcoholes al 70, 80, 90 y 100% sucesivamente por 2 min cada vez. Se sumergieron los tejidos en una solución de xileno por 15 min para después cubrir la preparación con solución de montaje base xileno de Fisher, se protegió la preparación con un cubreobjetos y se secó para observarlas al microscopio.

RESULTADOS

Clasificación de las muestras de carne de cerdo cisticercoso.

Los tejidos con las reacciones inflamatorias de cerdos cisticercosos se agruparon siguiendo la clasificación de Aluja y Vargas (1988). De acuerdo a éste criterio los tejidos se distribuyeron en 4 grados: 1, 3, 4 y 5.

Grado 1: Una de las muestras correspondió a este grupo. Ésta mostró una reacción inflamatoria localizada y discreta, compuesta principalmente por linfocitos y células plasmáticas y en menor proporción por eosinófilos. En cortes representativos de este cerdo, se observó una reacción inflamatoria discreta que no ha rodeado totalmente al parásito así como la integridad de las estructuras del metacéstodo. No se observó infiltración de células inflamatorias en el canal espiral (Fig. 1A, B, y C). Se encontraron escasas células inflamatorias en contacto con la vesícula del parásito (Fig. 1C). La reacción inflamatoria compuesta de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos se puede observar en la Figura 2A, B, C, D, E y F. Aquí las células se encontraron inmersas en una red de tejido conectivo. El exudado inflamatorio que se encontró en contacto con la vesícula del parásito fue mas abundante en eosinófilos (Fig. 3A y B). La viabilidad de estos cisticercos fue del 90 al 100% (Tabla 1).

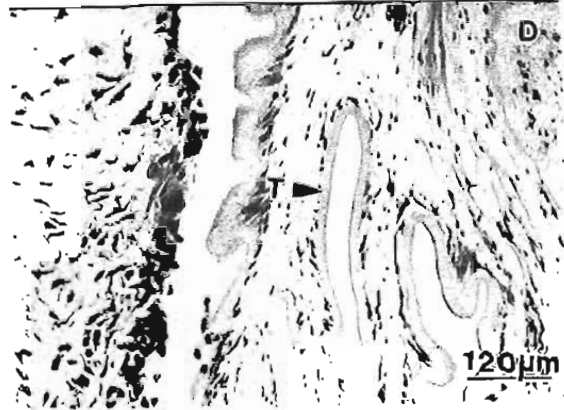
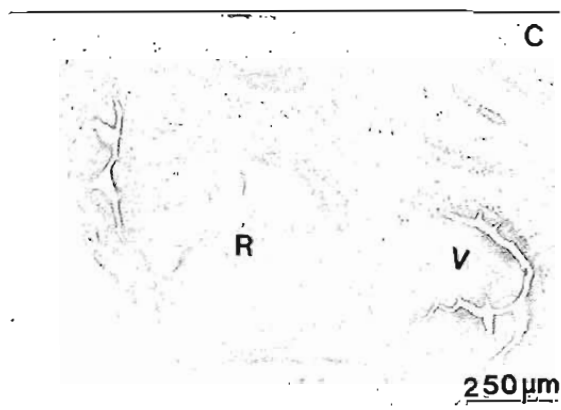
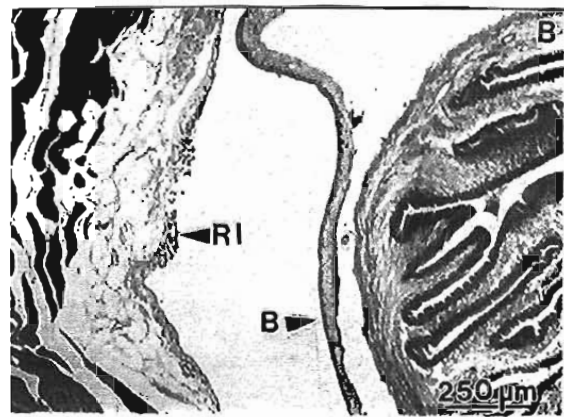
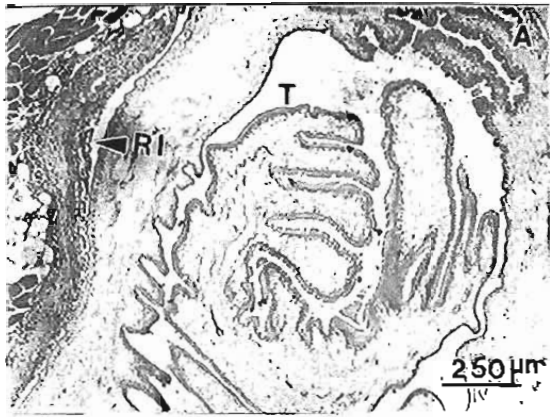


Figura 1. Cisticercos de *Taenia solium* obtenido de cerdo y clasificado en el Grado 1 (Aluja y Vargas 1988). Los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Se puede observar la reacción inflamatoria discreta alrededor del parásito que todavía no lo rodea totalmente (A, B) y la integridad del tegumento (D), de la vesícula (B), de las ventosas y el rostellum (C). RI: reacción inflamatoria, T: tegumento, B: vesícula; V: ventosas, R: rostellum.

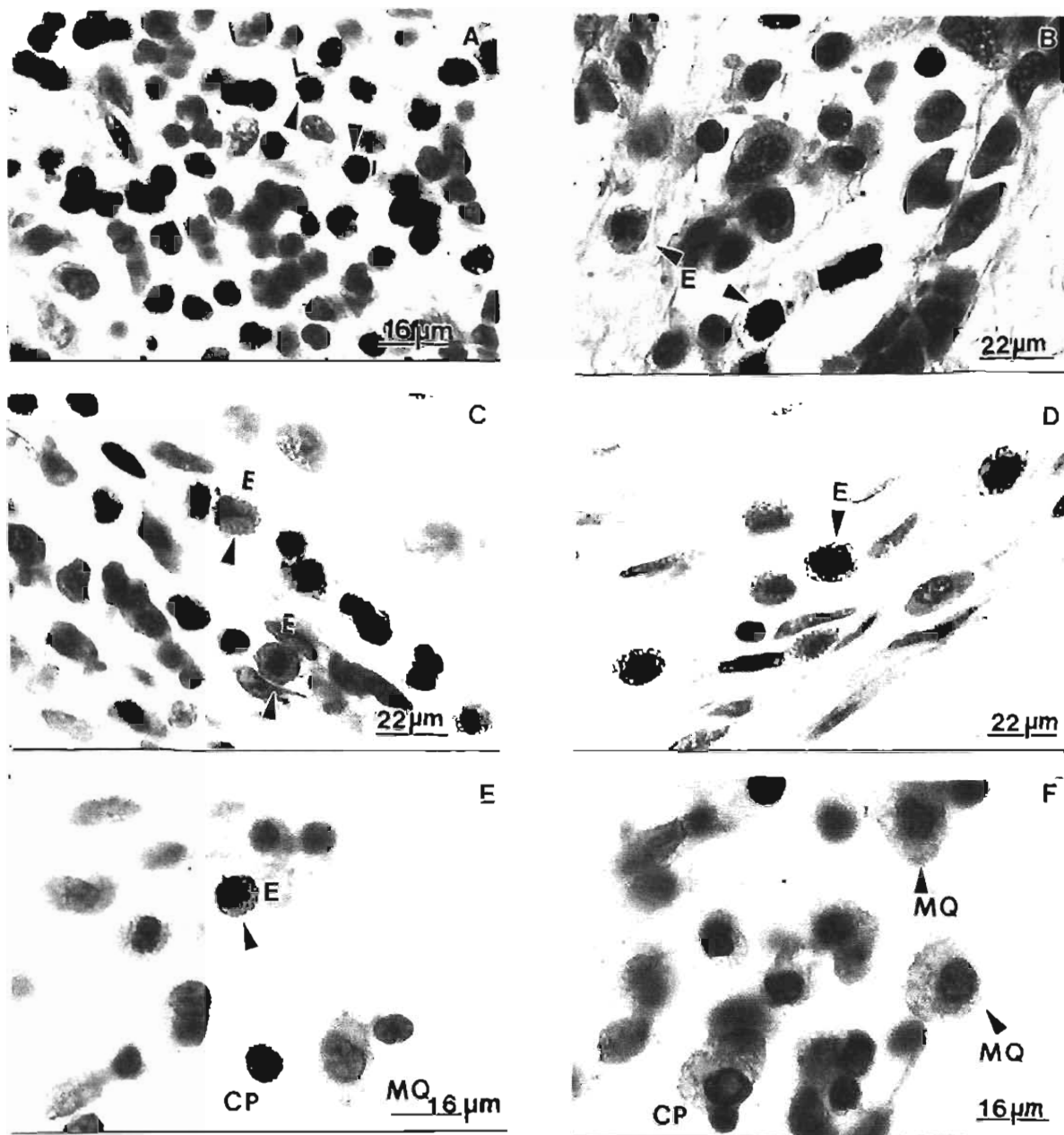


Figura 2. Composición de la reacción inflamatoria en la muestra de cerdo del Grado 1. A: Células inflamatorias; B, C, D, E y F a mayor aumento. CP: células plasmáticas, L: linfocitos, E: eosinófilos, MQ: macrófagos.

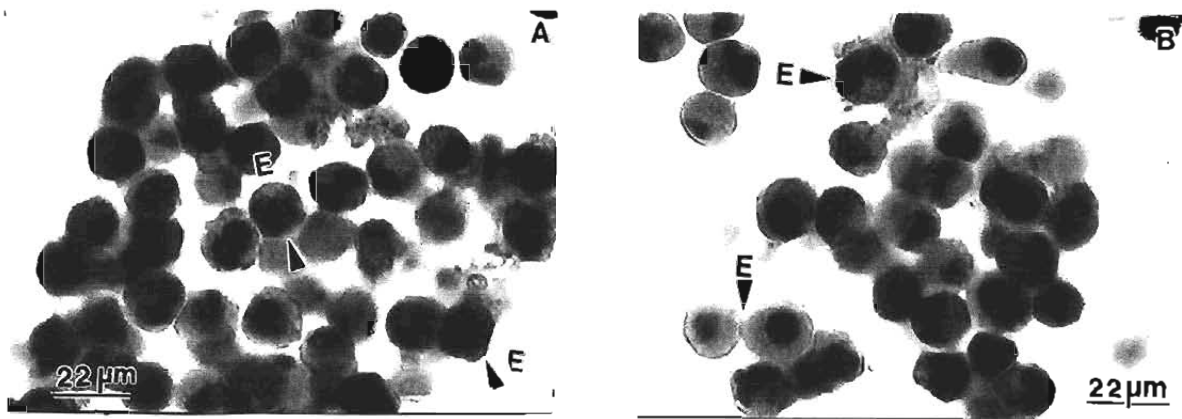


Figura 3. Exudado inflamatorio de cerdo cisticercoso del Grado 1 que se observó en contacto con el parásito. A y B: se observa ausencia de tejido conectivo y aumento del número de eosinófilos.

