



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE MN, NI Y CU
DURANTE LA INFECCIÓN CON
TOXOPLASMA GONDII EN UN
MODELO MURINO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA-FARMACÉUTICO-BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

SANDRA APANGO DÁVALOS



MÉXICO, D. F.

2006



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.

Jurado asignado

Presidente	Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	Patricia Elvira Berrón Ruiz
Secretario	Rafael Simitrio Saavedra Durán
1er. Suplente	Heras Chavarría Mónica Berenice
2do Suplente	Espinoza Gutiérrez Bertha Josefina

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.



Dr. Rafael S. Saavedra Durán
Asesor



Sandra Apango Dávalos
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rafael S. Saavedra Durán por su asesoría y confianza.

DEDICATORIA

*Con mucho cariño para toda mi familia,
especialmente a mi hermana
Georgina Galicia Rosas.*

ÍNDICE

RESUMEN...	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1.1 Generalidades de los Metales.....	3
I.1.2. Toxicidad.....	3
I.1.3 Mutagénesis.....	4
I.1.4 Efecto de los metales en el sistema inmune.....	4
I.2. Manganeso (II).	5
I.3. Níquel (II).....	6
I.4. Cobre (II).....	7
I.5. <i>Toxoplasma gondii</i>	8
I.5.1 Generalidades del parásito.	8
I.5.2 Morfología y ciclo de vida.	10
a) Ooquistes.....	10
b) Taquizoíto.....	10
c) Quistes.....	10
I.5.3 Epidemiología	
a) Transmisión.....	11
b) Patología.....	11
I.5.4 Respuesta inmune.....	15
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO	16
III. MATERIAL Y MÉTODOS	17
III.1.1 Exposición de animales a metales.....	17
a) Ratones.....	17
b) Metales.....	17
III.1.2 Exposición de los animales a metales.....	17
III.1.3 Obtención y mantenimiento de tipos de cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	
a) Cepa Me49.....	17
b) Soluciones: medio completo.....	18
c) Pasaje y cultivo de Fibroblastos Humanos.....	18
d) Cepa ts-4.....	18
e) Cepa RH / Cultivo in Vitro.....	19
III.1.4 Infección con <i>Toxoplasma gondii</i>	
a) Cepa Me49.....	19
b) Cepa ts-4.....	19
c) Reto con RH.....	19
III.1.5 ELISA para la determinación de anticuerpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i>	
a) Soluciones.....	20
III.1.6 ELISA para la determinación de Isotipos IgG1 e IgG2a.....	21
IV. RESULTADOS	
IV1.1 Infección con la cepa ts-4.	22
IV1.2 Infección con la cepa Me49.	27
V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	33
VI. REFERENCIAS	36

RESUMEN

El ser humano se encuentra expuesto a diversos contaminantes. Dentro de estos encontramos a los metales, los cuales tienen la capacidad de modificar las actividades de las células del sistema inmune por diferentes mecanismos dependiendo del metal, su concentración y biodisponibilidad. El resultado de esta modulación puede ser un estado de inmunosupresión, el desarrollo de un proceso autoinmune o alérgico. Un desequilibrio en la regulación inmune por metales puede conducir a una producción inadecuada de esta respuesta.

Los metales pueden alterar las actividades inmunorregulatorias rompiendo la homeostasis del sistema inmune. Se ha estudiado el efecto de los metales de manera individual sobre el sistema inmune pero poco se sabe sobre el efecto que tienen en los organismos cuando están presentes en una mezcla y el efecto adverso sobre el sistema inmune el cual puede ser antagónico o sinérgico.

En el valle de México se han realizado estudios sobre partículas suspendidas y se ha encontrado que algunos metales como el manganeso, cobre, níquel, cadmio, cromo, plomo, titanio y hierro, exceden en 50 % de lo permitido por la OMS en partículas suspendidas en el aire, lo cual representa un riesgo para la salud.

Por otro lado, estamos continuamente expuestos a agentes patógenos, hacia los cuales el sistema inmune reacciona, montando una respuesta que permite el control efectivo del agente infeccioso. Por lo tanto, la interacción de los contaminantes en el sistema inmunológico podría modificar la respuesta inmune hacia estos patógenos. Ya que el modelo murino de toxoplasmosis es bien conocido en cuanto al tipo de respuesta inmune que induce, el tipo de respuesta que protege contra la infección, las células y citocinas que intervienen, así como los diferentes factores del hospedero (sexo, edad, haplotipo) que influyen en la resistencia o susceptibilidad hacia el parásito, decidimos utilizarlo como modelo para estudiar el efecto de una mezcla de metales contaminantes sobre la respuesta inmune.

Realizamos los experimentos con ratones machos C57BL/6J que son susceptibles a *T.gondii* y como controles ratones BALB/c, los cuales son resistentes a *T. gondii*. Se usaron ratones hembras y machos de 6 a 7 semanas de edad, de las cepas C57BL/6 y BALB/c.

A partir de la 4^a semana de vida, los ratones fueron expuestos a la mezcla de metales en agua de bebida durante tres semanas y posteriormente durante todo el tiempo de la infección con *Toxoplasma gondii*.

En este estudio observamos que la mezcla de Mn, Ni y Cu retrasó la mortalidad en los ratones machos C57BL/6J infectados con quistes de la cepa Me49 de *T. gondii*. Por lo que concluimos que la exposición a la mezcla de metales aumenta la resistencia a este parásito.

Con el fin de determinar la causa de este aumento en la resistencia, analizamos los títulos de anticuerpos IgG totales anti-*Toxoplasma gondii*, así como también los isotipos IgG1 e IgG2a, los cuales están asociados a una respuesta tipo TH2 y TH1 respectivamente. Se observó un incremento de los anticuerpos totales y un incremento de los isotipos IgG1 e IgG2a. El presente estudio demuestra que la mezcla de Mn, Ni y Cu en ratones C57BL/6J modifica la producción de anticuerpos totales durante el progreso de la infección con *T. gondii*.

I. ANTECEDENTES

I.1.1 Generalidades de los Metales

Los metales y metaloides se encuentran en la naturaleza distribuidos en el aire, el agua y fuentes naturales como erosiones volcánicas (1). Muchas de las especies de metales son importantes en los sistemas ambientales y en las funciones biológicas, ya que participan en sistemas redox como componentes y activadores enzimáticos. Los metales también participan en reacciones de transferencia de electrones (Mn, Fe, Cu) provocando cambios de estados de oxidación y en la catálisis (Cr, Fe, Cu, Zn, Co) (2).