Grado 3. Esta descripción se presentó en 5 cerdos por mostrar una reacción granulomatosa que se empezaba a extender alrededor de la periferia de la vesícula de la larva (Fig. 4A y B). Los tipos celulares predominantes seguían siendo linfocitos y células plasmáticas. Los eosinófilos se observaron en mayor concentración alrededor del borde interno de la reacción dando la impresión de constituir una primera línea de ataque (Fig. 4C y D). Varios de ellos se observaban adheridos a la pared vesicular del parásito (Fig. 5A) y otros en el canal espiral (Fig. 5B y C), estos últimos se observaban inmersos en un material hialino probablemente de origen eosinofílico, lo que sugiere que habían degranulado. En algunas muestras observamos el tegumento hinchado y con vacuolas (Fig. 5B). Otra característica muy particular que se observa en la reacción inflamatoria de este grado 3 es la presencia de agregados de células linfoides que comienzan a formarse dentro de la zona granulomatosa (Fig 5D). La viabilidad de estos cisticercos fue del 80 al 100% (Tabla 2).

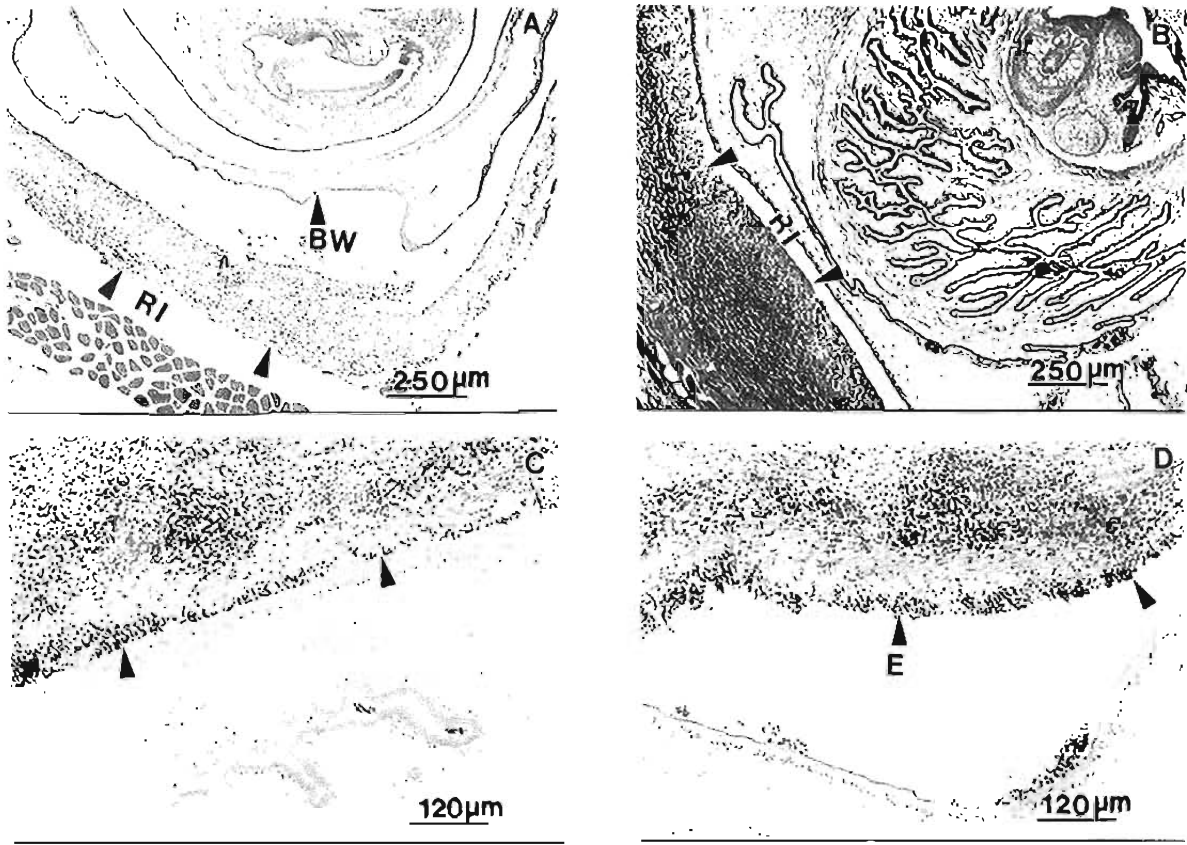


Figura 4. Cisticercos en músculo de cerdo con reacción inflamatoria Grado 3. Se observa una reacción inflamatoria de grado variable que se extiende a la periferia de la vesícula de la larva (A y B). Los cortes pertenecen a muestras distintas. Los eosinófilos se acumulan alrededor del borde interno de la reacción dando la impresión de una primera línea de ataque (C y D). RI: reacción inflamatoria, BW: vesícula; E: eosinófilos.

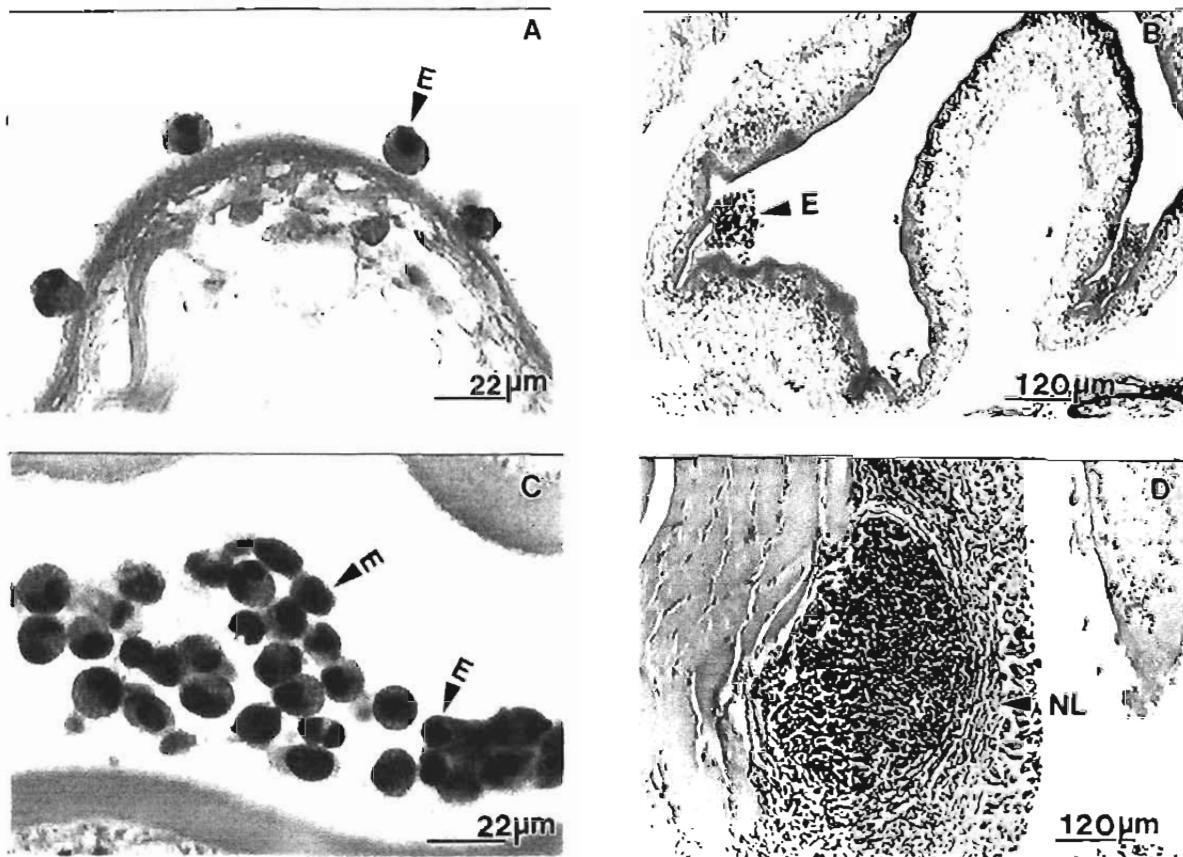


Figura 5. Células inflamatorias infiltrando el canal espiral de cisticercos en músculo de cerdo en reacción inflamatoria Grado 3. Se observaron eosinófilos en contacto con la vesícula (A) y eosinófilos infiltrando el canal espiral (B y C). En algunas muestras se observó el tegumento hinchado y con vacuolas y células inflamatorias en el canal espiral (C). Los eosinófilos que han infiltrado el canal espiral están inmersos en un material probablemente de origen eosinofílico (B y C). E: eosinófilos. También es importante resaltar la presencia de agregados de linfocitos dentro de la reacción inflamatoria (D). NL: nódulo linfoide.

Grado 4. El tercer grupo (3 muestras) se caracterizó porque la reacción inflamatoria rodeaba totalmente al parásito y las células inflamatorias se observaron infiltrando la vesícula (Fig. 6A y B). El parásito mostró signos de daño como pérdida de integridad de la vesícula (Fig. 6B y C). Numerosos eosinófilos se encontraron en la entrada del canal espiral y la cavidad vesicular presentó material acidofílico y células necróticas

(Fig. 6C). El infiltrado inflamatorio estuvo formado por células epitelioides y fibroblastos. Hubo gran número de eosinófilos entre el parásito y las células epitelioides que son necróticas (Fig. 7). En este grado de la reacción inflamatoria los agregados de células linfoides fueron más grandes y diversas mitosis se observaron. La viabilidad solo se determinó en uno de los cerdos, siendo del 100% (Tabla 3).

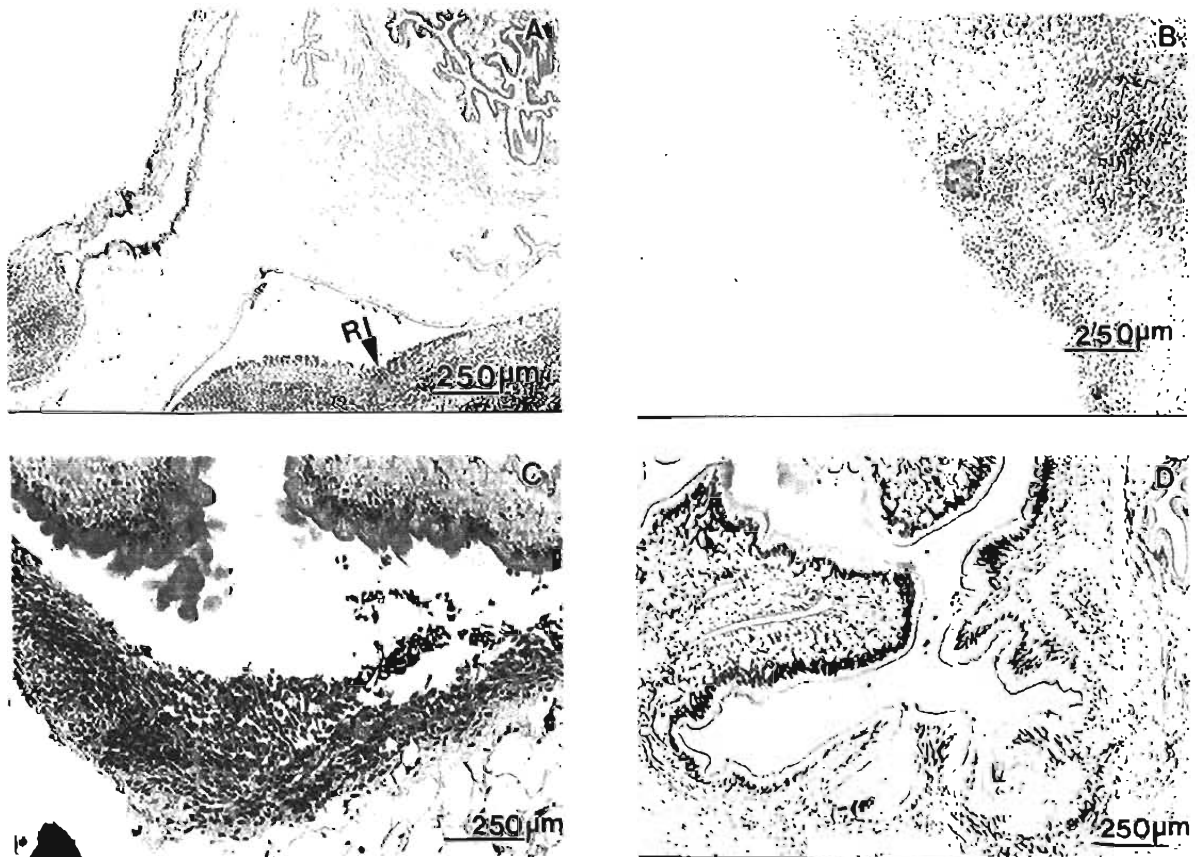


Figura 6. Cisticercos con reacción inflamatoria Grado 4. Reacción inflamatoria que rodea a todo el parásito (A). Se observan células inflamatorias infiltrando la vesícula que ya ha perdido su integridad estructural (B). Infiltración de células inflamatorias en el canal espiral y daño en al tegumento (C). Infiltración de células inflamatorias en el canal espiral (D). Las muestras corresponden a 2 cerdos diferentes. RI: reacción inflamatoria.