Los metales pueden existir en sus estados elementales o unidos a ligandos inorgánicos u orgánicos; dichas formas se absorben en el intestino, por procesos de difusión seguidos por gradientes de concentración como resultado de su similitud con los nutrientes metálicos del organismo (3). El grado de absorción se ve afectado por los estados de oxidación, procesos de metilación y por la unión de carbono al metal. Los iones metálicos una vez absorbidos entran al torrente sanguíneo y se adhieren específicamente a proteínas del plasma y la ceruloplasmina (4). Los metales son depositados en órganos como el hígado y riñón; las proteínas que están en los órganos tienen una alta capacidad por unión a los metales y hay algunos metales que pueden atravesar la barrera hematoencefálica por medio de moléculas liposolubles (2,3).

I.1.2. Toxicidad

Los factores más importantes que influyen en la toxicidad de los metales son la concentración, la solubilidad, el tamaño de partícula, estado de oxidación, tiempo de exposición, el pH de la disolución en la que se encuentran los metales así como la velocidad de absorción de los metales pesados (1,5), el género, edad, estado de salud (pacientes inmunodeficientes o inmunocomprometidos), genética del individuo (6, 7). Estos factores pueden llevar a una intoxicación crónica con efectos irreversibles o incluso la muerte del individuo. Frecuentemente los metales pesados contaminantes compiten con los metales traza por sitios específicos (enzimas y/o proteínas) alterando el sistema y

conduciendo a una toxicidad exacerbada de dichos metales. Si aumenta la toxicidad se forman complejos altamente estables que inducen a cambios conformacionales entre el metal y la enzima. Esta unión tiene gran afinidad por grupos imida, amino y sulfuro (3, 5, 8).

I.1.3 Mutagénesis

En los humanos los metales tienen efectos carcinogénicos que están asociados con la alta exposición ocupacional. Un gran número de metales y derivados metaloides inducen mutaciones puntuales en el DNA de sistemas eucariotes y procariotes (1, 3). Los ácidos nucleicos tienen centros nucleofílicos, los cuales son los sitios de unión favoritos de los metales. El daño más grave es cuando el metal se une al DNA en la fase de entrecruzamiento; los metales como Cu, Zn, Co, Mn y Cr, se unen a la guanina e inducen la quelación de complejos DNA– metal afectando la fidelidad de la replicación del DNA (1, 3, 9,10).

I.1.4 Efecto de los metales en el sistema inmune

El sistema inmune tiene como función proteger al organismo de agentes infecciosos como bacterias, virus, hongos y parásitos. Para llevar a cabo esta función el sistema inmune tiene la necesidad de distinguir entre lo propio y lo no propio. Cualquier respuesta inmune involucra el reconocimiento del elemento extraño y la reacción para eliminarlo. La respuesta inmune tiene una división funcional: respuesta innata y respuesta adquirida. Ambas respuestas involucran diferentes moléculas (complejos, anticuerpos, citocinas) y células (B, T, NK, macrófagos) (10).

Diariamente el ser humano se encuentra expuesto a un amplio espectro de contaminantes ambientales presentes en la comida, el agua y el aire (11, 12). Dentro de estos contaminantes ambientales encontramos a los metales, los cuales tienen la capacidad de modificar las actividades de las células del sistema inmune por diferentes mecanismos dependiendo del metal, su concentración y biodisponibilidad. El resultado de esta

modulación puede ser un estado de inmunosupresión, el desarrollo de un proceso autoinmune o el desarrollo de un proceso alérgico (13, 14).

El desequilibrio en la regulación del sistema inmune por metales que puede conducir a una producción inadecuada de esta respuesta (14, 15, 16). La inmunomodulación por metales tiene una amplia variedad de mecanismos (10, 12, 15), los cuales dependen de muchos factores antes mencionados. Existen, por ejemplo; diferentes vías por las cuales un metal es capaz de inducir una respuesta en las células T (17), algunas de estas vías se relacionan con los efectos en la transducción de señales y otras pueden afectar la presentación de antígenos (13).

I.2. Manganeso (II)

El manganeso es un elemento común en la naturaleza, se encuentra formando minerales y es sensible a cambios de pH, reacciones redox y solubilidad. Estos factores facilitan la liberación del manganeso al agua subterránea (18). El manganeso presenta estados de oxidación desde muy altos como Mn (IV), Mn (III) hasta el Mn (II) (1, 2, 19).

El manganeso (II) es un elemento esencial para el organismo, ya que es utilizado en la formación de tejido conectivo y huesos (20). El Mn (II) funciona como catalizador en distintas rutas metabólicas y participa de manera importante en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (21,22, 23). Se sabe que el Mn (II) es parte del sitio catalítico de la enzima superóxido dismutasa (Boscolo et al 1999).

En la sangre el Mn (II) es oxidado a Mn (III) y es transportado junto con la transferrina al interior de las células (24).

La absorción del Mn (II) está modulado por la cantidad de Fe presente en el organismo. En las plantas el Mn (II) se adhiere a una proteína y regula la fotosíntesis del sistema II para la liberación de O₂, donde se sustituye el Ca (II) por Mn (II) que le es útil para otras actividades que realiza (19).

Generalmente el Mn (II) no forma metaloproteínas sino que intercambia el complejo metal en las proteínas y compite con otros elementos traza por los sitios catalíticos (6, 19).

El Mn es un elemento neurotóxico (25) y una exposición prolongada al metal causa la

enfermedad llamada manganismo (8, 26), la cual se manifiesta clínicamente por dolor de cabeza, irritabilidad, astenia, anorexia y dificultad en el lenguaje en la primera etapa; temblores similares a la enfermedad de Parkinson, disminución en la capacidad de la memoria y rigidez muscular que al prolongarse afecta el sistema locomotor (15,17). Una deficiencia o un exceso de manganeso en el organismo conduce a una disfunción del sistema inmune (17, 27), por ejemplo, la exposición a las concentraciones de 60 a 90 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ por vía aérea de manganeso tiene efectos citotóxicos en linfocitos T e incrementa la cantidad de leucocitos polimorfonucleares (15,18).

I.3. Níquel (II)

Es un elemento ultra-traza, común en la naturaleza, el cual proviene de la sedimentación volcánica y la erosión de las rocas que se relaciona con las cantidades de níquel presentes en el agua subterránea (28). Los estados de oxidación más comunes son Ni (I) y Ni(II). Los vehículos y la industria de electroplatación emiten la mayor parte de partículas de níquel, las cuales se encuentran suspendidas en el aire y en el agua como contaminantes y causan daños a la salud (29 - 31).