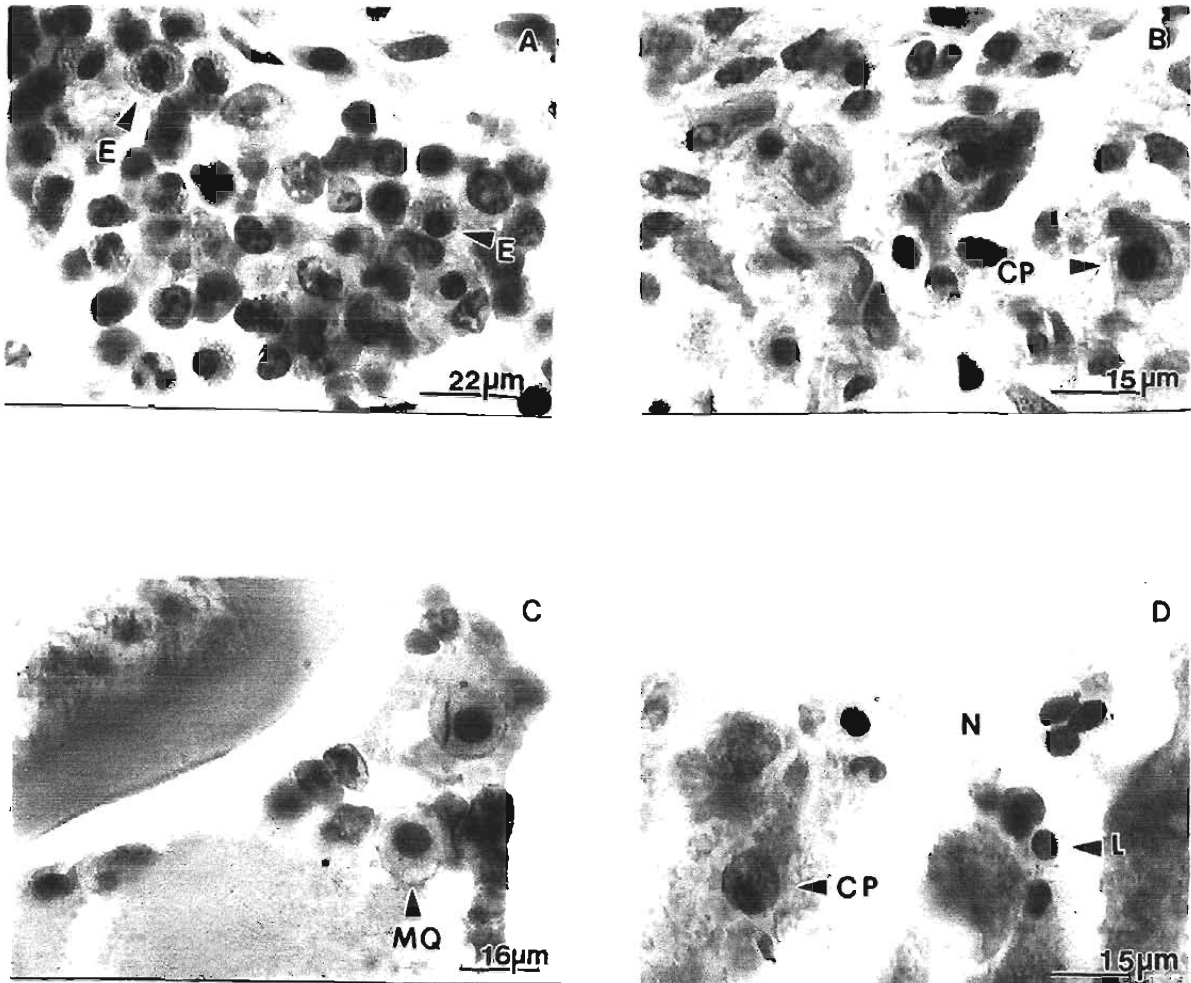


Figura 7. Células inflamatorias en los cisticercos clasificados en el Grado 4. Se observan eosinófilos (E), linfocitos (L), neutrófilos (N) y células plasmáticas (CP) (A y B). En algunos sitios se observan células necrosadas (N) (C y D).

Grado 5. El cuarto grupo se caracterizó porque el parásito estaba completamente destruido sin estructuras reconocibles excepto los ganchos y corpúsculos calcáreos. El parásito es sustituido por una masa de material necrótico (Fig. 8). En el tejido

circundante se observaron fibroblastos y fibrocitos en su mayoría, aunque linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos también existieron (Fig. 9). Estos cisticercos no estaban viables (Tabla 4).

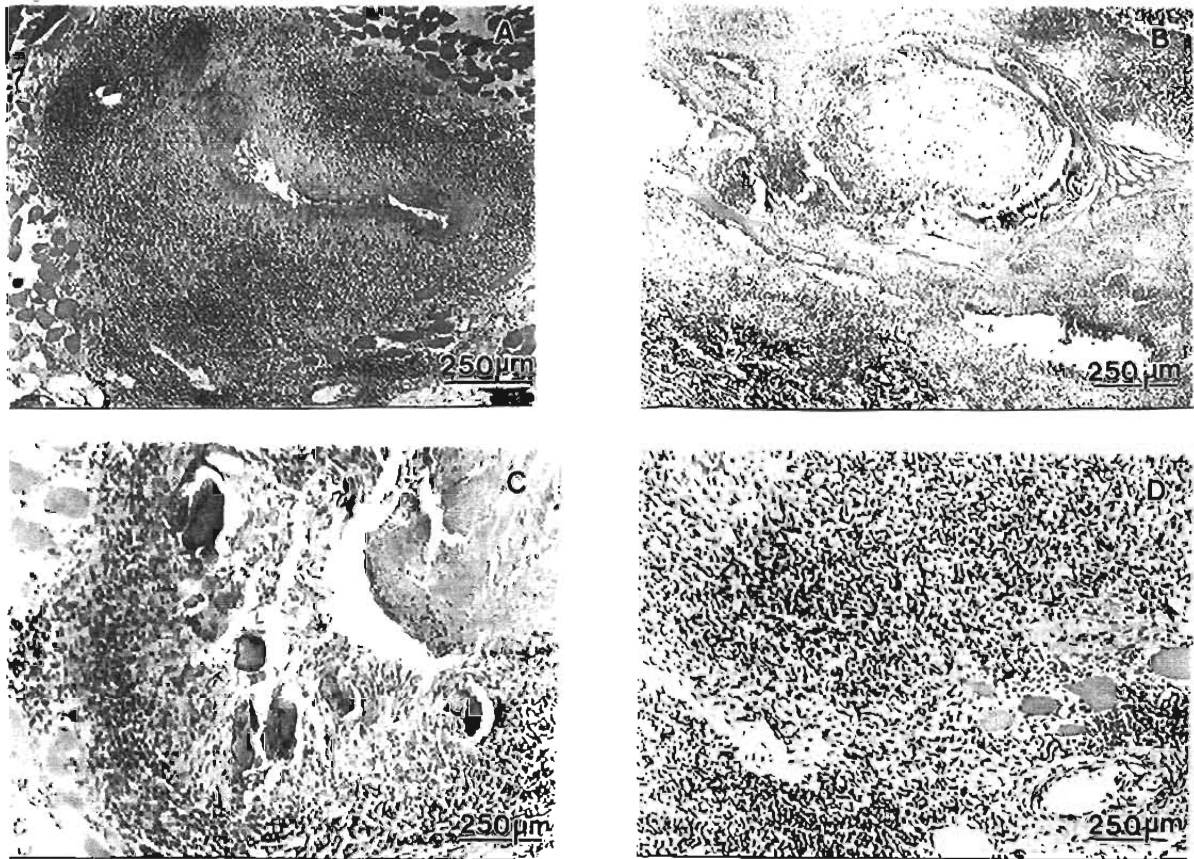


Figura 8. Cisticercos totalmente degenerados (Grado 5). A, B, C y D: Los detalles estructurales son irreconocibles. El contenido de la vesícula de los parásitos se observa como una masa acidófila y detritos celulares. El parásito es sustituido por una masa de material necrosado y células inflamatorias.

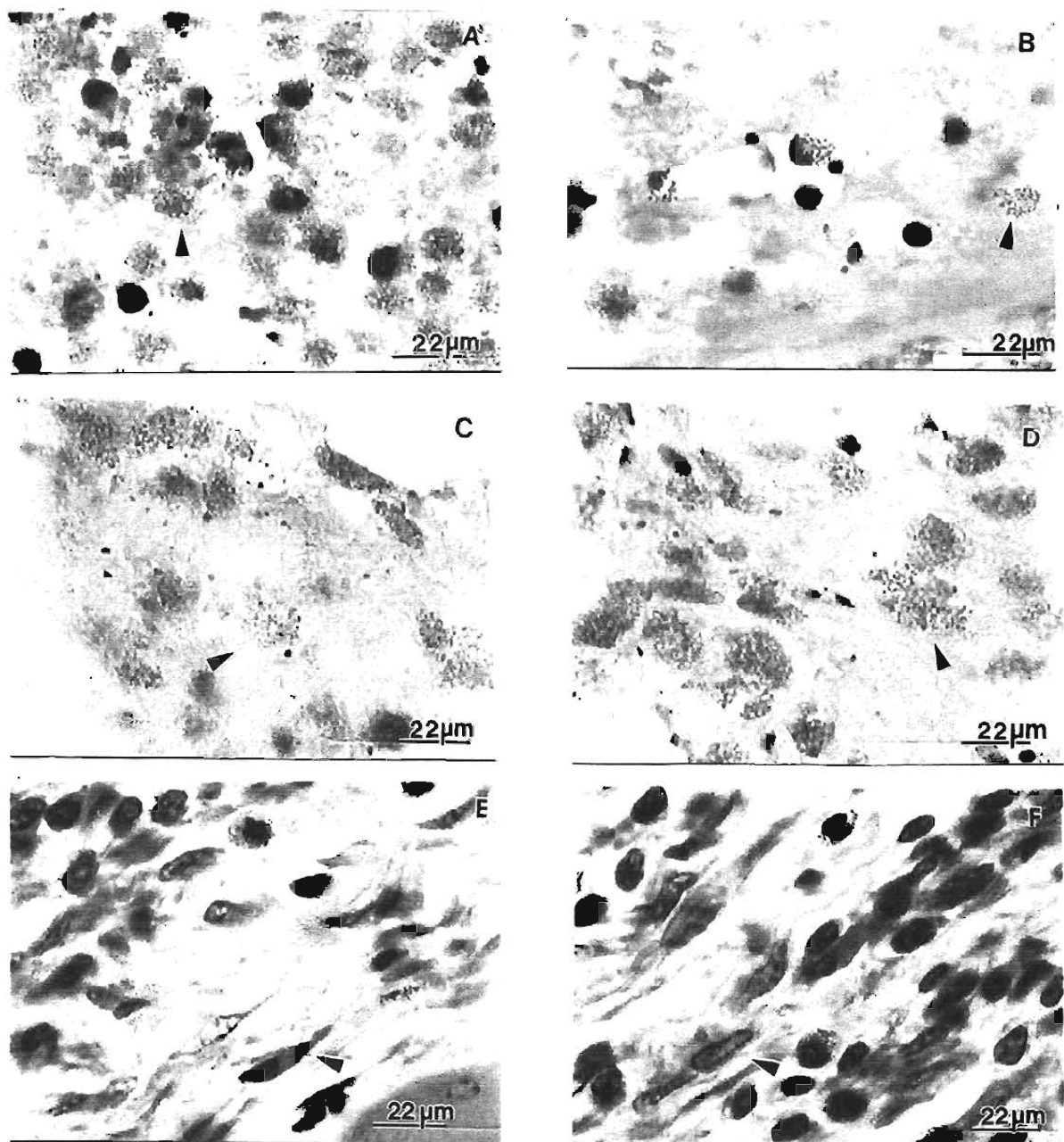


Figura 9. Acercamiento de la Figura 8. A y B: Región de la vesícula donde se observan algunas células cuyos núcleos son reconocibles aunque la mayoría de las células ya están destruidas, se distinguen algunos gránulos de eosinófilos. C y D: región de la larva donde se observa material de necrosis que ha sustituido al parásito, hay algunos gránulos en sitios donde probablemente se encontraban eosinófilos. E y F: zona aislada de la región de la larva donde se observan fibrocitos (f) y fibroblastos (F).

Patrón de citocinas en la reacción inflamatoria

Los patrones de citocinas en la reacción inflamatoria se determinaron por hibridación *in situ*. La interpretación de los resultados se realizó a partir de testigos positivos y negativos (Fig. 10).

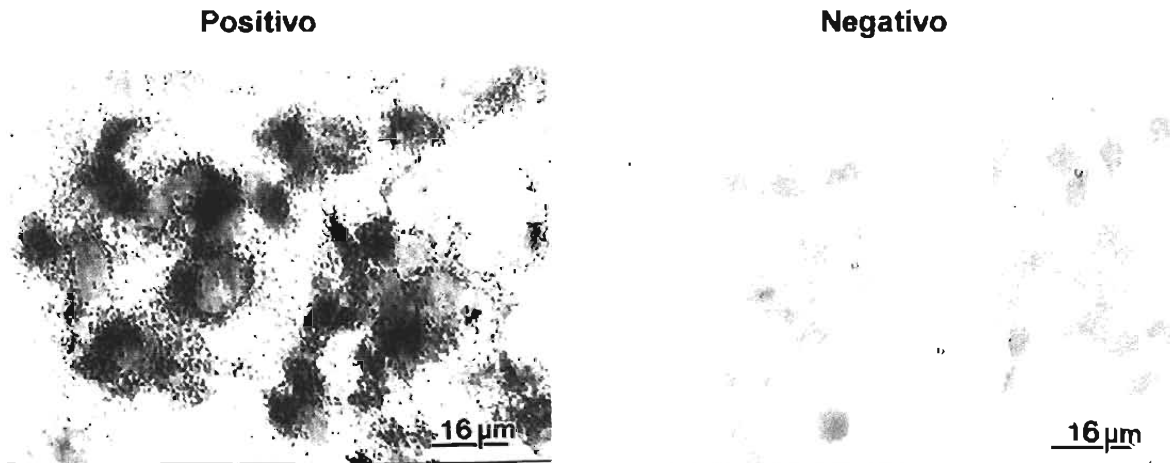


Figura 10. Testigos de hibridación *in situ*. Para el testigo positivo se utilizó una secuencia de ADN de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y para el testigo negativo de virus de papiloma humano.

La mayoría de las muestras produjeron patrones mixtos Th1/Th2 medidos por IFN- γ e IL-2 el primero y por IL-10 el segundo. Sin embargo, hubo un predominio del número de células productoras de IL-10 sobre el de células productoras de IFN- γ en las reacciones inflamatorias de los Grados 1, 3, 4 y 5.

IFN- γ . Los promedios de porcentajes de células productoras de IFN- γ fueron decreciendo en las reacciones inflamatorias de los Grados 3, 4 y 5 (11.68, 1.6 y 0.67% respectivamente) (Cuadros 2, 3 y 4). Imágenes representativas de los

resultados de hibridación para la determinación de mensajeros de IFN- γ se pueden observar en la figura 11.

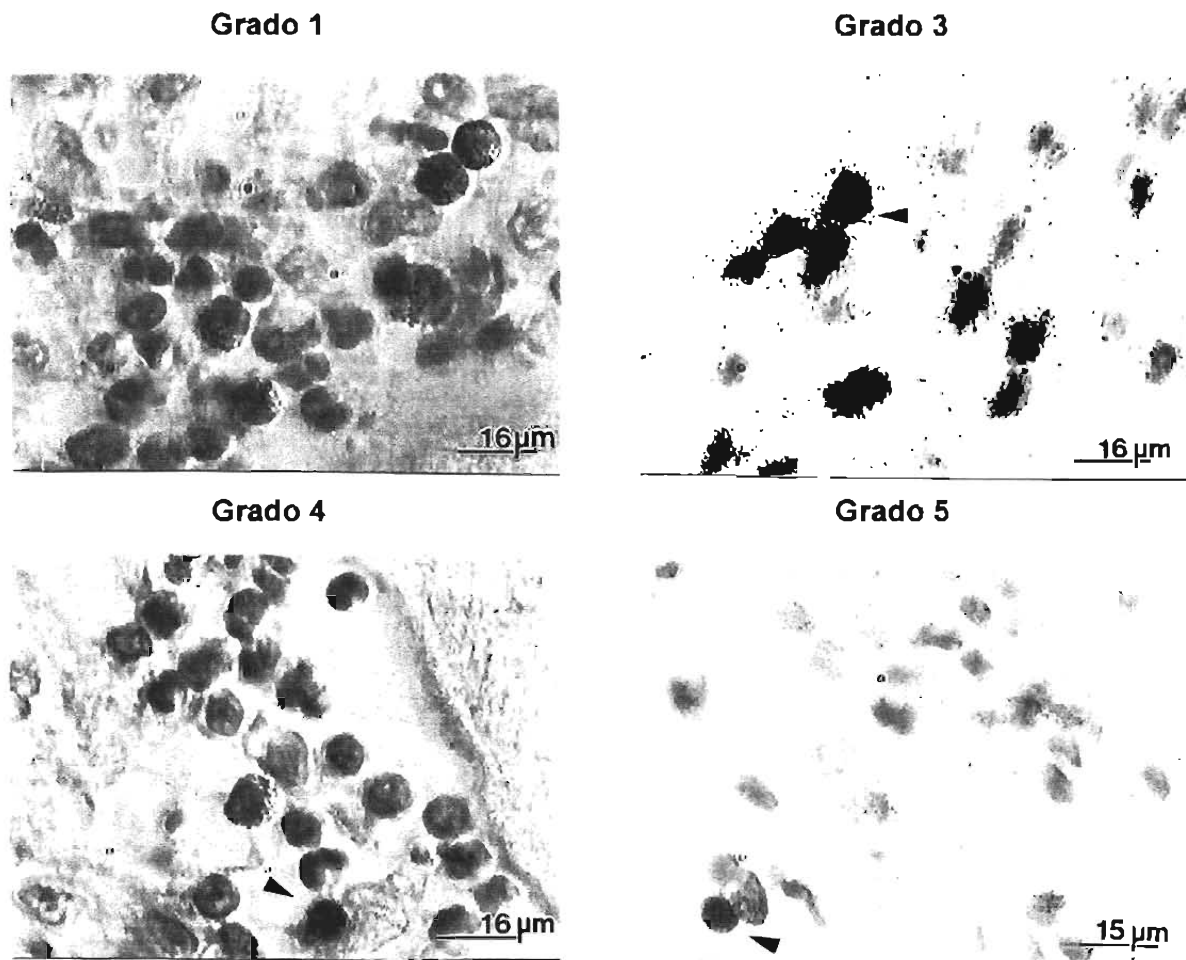


Figura 11. Determinación de células productoras de ARNm para IFN- γ . Las células con puntitos azules se consideran positivas y las células rojizas negativas. En las fotos se pueden observar las células inflamatorias positivas (flechas) en los diferentes grados.

IL-2. El número de células productoras de IL-2 se vio aumentado en las reacciones inflamatorias de Grado 3 y 4 (7.54 y 6.88% respectivamente) en comparación con los grados 1 y 5 que tuvieron promedios de 0 y 4.68% respectivamente (Cuadro 1, 2, 3 y 4). Es interesante hacer notar que el número de células productoras de

mensajeros para IL-2 mas bajo lo encontramos en las reacciones de Grado 1 y 5 (Cuadro 1 y 4). Imágenes representativas se observan en la figura 12.