El Ni (II) desempeña una función importante en el organismo, específicamente con la enzima ureasa; dos iones de Ni (II) son necesarios para conservar el equilibrio del amoníaco producido por la reacción de hidrólisis de la urea (30). Una vez que es absorbido, atraviesa la membrana celular vía canales de calcio y compite con los receptores específicos de Ca (II). El Ni (II) se une a la albúmina, en donde el Ni (II) compite con el Cu (II) por el sitio de unión. El Ni (II) se absorbe en el organismo en un 5 %, su tiempo de vida media es corto y se excreta por orina y sudor. Pequeñas cantidades se acumulan en tejidos y en el cabello (29, 32).

Estudios recientes sugieren que los elementos ultra-traza como el Ni (II) pueden tener un papel importante en la nutrición de los humanos y animales (1, 8, 29).

Sin embargo, la exposición prolongada al níquel puede ocasionar dermatitis alérgica, eritema, eczema en manos, asma, conjuntivitis, reacciones inflamatorias y otros desórdenes en el sistema inmune. Se ha observado en datos epidemiológicos y en animales experimentales que existen efectos que pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de

laringe, riñón, próstata y estómago (33- 35).

En el sistema inmune el Ni (II) induce apoptosis en células T de ratón (33) Se ha demostrado que la inhalación de compuestos de Ni tienen diversos efectos en el sistema inmune dependiendo de la concentración y del estado de oxidación en el que se encuentre (dosis y compuesto administrado) (36). Ratonos expuestos a NiSO₄ por vía aérea presentan disminución en el peso del timo, disminución en la función de las células NK en el bazo y un incremento en el número de nódulos linfáticos asociados al intestino (31).

En el humano la ingestión de NiCl₂ (10 mg) estimula el sistema inmune, induciendo la maduración de linfocitos T (31, 33). Se ha demostrado que las células de Langerhans son capaces de presentar antígenos derivados de las proteínas propias unidas al níquel que activan a las células T específicas para Ni (33, 35). La exposición al níquel tiene un efecto adverso en la función y en la actividad de los macrófagos así como la supresión a las respuestas de las células NK (32) e incrementa la resistencia a cambios celulares (tumores) en el sistema respiratorio (31-33)

I.4. Cobre (II)

El cobre se encuentra en el agua, aire y en algunos alimentos como micronutriente esencial en la dieta humana (29, 37, 41). Los estados de oxidación principales son el ion divalente Cu (II) y el ion monovalente Cu (I). Una vez que el cobre es absorbido se une a la albúmina y se dirige hacia el hígado y por medio de diversas biotransformaciones el cobre se une a la ceruloplasmina y es transportado a la circulación hasta llegar a diferentes tejidos (8, 38).

Cuando hay un exceso de cobre existen proteínas (haemocianina) y enzimas (galactosa oxidasa, nitrito reductasa, ascorbato oxidasa) poderosamente quelantes que tienen la capacidad de remover el exceso (39 - 43), pero si se altera esta actividad y hay un incremento en las cantidades de cobre, se modifica el metabolismo de lípidos e induce la peroxidación lipídica de las membranas celulares, así como un incremento en la expresión de p53 que conduce a la alteración de la proliferación celular (42, 44 - 46).

El cobre está asociado a enzimas oxidativas y a la captura de energía en el sistema de transferencia de electrones localizado en el citoplasma. Una de las enzimas de mayor

importancia es la citocromo oxidasa, que se encuentra localizada en la parte externa de la membrana mitocondrial y que tiene como función reducir el O_2 a H_2O (42, 46, 47). El Cu (II) también se encuentra en las células “chromaffin” de la glándula adrenal donde el cobre junto con el Fe está involucrado en la síntesis y la oxidación de adrenalina (29, 42, 48).

El Cu (II) participa con la enzima superóxido dismutasa protegiendo al DNA del anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) convirtiéndolo en O_2 y H_2O_2 . El Cu (II) también controla las altas producciones de iones metálicos y protege a las células de los radicales libres (42, 48).

La presencia de zinc en el organismo se relaciona con el cobre, ya que cantidades excesivas del zinc dañan el metabolismo del cobre (49).

La exposición prolongada puede provocar perforación de los nódulos nasales y está asociada a cáncer de pulmón (46). Se ha demostrado que el cobre es un metal que participa en la regulación de secreción de citocinas; la producción de IL-2 se ve reducida en casos de deficiencia de cobre así como el número de neutrófilos en sangre periférica humana (37, 41). El cobre tiene la capacidad de estimular la producción de INF- γ (49).

I.5. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii es un protozooario intracelular obligado, clasificado dentro del phylum *Aplicomplexa*, subclase *Coccidia* (50, 51). La especie fue aislada del roedor *Ctenodactylus gondii* en 1908. El nombre del género deriva de la palabra griega taxón que significa arco, ya que tiene la forma de media luna en estado de taquizoíto. En 1970 se conoció el ciclo de vida completo del parásito y a partir de los 80's surgió como uno de los oportunistas más frecuente en individuos con SIDA (52).

I.5.1 Generalidades del parásito

Este parásito se encuentra distribuido en todo el mundo y una tercera parte del mundo se encuentra infectada con *T. gondii* (53). En individuos inmunocompetentes, la infección es espontáneamente controlada, de tal manera que en 80 a 90 % de los casos no se observa ningún síntoma o patología. Sin embargo, la toxoplasmosis puede tener

consecuencias graves en individuos inmunodeficientes, y en mujeres embarazadas puede ocurrir aborto (54 - 57).

Presenta una fase de reproducción sexual en el hospedero definitivo (felinos) y una fase asexual que tiene lugar en los hospederos intermediarios (Fig. 1).

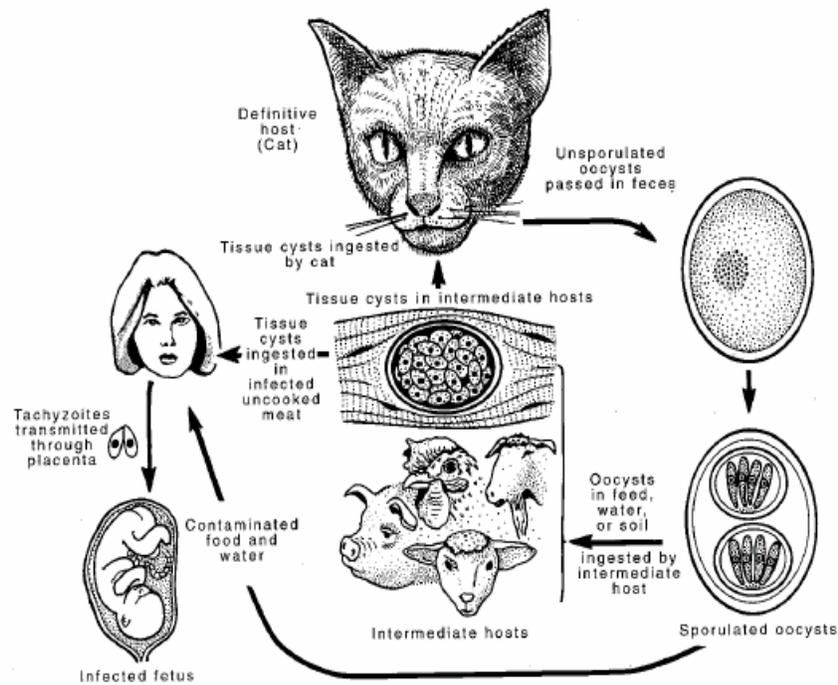


FIG. 1. Life cycle of *T. gondii*.

Figura 1.- Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

I.5.2 Morfología y ciclo de vida

T. gondii presenta una fase de reproducción sexual en el hospedero definitivo (felinos) y una fase asexual que tiene lugar en los hospederos intermediarios (**Fig. 1**). Los tres estadios en su ciclo de vida a) Ooquiste (con esporozoítos), b) taquizoíto y c) quiste (con bradizoítos) (51, 52, 55).

a) Ooquistes

La fase sexual ocurre en el hospedero definitivo (Felidae), en las células epiteliales del intestino delgado. La manera en que el gato adquiere la infección es a través de la ingestión de bradizoítos o de ooquistes esporulados. El tiempo en que los gatos excretan en heces los ooquistes va a depender del estadio parasitario que ingirió (58).

En el ciclo sexual se producen ooquistes, a partir de microgametos que representan la forma parasitaria masculina, con capacidad de desplazarse sobre el epitelio intestinal para llevar a cabo la fertilización de la forma femenina conocida como macrogameto, produciendo el cigoto que da lugar al ooquiste. Los ooquistes son excretados en las heces y esporulan en el suelo. Después de la esporulación, los ooquistes contienen esporozoítos que son infectivos cuando son ingeridos por hospederos intermediarios (56, 58).

b) Taquizoíto

Los taquizoítos miden entre 2- 4 μm de ancho y 4- 8 μm de largo, tienen forma oval, se multiplican rápidamente y penetran de manera activa formando una vacuola citoplásmica e invaden células nucleadas (50, 51)

c) Quistes

Los quistes tisulares contienen cientos de miles de bradizoítos, los cuales invaden tejido extraintestinal y permanecen a lo largo de la vida del hospedero. Los quistes sobreviven el pasaje a través del estómago y se rompen con la ayuda de líquidos digestivos del hospedero en el intestino delgado y se diseminan en torrente sanguíneo principalmente en órganos como cerebro, músculo cardíaco, SNC y placenta (50-55). El bradizoíto es

morfológicamente similar al taquizoíto, pero con tiempo de división más largo. Los bradizoítos se encuentran dentro de los quistes. Los quistes aparecen en los tejidos 8 días después de la infección y persisten probablemente durante toda la vida del hospedero, lo que da lugar a la fase crónica de la infección. Los quistes se encuentran en diferentes tejidos, particularmente en el sistema nervioso central, los ojos, el corazón y músculos estriados. (58 - 60).

I.5.3 Epidemiología.

a) Transmisión

Toxoplasma gondii infecta a animales de sangre caliente (50, 51). Se transmite a través de la vía oral por el consumo de agua o comida (carne roja) que contiene quistes u ooquistes excretados por heces de gato (56, 58)

Otras formas de transmisión son de madre a feto; es menos frecuente cuando la infección es adquirida antes de las 10 semanas de gestación y es raro cuando la infección se adquiere antes de la concepción. El daño es severo cuando es adquirida durante el primer trimestre de gestación. La infección puede causar la muerte del feto in utero o aborto espontáneo (55 - 57, 61 - 63).

b) Patología

En una toxoplasmosis adquirida se presenta linfadenitis, generalmente asintomática en el 80 % de los casos y se controla espontáneamente (63 - 65). La toxoplasmosis ocular produce corioretinitis aguda que se caracteriza por una inflamación severa y necrosis (65, 66). La toxoplasmosis congénita presenta vasculitis periventricular y necrosis calcificante en el cerebro, es más intensa en áreas como ganglios basales y corteza cerebral; la hidrocefalia es el resultado de la obstrucción del acueducto de Sylvius o foramen de Monro (54, 64, 66). En individuos inmunocomprometidos especialmente en pacientes con SIDA hay presencia de abscesos en cerebro, lo cual es característico de encefalitis toxoplásmica con una notable predilección por ganglios basales y complicaciones pulmonares que conducen a neumonitis intersticial, neumonía necrosante y efusión plural (67, 68).

I.5.4 Respuesta inmune

La respuesta inmune está mediada por las células T específicas contra el parásito. La activación de la respuesta inmune juega dos papeles importantes durante la infección de *T. gondii*. El primero es limitar la replicación de los taquizoítos y el segundo es el desarrollo de la respuesta de las células T y la diferenciación del precursor de las células Th (Thp) (69,70). Los macrófagos y las células NK se activan y producen citocinas como la IL-12, la cual conduce al desarrollo de una respuesta mediada por las células T, el IFN- γ así como otras citocinas TNF- α , IL-1 β y la IL-15 se activan durante los estados tempranos de la infección de *Toxoplasma* (71). Al inicio de la infección hay una activación de células NK y secreción de IL-12, esenciales para desencadenar una respuesta inmune dependiente del INF- γ . Los macrófagos y las células dendríticas secretan IL-12 durante la infección y son una fuente abundante de esta citocina y se desarrolla una respuesta inmune Tipo 1 junto con las células CD8⁺ y CD4⁺ para mantener el control de la infección aguda y crónica (72 - 75).