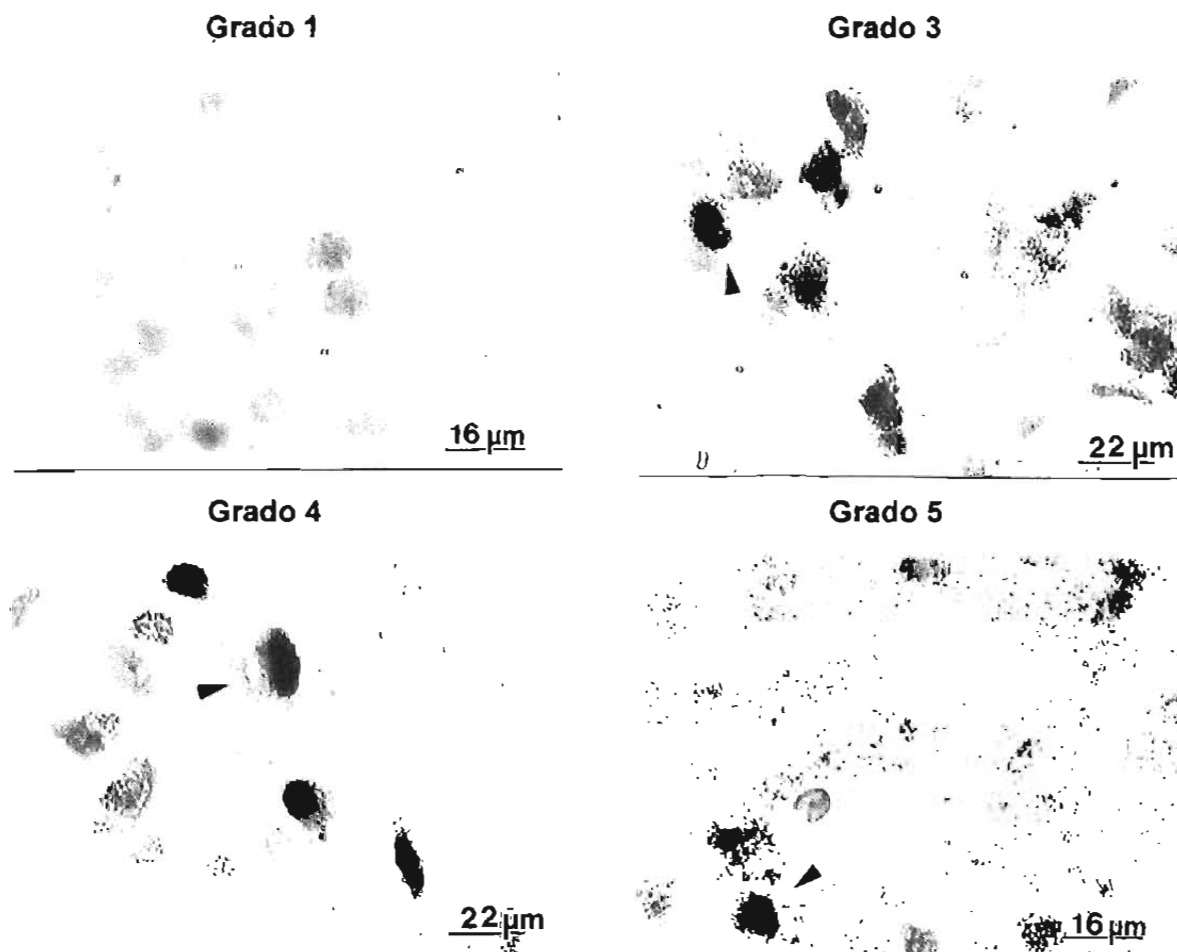


Figura 12. Determinación de células productoras de ARNm para IL-2. Las células con puntitos azules se consideran positivas y las células rojizas negativas. Las flechas muestran células positivas en cada uno de los grados.

IL-10. El número de células productoras de mensajeros para IL-10 fue mayor en todos los grados de inflamación estudiados en comparación con los mensajeros de las otras citocinas, siendo mas abundante en el Grado 3 (13.85%) (Cuadro 2) y en el 5 (6.38%) (Cuadro 4). Los promedios de los porcentajes de los grados 4 y 5 fueron muy semejantes (5.0 y 6.4%) (Cuadros 3 y 4). Imágenes representativas se observan en la figura 13.

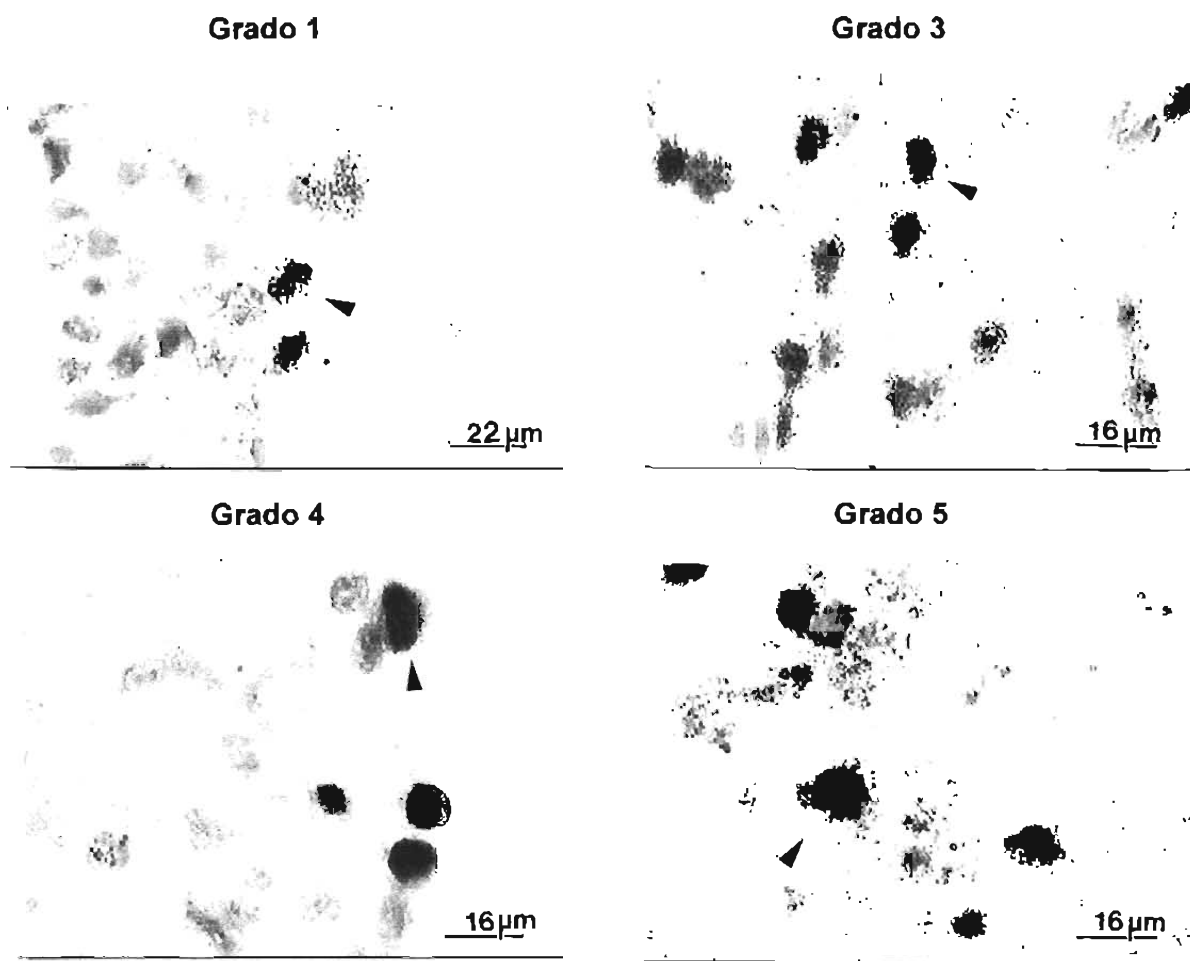


Figura 13. Determinación de células productoras de ARNm para IL-10. Las células con puntitos azules se consideran positivas y las células rojizas negativas. Las flechas muestran células inflamatorias positivas en todos los grados.

TNF- α . Se estudió también la producción de mensajeros para una citocina pro-inflamatoria el TNF, que aunque es principalmente producida por macrófagos también puede ser producida por linfocitos T activados. Los resultados que encontramos muestran que el número de células productoras de TNF fue mayor en la reacción inflamatoria del grado 3 (12.73%), lo encontramos ausente en el grado 1 y muy disminuido en las reacciones inflamatorias de los grados 4 y 5 (2.16 y 2.0% respectivamente).

Imágenes representativas se observan en la figura 14.

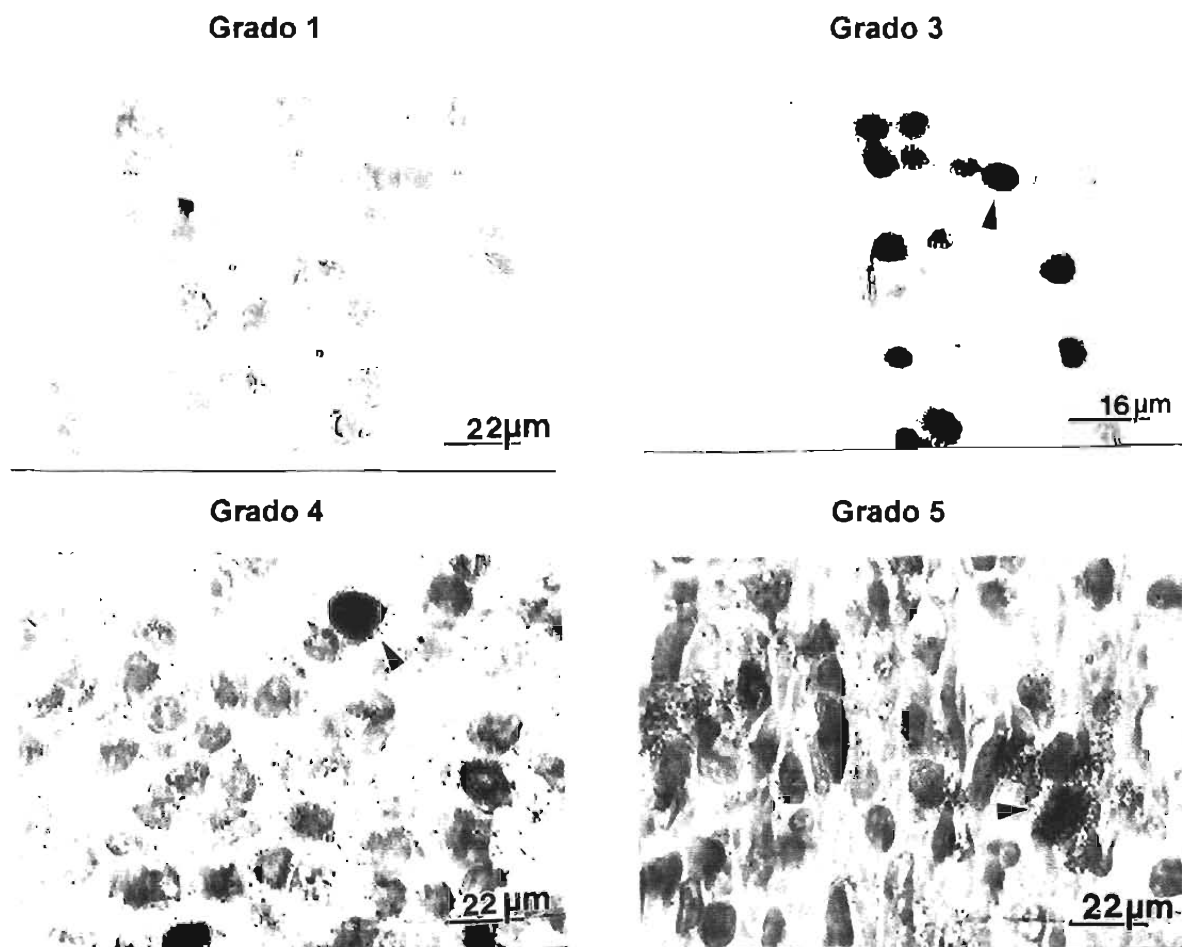


Figura 14. Determinación de células productoras de ARNm para TNF- α . Las células con puntitos azules se consideran positivas y las células rojizas negativas.