El IFN- γ tiene efectos muy importantes en el sistema inmune ya que es el principal mediador contra la resistencia con *T. gondii*. El IFN- γ es un factor importante para la diferenciación de CTL así como la promoción de la expresión del MHC (76). Los isotipos IgG1 e IgG2a juegan un papel fundamental en la resistencia a diferentes patógenos a través de mecanismos como fijación del complemento y opsonización (77, 78, 79). Existen vías alternas para inducir la síntesis de IFN- γ , dependiente e independiente de células T (**Fig. 2**) La vía dependiente involucra a la IL-12, TNF- α , IL-1 β y la IL-15. Estas citocinas pro-inflamatorias inducen a las células NK para producir IFN- γ , la cual puede promover la activación de macrófagos y la actividad microbostática así como la diferenciación de las células Th1 (80). Otra vía es la presentación de antígenos por las células presentadoras de antígeno (APC) como resultado de la diferenciación Th1 en la presencia de los derivados de las células T y la producción de IL-2 e IL-12 por las células presentadoras de antígeno (72, 81).

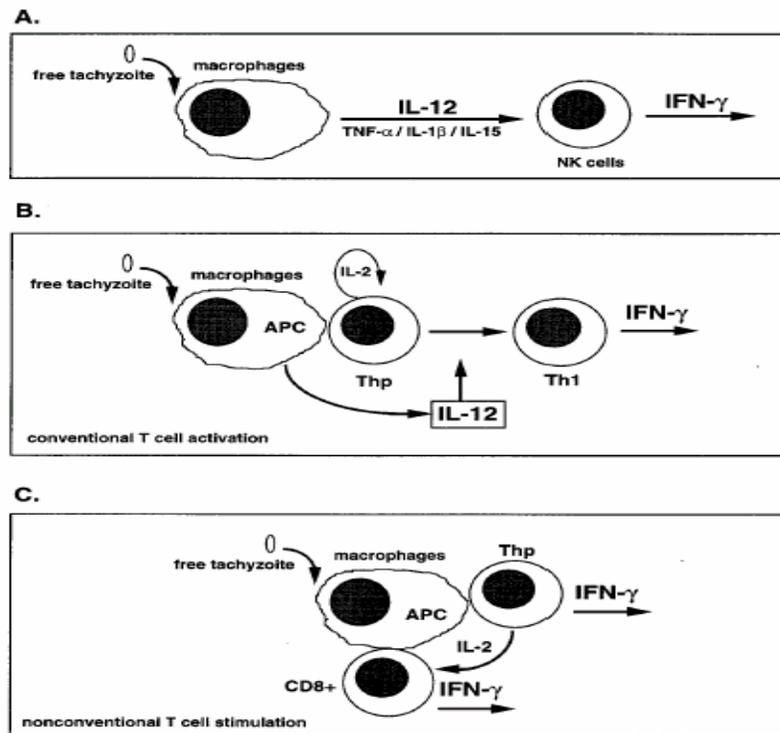


Figura 2. Vías alternas para inducir la síntesis de IFN- γ , dependiente e independiente de células T.

La infección con *T. gondii* estimula la activación de los linfocitos T $\alpha\beta$ durante los primeros días y como resultado de esta estimulación ocurre la producción del IFN- γ . La inmunidad inducida por *T. gondii* se caracteriza por una actividad de CD8⁺ y CD4⁺. Los antígenos del parásito son presentados a los linfocitos T específicos y junto con las citocinas Th1 inician la activación de CTL (en particular los efectores CD8⁺) para producir grandes cantidades de IFN- γ (82 - 84,) (**Fig. 3**).

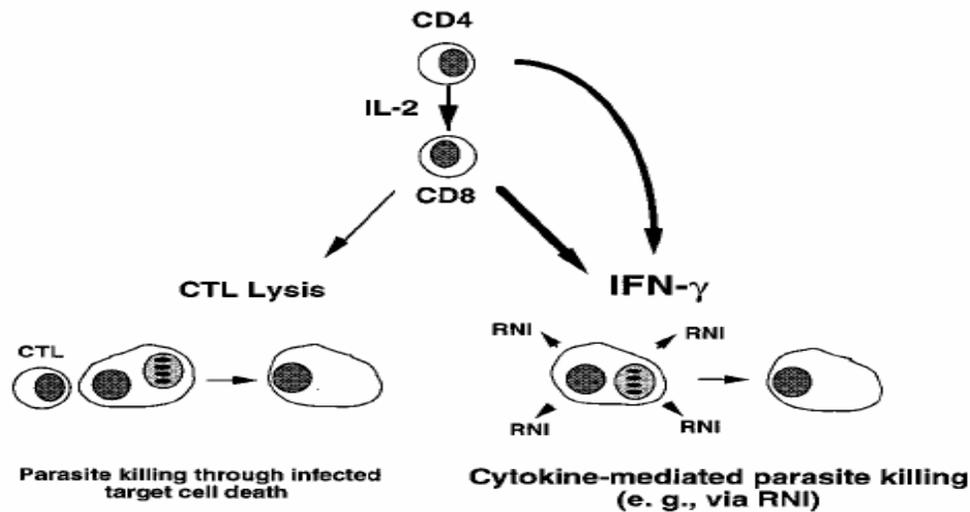


Figura 3. Vías alternas del control de *T. gondii*.

La producción de citocinas y otros mediadores pro-inflamatorios son necesarios para la inmunidad. En varios reportes se indica que durante la toxoplasmosis en humanos, las células T CD8⁺ se incrementan en comparación con los linfocitos T CD4⁺ (85, 86). Estas células producen simultáneamente el IFN-γ y se activa la función citolítica que contribuye a la protección (87). La capacidad de los parásitos intracelulares para estimular la función de CTL se relaciona con la capacidad de evadir la vía lisosomal durante la invasión celular (88). En *T. gondii*, la inoculación de la cepa ts-4 atenuada genera efectores de las células T CD8⁺ en ratones junto con los linfocitos T CD4⁺, que confieren una protección inmunitaria muy fuerte al retarlos con la cepa virulenta RH.

La producción temprana de citocinas inflamatorias induce una respuesta inmune mediada por las células T contra el parásito. Si esta respuesta se descontrola puede conducir a cambios inmunopatológicos. Estudios recientes sugieren que la IL-4 tiene un papel regulador durante la toxoplasmosis aguda así como la estimulación con productos microbicidas; por ejemplo, los macrófagos producen altos niveles de NO, el cual tiene efectos anti-proliferativos en las células de la línea linfocítica (89).

Se identificó que la citocina IL-10 tiene la capacidad de inhibir la síntesis de IFN- γ por los linfocitos Th1 y es un regulador fisiológico muy importante en la inducción de citocinas pro-inflamatorias. La citocina IL-4 inhibe las funciones de los macrófagos y potencia el efecto de la IL-10 en estas últimas (90,91, 92).

Los macrófagos regulan la respuesta inmune durante la toxoplasmosis aguda a través de la generación de NO.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO

El problema de la contaminación atmosférica en la ciudad de México se ha estudiado por más de 40 años y en las últimas dos décadas se ha agravado por el crecimiento de la industria y la población donde no hay un control adecuado sobre las medidas que deben implementarse. En la ciudad de México se realizan mediciones semanales y análisis estadísticos para la contaminación por medio de una red automática de monitoreo atmosférico (RAMA) establecido en 1986.

Se hicieron estudios en el valle de México sobre partículas suspendidas y en porcentaje PM10 de metales como el manganeso, cobre, níquel, cadmio, cromo, plomo, titanio, hierro, los cuales exceden el 50 % de lo permitido por la OMS en partículas suspendidas en el aire lo cual representa un riesgo para la salud.

El Hg, Pb, Ni, Zn y V alteran las actividades de las células del sistema inmune por varios factores como biodisponibilidad, concentración y características del organismo expuesto. La premisa en general es que los metales pueden alterar las actividades inmunoregulatorias rompiendo la homeostasis del sistema inmune dando como resultado una inmunodeficiencia o bien un estado de autoinmunidad (Fournié et al. 2001; Hulman y Nieisen 2001).

En la ciudad de México la población se encuentra expuesta a éstos. Se ha estudiado el efecto de los metales de manera individual sobre el sistema inmune, pero poco se sabe sobre el efecto que tienen sobre los organismos cuando están presentes en una mezcla y el efecto adverso sobre el sistema inmune el cual puede ser antagónico o sinérgico.

En el presente trabajo nuestro objetivo fue determinar el efecto de una mezcla de Mn, Ni y Cu en ratones machos C57BL/6J, los cuales son susceptibles a la infección contra *T. gondii*. Comenzamos a realizar el experimento con ratones machos C57BL/6J y como controles ratones BALB/c, los cuales son resistentes a *T. gondii*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1.1 Exposición de animales a metales

a) Ratones.

Se usaron ratones machos de 6 a 7 semanas de edad, de las cepas C57BL/6 y BALB/c. Se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Todos los ratones tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*.

b) Mezcla de metales.

Se preparó una solución 100X de los siguientes metales: $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (20 μM) + NiCl_2 (6 μM) + CuCl_2 (11 μM) en agua milli Q fresca. Se filtró por membranas de 0.45 μM y se depositó la mezcla en un tubo de polietileno, la cual se administró en agua de bebida.

III.1.2 Exposición de los animales a metales

A partir de la 4^a semana de vida, los ratones fueron expuestos a la mezcla de metales en agua de bebida tres semanas antes y durante todo el tiempo de la infección. Se hicieron dos cambios a la semana al día 4 y día 7 y se registró el peso corporal una vez por semana.

III.1.3 Obtención y mantenimiento de cepas de *Toxoplasma gondii*

a) Cepa Me49

Se sacrifica un ratón, infectado dos meses antes con *T.gondii* (cepa Me49), se sumerge en etanol y se corta la cabeza, la cual es fijada con agujas en una placa de unisel. Se corta la piel y el hueso de la cabeza hasta exponer el cerebro. Se extrae el cerebro cuidadosamente

con unas pinzas y se deposita en una caja Petri. Se agregan 500 μ L de DPBS en la caja Petri y se transfieren a un macerador. Se lleva a un volumen de 2 mL con DPBS y se macera el tejido hasta obtener una suspensión homogénea. El macerado se pasa a un tubo de 15 mL. Se toma una alícuota de 10 μ L de la muestra en un portaobjetos, previa asepsia. Se revisa TODA la preparación en un microscopio y se cuenta el número de quistes totales en la preparación. Se calcula el número de quistes/ cerebro. Para mantener la cepa se inoculan por vía i.p. 10 quistes a ratones CD1.

b) Soluciones: medio completo

DMEM	83%
FCS	10%
Piruvato de sodio 100mM	1%
Aminoácidos no esenciales	1%
Glutamina	1%
Tripsina	1%

c) Pasaje y cultivo de Fibroblastos Humanos

Se equilibra el medio y tripsina-EDTA a 37° C. Se elimina por aspiración el medio de una botella de 25 cm² que contenga un cultivo de fibroblastos confluyente. Se agregan 5 mL de DPBS o HBSS. Se enjuaga la monocapa y se deja reposar 5 minutos. Se aspira y se agrega 1 mL de tripsina-EDTA a 37° C. Se incuba a 37 ° C hasta que el tapiz celular se desprende dando golpes a la botella; cuando la mayor parte de las células se hayan despegado, se agregan 2 mL del medio completo y se homogeniza por pipeteo. Se transfiere 1 mL de la suspensión a cada una de las botellas de 25 cm² que contengan 4 mL del medio completo cada uno. Finalmente se incuba a 37° C, con 5% de CO₂ y 100% de humedad. Se repite el pasaje cuando llegue a confluencia (una semana aproximadamente).

d) Cepa ts-4

Los taquizoitos de la cepa ts-4 se cultivan en pasajes seriados en fibroblastos humanos confluentes, con medio DMEM-1 con 1% de FCS. El cultivo se incubaba a 33 ° C en presencia de CO₂ al 5% y 100% de humedad, los taquizoitos proliferan más rápido si se hace un cambio con medio fresco a los dos días de cultivo. Se resiembra al observar lisis de los fibroblastos con taquizoitos en suspensión.

e) Cepa RH / Cultivo in Vitro

Los taquizoitos por lavado de la cavidad peritoneal de ratones con tres días de infección, se lavan con DMEM-1 y se cultivan en pasajes seriados en fibroblastos humanos con medio DMEM-1 con 1% de FCS, con el mismo medio suplementado. El cultivo se incubaba a 37 ° C en presencia de 5% de CO₂, hasta observar lisis de los fibroblastos.

III.1.4 Infección con *Toxoplasma gondii*

a) Cepa Me49. Se usaron 10 quistes/ ratón por vía i.p. Se obtuvieron los quistes de ratones infectados como se describe en el punto a.

b) Cepa ts-4. Los taquizoitos de la cepa ts-4 son cultivados en fibroblastos humanos, como se describe en el punto B. La primera inmunización se realizó con 2×10^4 parásitos por vía i.p; la segunda inmunización fue con 2×10^5 parásitos y la tercera con 2×10^5 parásitos. El tiempo entre cada inmunización fue de quince días.

c) Reto con RH. Los ratones infectados con la cepa ts-4 se inocularon por vía i.p. con 100 taquizoitos de la cepa RH cultivados en fibroblastos. El reto se llevó a después de la tercera inmunización.