Cuadro 1: Perfil de mensajeros para citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 1. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.

Cerdo	IFN- γ (%)	IL-2 (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	Infiltración celular	Viabilidad (%)
5/06/00	0	0	0	4.1	-	100
Promedio	0	0	0	4.1		

% de células positivas

- Ausencia de infiltrado celular

Cuadro 2: Perfil de mensajeros de citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 3. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.

Cerdo	IFN- γ (%)	IL-2 (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	Infiltración celular	Viabilidad (%)
03/09/98	0.64	5.24	10.8	4.92	4-6	100
26/06/00	4.23	0.89	13.13	5.63	28 - 30	80
07/07/99	13.66	11.43	N.D.	15.80	-	90
20/09/01	26.0	17.80	39.70	27.30	-	100
01/12/99	13.88	2.32	0	15.60	80 - 90	N.D.
Promedio	11.68	7.54	12.73	13.85		

% de células positivas

+ Número de células infiltradas en las estructuras del parásito

- Ausencia de infiltrado celular

ND No determinado

Cuadro 3: Perfil de mensajeros de citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 4. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.

Cerdo	IFN- γ (%)	IL-2 (%)	TNF- α (%)	IL-10 (%)	Infiltración celular	Viabilidad (%)
103	1.2	4.16	2.17	9.3	80 - 90	N.D.
105	0	7.72	0	0.35	150 -160	N.D.
CC-10	3.6	8.75	4.3	5.35	4 - 6	N. D.
Promedio	1.6	6.88	2.16	5.0		

% de células positivas

+ Número de células infiltradas en las estructuras del parásito

ND No determinado

Cuadro 4: Perfil de mensajeros de citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 5. Necrosis del parásito y viabilidad.

Cerdo	IFN-γ (%)	IL-2 (%)	TNF-α (%)	IL-10 (%)	Necrosis	Viabilidad (%)
C-6	1.33	6.03	2.63	2.56	+	0
C-8	0	3.33	1.39	10.19	+	0
Promedio	0.67	4.68	2.0	6.38		

% de células positivas

+ Necrosis

En la figura 15 podemos observar la representación de las medias de los porcentajes de células positivas para todas las citocinas en cada uno de los grados de inflamación.

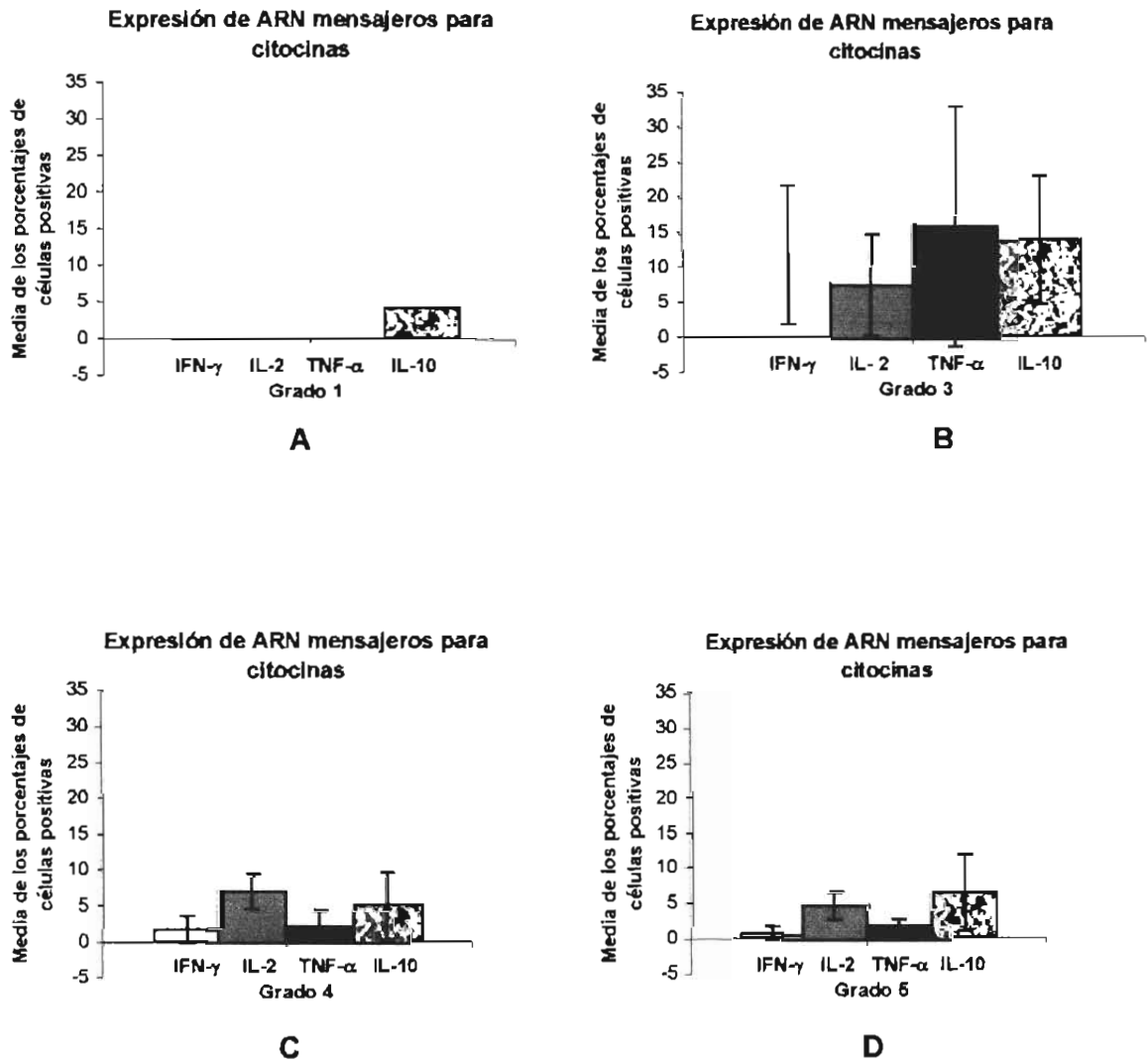


Figura 15. Comparación del perfil de ARN mensajeros para citocinas en los distintos grados de la reacción inflamatoria.

Finalmente, al realizar el análisis estadístico solo encontramos diferencia significativa entre la media de los porcentajes de células que expresan ARN mensajeros para IFN- γ entre los grados 3 y 5. En las demás citocinas debido a los valores de la desviación estándar no se encontró significancia.

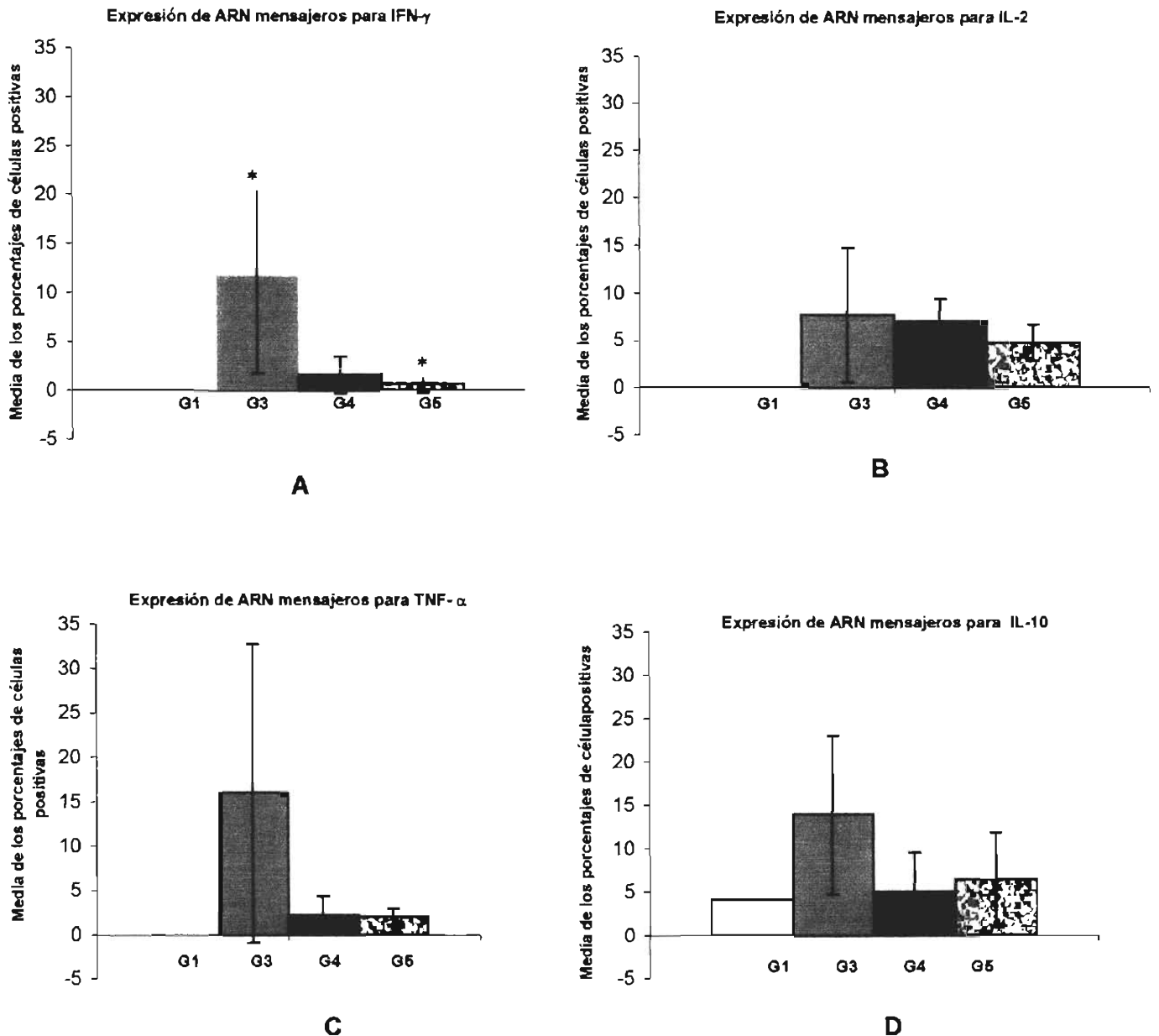


Figura 16. Comparación de la expresión de ARN mensajeros de cada citocina en los distintos grados de inflamación. G1, G3, G4 y G5 Grados de la reacción inflamatoria (de Aluja y Vargas 1988). * $p = 0.0347$ entre G3 y G5. Prueba de t no pareada con corrección de Welch.

DISCUSIÓN

Se estudió la interacción huésped parásito *in situ*. Se determinaron los patrones de citocinas generados en la reacción inflamatoria que rodea a los cisticercos y se relacionaron con el estado biológico de los parásitos. Las muestras obtenidas de los cerdos fueron clasificadas en base a la reacción inflamatoria, a la integridad del parásito y a la infiltración de células inflamatorias en las estructuras del parásito, siguiendo la clasificación de Aluja y Vargas (1988). Tomamos en cuenta también la viabilidad de los parásitos, medida por su capacidad de evaginación y la movilidad de su tegumento.