III.1.5 ELISA para la determinación de anticuerpos anti- *Toxoplasma gondii*

a) Soluciones

	Composición
PBS pH = 7.8	Na ₂ HPO ₄ (0.02 M) + NaCl (0.15 M) pH = 7.8
Solución de lavado	PBS pH =7.8 + Tween-20 (0.05%)
Solución para diluir	Solución de lavado + BSA (1%)
TMB	Disolver 13 mg de TMB en 1 mL de DMSO, guardar a 4 °C en oscuridad.
H ₂ O ₂ (130 mM)	Diluir 143 µL de H ₂ O ₂ al 30 % en 10 mL de H ₂ O; usar fresco.
Reactivo para revelar	9.8 mL solución amortiguadora de Acetato de sodio. 100 µL TMB. 100 µL H ₂ O ₂ .

Fase sólida: placas de poliestireno de 96 pozos.

Se diluye el extracto de *T.gondii* (TSA2) a 3 µg/mL en PBS pH 7.8 y se colocan 100 µL en cada pozo de una placa de ELISA. Se cubre bien con parafilm y se incuba una noche a 4 °C. Se aspira el líquido y se agrega 150 µL de PBS pH 7.8 + 1% de BSA por pozo. Se cubre y se incuba aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente. Se lava 3 veces con solución de lavado. Se agregan 100 µL/ pozo de cada una de las diluciones de los sueros (1:300, 1:1000, 1:3000, 1:10,000, 1:30,000, 1:100,000, 1:300,000). Se cubre bien y se incuba una noche a 4 °C. Se lava 5 veces y se agregan 100 µL por pozo de un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (GAM-POD) diluido 1:5000. Se cubre y se incuba 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se lava 5 veces y se agregan 100 µL/ pozo de solución de revelado y se incuba a temperatura ambiente en la oscuridad entre 10 y 30 minutos. Se detiene la reacción con 100 µL de H₂SO₄ 1 N. Se lee la densidad óptica a 450/595 nm, en un espectrofotómetro de microELISA.

III.1.6 ELISA para la determinación de Isotipos IgG1 e IgG2a

El protocolo para la determinación de isotipos se lleva a cabo de la misma manera que para la determinación de IgG totales, hasta la incubación de los sueros a probar. Después de la incubación durante una noche a 4 °C, se lava 5 veces y se agregan 100 µL/ pozo de un anticuerpo anti-IgG1 de ratón acoplado a biotina (GAM IgG1-biotina) diluido 1:8000 o un anticuerpo anti-IgG2a de ratón acoplado a biotina (GAM IgG2a-biotina) diluido 1:3000. Se cubre y se incuba 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Después se lava 5 veces y se agregan 100 µL/ pozo de Avidina acoplada a peroxidasa (Avidina-POD) diluido 1:100,000.

Se lava 5 veces y se agregan 100 µL/ pozo de solución de revelado y se incuba a temperatura ambiente en la oscuridad entre 10 y 30 minutos. Se detiene la reacción con 100 µL/ pozo de H₂SO₄ 1N. Se lee densidad óptica a 450/595 nm, en un espectrofotómetro de microELISA.

IV. RESULTADOS

Con el fin de analizar el efecto de una mezcla de Mn, Ni y Cu en ratones machos C57BL/6J, los cuales son susceptibles a la infección contra *T. gondii*. Comenzamos a realizar el experimento con ratones machos C57BL/6J y como controles ratones BALB/c, los cuales son resistentes a *T. gondii*.

IV1.1 Infección con la cepa ts-4.

Los ratones fueron expuestos a la mezcla de metales, la cual fue administrada en agua de bebida tres semanas antes de la primera inmunización con la cepa termosensible de *Toxoplasma gondii* ts-4; posteriormente, y durante todo el tiempo de la infección estuvieron expuestos a dicha mezcla. Después de la tercera inmunización, los ratones fueron retados con 100 taquizoítos de la cepa virulenta RH; como controles se usaron ratones C57BL/6 machos bajo las mismas condiciones de exposición a los metales pero no inmunizados y retados con 100 taquizoítos de la cepa RH. La determinación en la mortalidad se llevó a cabo con la finalidad de conocer el efecto de la mezcla de metales en la generación de una respuesta inmune protectora contra *T.gondii*

En la figura 4A observamos que los ratones inmunizados y no expuestos presentan el 80 % de sobrevivencia al día 20 y disminuye al 50 % al día 30. En contraste, los ratones inmunizados y expuestos mostraron el 100 % de sobrevivencia durante todo el experimento; aunque estas diferencias no sean estadísticamente significativas, observamos que la mezcla de metales retarda el progreso de la enfermedad. Como control, ratones no inmunizados, retados con la cepa RH observamos 100 % de mortalidad

En la figura 4B observamos que al retar ratones no inmunizados, el 80 % de los ratones no expuestos murieron al día 9, mientras que los ratones expuestos presentan el 40 % de sobrevivencia. Por lo tanto, en ratones no inmunizados, la mezcla de metales aumenta la resistencia a la infección; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.