Al estudiar las células inflamatorias de las muestras de Grado 1, se observó una escasa reacción inflamatoria que no rodeaba totalmente al parásito. Se encontraron exclusivamente células productoras de IL-10 (4.1%) sugiriendo una respuesta tipo Th2. En estas muestras, los cisticercos estaban totalmente desarrollados y su viabilidad fue del 90% pero desconocemos el tiempo de infección. En infecciones con *T. crassiceps* se ha reportado un incremento significativo de la producción de IL-10 en infecciones tempranas (2-4 semanas) y tardías (16 semanas) (Terrazas 1998). Por otro lado, en infecciones por *T. solium*, las concentraciones de IL-5 e IL-10 se encontraron elevadas en sueros o líquidos cefaloraquídeos de pacientes con neurocisticercosis activa (Evans *et al.* 1998; Rodríguez *et al.* 2000). Esto correspondería a una reacción tardía ya que se ha reportado que el periodo de incubación para la neurocisticercosis es de 4-5 años (Dixon y Lipscomb 1961). Estudios en ratones infectados con *T. crassiceps* mostraron una reacción inflamatoria temprana predominantemente asociada a Th1 (IFN- γ e IL-2), mientras que granulomas en los que los parásitos se encontraban completamente destruidos,

se encontraba una mezcla de Th1 con IL-4 (Robinson *et al.* 1997). Terrazas *et al.* (1998) y Toenjes *et al.* (1999) reportaron una activación secuencial y respuestas mixtas Th1/Th2 respectivamente en cisticercosis murina por *T. crassiceps*. A pesar de que no conocemos el tiempo de infección es probable que nuestra muestra corresponda a una infección temprana.

En las reacciones inflamatorias de los cisticercos del Grado 3, se encontró una respuesta mixta Th1/Th2 *in situ* sin predominio de alguna subpoblación. Las reacciones inflamatorias porcinas de los grados 3 y 5 mostraron una diferencia significativa en la expresión de ARN mensajeros para IFN- γ . En la reacción inflamatoria de los cisticercos del grado 4, se observa también una mezcla de citocinas Th1 y Th2 aunque con porcentajes menores de células positivas. Los cisticercos en estos grupos tuvieron evaginaciones de 80 y 100% y mostraron infiltración celular abundante en las estructuras del parásito, y se distinguen estructuras del parásito dañadas. Nuestros resultados apoyan la observación de Restrepo *et al.* (2001) en granulomas de cerebro humano donde informan que los metacéstodos de estos pacientes se encontraron rodeados de una reacción granulomatosa asociada a respuestas Th1/Th2 (Restrepo *et al.* 2001),

Otros investigadores han reportado la existencia de una producción significativa de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-2) (Grewal *et al.* 2000), y una supresión específica de células mononucleares en la sangre de pacientes con cisticercosis (Bueno *et al.* 2001).

En las reacciones inflamatorias de los cisticercos de grado 5 se distingue todavía una mezcla de citocinas Th1 y Th2 aunque la cantidad de células productoras de IFN- γ disminuyó importantemente hasta un 0.67%. En las células que constituyen esta reacción inflamatoria se detectó la producción de IL-2 e IL-10

con valores muy parecidos (4.68 y 6.38% respectivamente). En este caso, los cisticercos se encuentran completamente necrosados y con una intensa reacción inflamatoria que invade el sitio de la larva.

Se han utilizado modelos animales para estudiar las interacciones huésped-parásito en cisticercosis. Así, se ha reportado que larvas de *T. solium* implantadas en el peritoneo de ratones deprime la respuesta de células de bazo a Con A (Willms *et al.* 1980). Cisticercos de cerdos parasitados naturalmente mostraron sus estructuras intactas con una discreta reacción inflamatoria rodeando su vesícula. Mientras que la inmunización con antígenos del metacéstodo en cerdos con infecciones naturales, indujeron una intensa reacción inflamatoria a su alrededor capaz de destruirlos (Molinari *et al.* 1983). Otros reportes establecen que los linfocitos T estaban deprimidos en cerdos naturalmente parasitados y que esta depresión era proporcional a la carga parasitaria, especialmente en la población de células T cooperadoras (Tato *et al.* 1987; Molinari *et al.* 1987).

Siguiendo esta línea de investigación se ha reportado un factor de metacéstodo de *T. solium* que inhibe la proliferación de linfocitos (Molinari *et al.* 1990; Tato *et al.* 1995) así como la producción de IL-2, IFN- γ , IL-4 y TNF- α *in vitro* (Arechavaleta *et al.* 1998). Cuando este factor fue cromatografiado en columnas de Bio-gel P-6, se obtuvieron 2 fracciones con actividades biológicas opuestas, una supresora llamada F1 y una estimuladora llamada F2. Recientemente, se reportó que la implantación subcutánea de metacéstodos de *T. solium* en ratones o el tratamiento con F1 afectó la producción de citocinas por las células de bazo de estos animales estimuladas con Con A *ex vivo*. Adicionalmente, en estudios de RT-PCR se encontró que todas las células presentaban mensajeros para IFN- γ , IL-2 e IL-4 y en estudios de citometría, al estimar las citocinas intracelulares encontraron que la

producción de IL-2 e IL-4 en células CD8+ y de IFN- γ en células CD4+ de ratones implantados con metacístodos estaban significativamente disminuidas (Hernández-Mendoza *et al.* 2005).

En síntesis, cuando el cisticerco presenta una discreta reacción inflamatoria la única citocina producida es IL-10, esto se puede explicar por el hecho de que el cerdo se encuentra inmunodeprimido y por ende la producción de citocinas esta también afectada. Es probable que en cerdos que presenten reacciones Grado 0 (carencia de reacción inflamatoria) se observe una ausencia total de todas las citocinas ya que el parásito pudiera estar modulando efectivamente la respuesta inmune del huésped. Sin embargo, en nuestro estudio no pudimos observar esta condición por no contar con cerdos en esta fase de reacción huésped-parásito. A medida que el cisticerco evoluciona y deja de modular la respuesta inmune del huésped, la reacción inflamatoria se ve favorecida y se genera una mezcla de citocinas Th1 y Th2 *in situ* sin predominio de ninguna de las subpoblaciones. Cuando el cisticerco presenta una reacción inflamatoria tan intensa que se logra destruir al parásito, se mantiene el patrón de citocinas mixto aunque con un menor porcentaje de células positivas para cada citocina.

La mayor parte de los resultados presentan una desviación estándar alta por la variación que existe entre ellos, esto se puede explicar por la diferencia de sexo, a la raza del animal, edad del cerdo, tiempo de infección y al estado nutricional. Por todo esto, sería conveniente realizar un experimento en el que los animales fueran infectados experimentalmente y que se pudieran ir sacrificando en diferentes tiempos para determinar el comportamiento inmunológico controlando las variables que ahora tenemos en nuestro experimento.

CONCLUSIONES

1. Consideramos que la aportación más importante de este trabajo es la realización de una cinética de las citocinas en los distintos grados de la reacción inflamatoria que rodean al cisticerco.
2. En el presente estudio se utilizó el cerdo para evaluar la respuesta inmune *in situ* que se genera contra el metacéstodo de *T. solium*, ya que en el huésped intermediario reproduce la respuesta que se observa en el humano.
3. Los resultados sugieren que, cuando el cisticerco se encuentra rodeado por una escasa reacción inflamatoria (grado 1) hay ausencia de ARN mensajeros para citocinas de tipo Th1 y expresión de ARN mensajeros para IL-10.
4. El patrón de citocinas observado en las reacciones inflamatorias de los grados 3, 4 y 5, que rodean al metacéstodo, muestran una respuesta mixta de citocinas Th1 y Th2 con una diferencia significativa en la expresión de ARN mensajeros para IFN- γ entre los grados 3 y 5.
5. Los resultados sugieren que cuando el metacéstodo está destruido (grado 5), las células de la reacción inflamatoria mantienen una respuesta mixta con expresión de ARN mensajeros para los patrones de citocinas Th1 y Th2 aunque con porcentajes menores de células positivas.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. Oct 31; 383 (6603): 787-93 Review.
2. Aluja A, Escobar, F. Escobedo, A. Flisser, JP Laclette, C. Larralde, Madrazo, V. Velázquez, K. Willms 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*, Biblioteca de la Salud, fondo de Cultura Económica, México, pp.116.
3. Bandres J, White AC, Jr, Samo T, Murphy E, Harris R. 1992: Extraparenchymal neurocysticercosis: Report of five cases and review of the literature on management. *Clin Infect Dis*; 15:799-822.
4. Blanco G, Gianello P, Germana S, Baetscher M, Sachs DH and LeGuern C. 1995. Molecular identification of porcine interleukine 10: regulation of expression in a kidney allograft model. *Proc. Natl Acad Sci USA* 92:2800-2804.
5. Cañedo L, Laclette, J.P. and Morales E. 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In "Cysticercosis, present State of Knowledge and Perspectives". (A. Flisser, K. Willms, J.P. laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán, Eds), pp. 363-273. Academic Press, New York.
6. Cárdenas F, Quiroz H, Plancarte A, Meza A, Dalma A, Flisser A: *Taenia solium* ocular cisticercosis 1992: Findings in 30 cases. *Ann Ophthalmol*;24:25-28.
7. Carpio A, Placencia M, Santillán F, Escobar A. 1994: A proposal for classification of neurocysticercosis. *Can J Neurol Sci*; 21: 43-47.
8. Chandy MJ, Rajshekhar V, Prakash S, Ghosh S, Joseph T, Abraham J, Chandi SM 1989: Cysticercosis causing single, small CT lesions in indian patients with seizures. *Lancet*:390-391.
9. Choi CS, Molitor TW, Lin GF and Murtaugh MP. 1991 Complete nucleotide sequence of a cDNA encoding porcine tumor necrosis factor alpha. *Anim. Biotechnol* 2: 97-105.
10. De Aluja A. y Vargas G. 1988 The Histopathology of Porcine Cisticercosis. *Veterinary Parasitology*, 28 (65-77).

11. De Aluja A. S. 1994 Manchas de leche (Milk spots) por metacéstodos de *Taenia solium* en hígados de cerdo, Vet. Méx. 25 155.
12. Del Brutto O.H., García E., Talamás O., Sotelo J. 1988. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cisticercosis, Arch. Intern. Med. 148 544-546.
13. Díaz S, R. Candil, P. Suate, R. Zazueta, M. Feliz, R. Lozano y K. Willms 1991, "Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico", Am. J. Trop. Med. Hyg., 45:522-531.
14. Dixon HBF y Lipscomb FM 1961. Cisticercosis: an análisis and follow-up of 450 cases. Medical Research Council Spetial Report Series. Vol. 299, Her Majesty's Stationary Service. London pp. 1-58
15. Dozois CM, Oiswald E, Gautier N, Serthelon JP, Fairbrother JM and Oswald IP 1997. A reverse transcription polymerasa chain reaction method to analize porcine citokine gene expression. Vet. Immunol Immunopathol 58: 287-300.
16. Earnest MP, Reller LB, Filley CM, Grek AJ 1987: Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. Rev Infect Dis; 9:961-979.
17. Escobar A. y Nieto D 1972. Cisticercosis. In pathology of the Nervous System, Vol. III, edited by J. Minckler, pp. 2507-2515. New York: McGraw-Hill.
18. Escobedo F 1988 Neurological aspects of neurocysticercosis. In operative Neurosurgical Techiques Schmidek and Sweet (eds) USA Grune and Stratton 2nd Edition; p.93-10.
19. Estañol B, Kleriga E, Loyo M, Mateos H, Lombardo L, Gordon F, Saguchi AF 1983: Mechanisms of hydrocephalus in cerebral cysticercosis: implications for therapy. Neurosurgery; 13;119-23.
20. Gadner B, Golberg M, Heiner D 1984: The natural history of parenchymal central nervous system cisticercosis (abstract) Neurology; (suppl 1): 90.
21. García HH, Gilman RH, Martinez M, Tsang VC, Pilcher JB, Herrera G, Diaz F, Alvarado M, Miranda E. 1993. Cysticercosis as a mayor cause of epilepsy in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru CWG. Lancet; 341 8839 p. 197-200.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

22. Garrido E, tato P, Molinari JL 2001. A factor isolated from *Taenia solium* metacestodes stimulates T lymphocytes to proliferate and produce gamma interferon. *Parasitol Res* 87:956-962.
23. Gutierrez Y 1990: *Cisticercosis, Coenurosis and Sparganosis: Diagnostic Pathology of Parasitic Infection with Clinical Correlation*. Philadelphia, Lea and Febiger pp 432-459.
24. Inumaru S and Takamatsu H 1995. CDNA cloning of porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Immunol Cell Biol* 73: 474-476.
25. Komminoth P. *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual* (Boehringer Mannheim) 1996. Second Edition pp.126-135.
26. Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A: Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol* 1992; 148:124-128.
27. Letonja T, Hammerberg C, Schung G 1987. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*. *Parasitol Res.*, 73(3): 265-70.
28. Mandujano A, Vela M, Alcántar P, Correa D 1990. Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium* (abstract). *Bull. Soc. Fr. Parasitol.*; 8 p.578.
29. McCormick G.F 1985: Cysticercosis: Review of 230 patients. *Bull Clin Neurosci*; 50: 76-101.
30. Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P, Retana A 1983a: *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp Parasitol*; 55:340-357.
31. Molinari JL, Meza R, Tato P 1983b: *Taenia solium*: Cell reactions to the larvae (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized immunized hogs. *Exp Parasitol*; 56:327-338.
32. Molinari JL, Tato P, Reynoso OA and León Cázares JM 1990. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohemmagglutinin. *Ann. Trop. Med. Hug.*,49:502-512.
33. Molinari JL, Tato P, Valles Y 1987: Inmunodepresión de linfocitos T en cerdos, modulada por *Cysticercus cellulosae*. *Rev Latinoam Microbiology*;29:293-300.

34. Molinari JL y tato P 2002. Molecular determinants of host-parasite interactions: Focus on parasite. CAB international. *Taenia solium* cysticercosis. Chap 03, Page 25.
35. Mossman TR, Cherwinski HM, Bond MW, Giedlin MA, Coofman RL 1986. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol; 136: 2348-57.
36. Mossman TR, Sad S 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today; 17:138-46.
37. Miyasato T, Furukawa T, Inoue M., *et al.* 1977. Electron microscopic observations on the penetration of oncospheres of *Hymenolepis nana* into the intestine of the mouse. Acta medica Kinki University 2, 1-18.
38. Nishimura T. Santa K. Yahata T 1997. Vb8.2+ CD4+ CD62L- CD45 RB. T cells in non-MHC gene-controlled pre-disposition toward skewing into T helper type-2 immunity in BALB/c mice. J Immunol; 158: 5698-706.
39. P. Tato, A. M. Fernández, S. Solano, V. Boronio, E. Garrido, J. Sepúlveda y J.L. Molinari 2004. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. Parasitol Res 92: 197-204.
40. Rabiela MT, Rivas A, Rodriguez J, Castillo S, Cansino FM. 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds) Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York, pp 179-199.
41. Ridaura C 1987. Host response in childhood neurocysticercosis. Child Nerv Syst 3: 206-207.
42. Rajshekhar V 1991. Etiology and management of single CT lesions in patients with seizures: Understanding a controversy. Acta Neurol Scand;84:465-470.
43. Reiner SL, Seder RA 1995. T helper cell differentiation in immune response. Curr. Opin. Immunol. Jun; 7(3): 360-6. Review.
44. Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM 1998. Análisis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1 –like instead of Th2. J. Neuroimmunol 89: 64-72. y col 1998.

45. Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White AC 1997. Granuloma cytokines in murine cisticercosis. *Infect Immun* 65:2925-2931.
46. Sanz CR 1987. Host Response in childhood neurocysticercosis some pathological aspects. *Childs Nervs Syst.*; 3(4): 206-7.
47. Sarti E, P. Shantz, A. Plancarte, M. Wilson, I. Gutierrez, A. López 1992a "Prevalence and risk factors for *Taenia solium* teniosis and cisticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico", *Am. J. Trop. Med. And Hyg.*, 46:677-684.
48. Sarti E, A. Flisser, P. M. Schantz 1997. "Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico", *Am. J. Trop. Med. And Hyg.*, 56:127-132.
49. Sarti E, P Schantz, J Aguilera y A. López 1992b, "Epidemiologic observations in a rural community of Michoacán State, México", *Veterinary Parasitology*, 41:195-201.
50. Sarti E, P. Schantz, A. Plancarte, M. Wilson, I. Gutierrez, J. Aguilera, J. Roberts, y A. Flisser 1994, "Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniosis and cisticercosis in a rural village of Michoacan State, México", *Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 68:49.
51. Sarti E. 1989. "Epidemiología de la taeniosis y cisticercosis" en A. Flisser y F. Malagón (comps.), *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México*, Limusa Noriega, México, pp. 233-242.
52. Sarti E. 1997a. "La teniosis y cisticercosis en México", en C. Arraigada, J. Nogales-Gaete y W. Apt (comps.), *Neurocisticercosis*, Arrynog, Santiago de Chile, pp5-22.
53. Schantz P y E. Sarti, 1989, "Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection" , *Acta Leidensia*, 57:153-163.
54. Schantz P, E. Sarti, A. Plancarte, M. Wilson, J. Robert y A. Flisser 1991, "Clinical radiological and epidemiological correlations of ELISA and immunoblot assays for *Taenia solium* cysticercosis in 2 populations. México", *Am. J. Trop. Med. And Hyg.*, 45:130-131.
55. Schantz P.M., Moore A.C., Muñoz J.L., Hartman B.J., Schaefer J.A., Aron A.M., Persaud D., Sarti E., Wilson M., Flisser A. 1992. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City, N. England *J. Med.* 327 692-695.

56. Shandera WX, White AC, Jr, Chen J, Diaz P, Armstrong R 1994: Cisticercosis en Houston, Texas: A report of 112 cases. *Medicine*; 45: 777-780.
57. Slais J 1970: The morphology and pathogenicity of the bladder worms: *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Prague, Academia.
58. Sotelo J, Escobedo F, Rodríguez-Carbajal J, Torres B, Rubio-Donnadieu F. 1984 Therapy of parenchymal brain cisticercosis with praziquantel. *N. Engl. J. Med.* Apr 19; 310-(16): 1001-7.
59. Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE 2000. Parasite secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* Jun, 22(6): 297-305.
60. Takashi Miyasato, Tadaaki Furukawa, Mieko Inoue, atsuko Niwa, Tomoyoshi Inoue and Kenji Shimoda 1977. Electron microscopic observations on the penetration of oncospheres of *Hymenolepis nana* into the intestine of the mouse. *Acta medica Kinki University* Vol. 2, 1-18.
61. Tato P, Castro AM, Rodriguez D, Soto R., Arechavaleta F, and Molinari JL. 1995. Suppression of murine lymphokine proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res*, 81:181-187.
62. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol* 84:74-81.
63. Toenjes SA and Kuhn RE 2003. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. *Parasitol Res.* Mar;89(5):405-13. Epub2002 Dec 17.
64. Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response, *Parasitology* 118 (623-633).
65. Tsang V.C.W, Wilson M 1995: *Taenia solium* cysticercosis: recognized but serious public health problem. *Parasitol Today*;11:124-126.
66. Vandenbroeck K, Dijkmans R, Van Aerschot A, and Billiau A. 1991 Engineering by PCR- based exon amplification of the genomic porcine interferon-gamma DNA for expression in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 180:1408-1415.

67. Villagran Uribe J, Olvera Rabiela JE 1989. La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México, In Flisser A, Malagón F (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, México. Limusa Noriega; p.97-105.
68. White AC , Jr, Dakik H, Diaz P 1995: Asymptomatic neurocysticercosis in a patient with AIDS and cryptococcal meningitis. Am J Med; 99: 101-102.
69. White AC, Jr, Baig S, Robinson P 1996: *Taenia saginata* oncosphere excretorysecretory peptidases. J. Parasitol; 82:7-10.
70. White AC, Robinson P, Kuhn R 1997: *Taenia solium* cisticercosis: Host-parasite interactions and the immune response, Chem. Immunol. 66 209-230.
71. Willms K, and Merchant MT, Arcos L, Sealey M, and Díaz de León L 1980 Immunopathology of cysticercosis. In: Molecules, cells and parasites in immunology. Larralde C, Willms K, Ortiz L, and Sela M (eds). Academic Press, New York. pp 145-162.
72. Willms K. and Merchant MT 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol 2:26-275.
73. Willms Kaethe 1998. Cestodes (Tapeworms). INFECTIOUS DISEASES. Sherwood L. Gorbach, John G. Bartlett, Neil R. Blacklow, Editors. Second Edition, W.B. Saunders, Co. Philadelphia.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Cisticerco de *Taenia solium* obtenido de cerdo y clasificado en el Grado 1 (Aluja y vargas 1988).
- Figura 2 Composición de la reacción inflamatoria en la muestra de cerdo del Grado1.
- Figura 3 Exudado inflamatorio de cerdo cisticercoso del Grado 1 que se observó en contacto con el parásito.
- Figura 4 Cisticercos en músculo de cerdo con reacción inflamatoria Grado 3.
- Figura 5 Células inflamatorias infiltrando el canal espiral de cisticercos en músculo de cerdo en reacción inflamatoria Grado 3.
- Figura 6 Cisticercos con reacción inflamatoria Grado 4.
- Figura 7 Células inflamatorias en los cisticercos clasificados en el Grado 4.
- Figura 8 Cisticercos totalmente degenerados (Grado 5).
- Figura 9 Acercamiento de la figura 8
- Figura 10 Testigos de Hibridación *in situ*.
- Figura 11 Determinación de células productoras de ARNm para IFN- γ
- Figura 12 Determinación de células productoras de ARNm para IL-2
- Figura 13 Determinación de células productoras de ARNm para IL-10
- Figura 14 Determinación de células productoras de ARNm para TNF- α
- Figura 15 Comparación del perfil de ARN mensajeros para citocinas en los distintos grados de la reacción inflamatoria.
- Figura 16 Comparación de la expresión de ARN mensajeros para cada citocina en los distintos grados de la reacción inflamatoria.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Perfil de mensajeros para citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 1. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.

Cuadro 2: Perfil de mensajeros para citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 3. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.

Cuadro 3: Perfil de mensajeros para citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 4. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.

Cuadro 4: Perfil de mensajeros para citocinas en la reacción inflamatoria de cerdos clasificados en el Grado 5. Infiltración de células inflamatorias en el parásito y viabilidad.