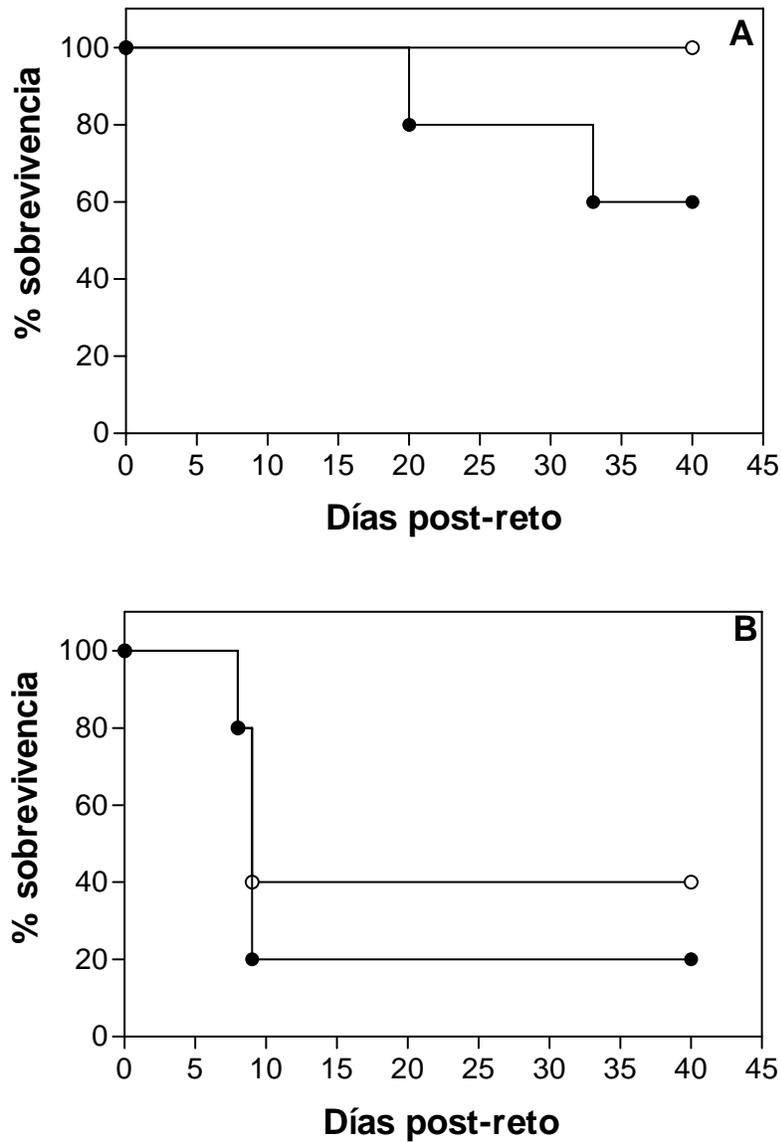


Figura 4. Porcentaje de sobrevivencia en ratones C57BL/6J machos infectados con *T. gondii*. Ratones expuestos (○) de manera crónica a una mezcla de metales y no expuestos (●). Los ratones fueron (A) inmunizados con ts-4 o (B) no inmunizados y retados con 100 taquizoítos de la cepa RH. Las curvas fueron comparadas por la prueba “logrank” usando el programa PRISM.

Con el fin de determinar si la exposición a la mezcla de metales afectaba el estado de salud global de los animales, se registró el peso corporal de cada ratón cada 8 días desde el primer día de exposición a la mezcla de metales y durante todo el tiempo de la

infección con *T.gondii*. En la figura 5 se observa que los ratones expuestos y no expuestos aumentan de peso con el tiempo, y la inmunización parece no afectar el peso.

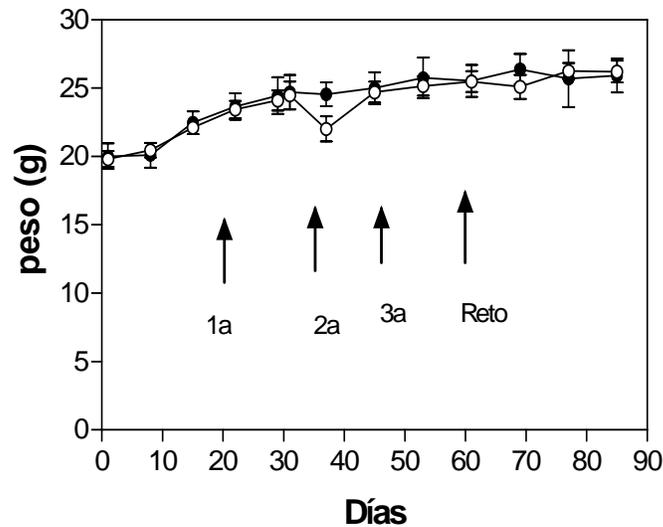


Figura 5. Peso corporal de ratones C57BL/6J machos infectados con *T. gondii*.

Ratones no expuestos (●) o expuestos (○) a la mezcla de metales fueron inmunizados y retados como se indica en la Fig.4 A. El peso se registró cada 8 días. El análisis estadístico que se utilizó fue la prueba t de student, con un intervalo de confianza del 95% (* $p < 0.05$).

Ambos grupos de ratones se comportan de una manera similar, pues no hay diferencias significativas. Por lo tanto, la mezcla de metales no afecta el estado de salud aparente de los animales.

Con el fin de estudiar los efectos de los metales a nivel inmunológico, determinamos los anticuerpos anti- *Toxoplasma gondii* generados después de la inmunización con la cepa ts-4. Se sangraron los ratones después de la última inmunización y se obtuvo el suero.

En la figura 6 observamos la titulación de anticuerpos IgG vs anti- *T. gondii*. Al comparar las curvas de titulación de los animales expuestos y no expuestos, se observa que

los ratones expuestos presentan una D.O. ligeramente mayor que los no expuestos, la cual refleja el título del suero. Por lo tanto, la exposición a metales aumenta ligeramente el título de anticuerpos totales contra *T. gondii*, aunque esta diferencia no fue significativa.

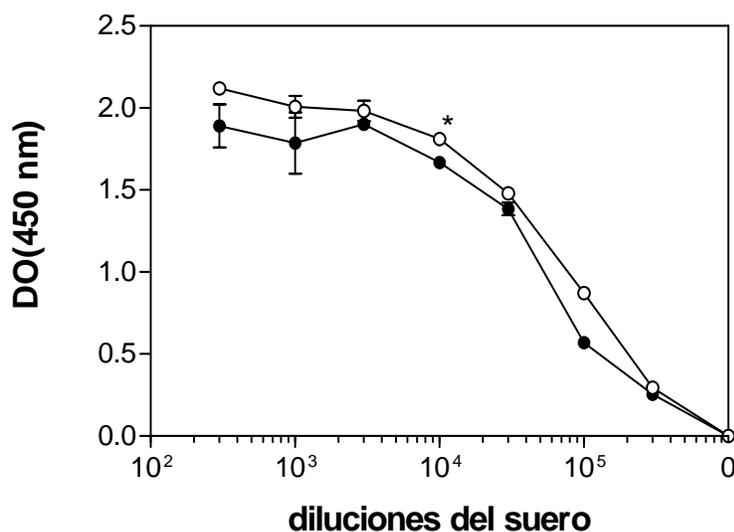


Figura 6. Titulación de anticuerpos IgG anti *T. gondii* de ratones C57BL/6J machos. Ratones no expuestos (●) o expuestos (○) a metales fueron inmunizados y retados como se indica en la Fig.4 A. Se determinó el título des anticuerpos después del reto. El análisis estadístico que se utilizó fue ANOVA con un intervalo de confianza del 95%. (* $p < 0.05$).

Se determinó también si los metales modifican la producción de isotipos IgG1 e IgG2a, característico de una respuesta TH2 o TH1, respectivamente. Se observa en la figura 7A que los ratones expuestos presentan un título ligeramente mayor de anticuerpos IgG1 que los no expuestos (Figura 7 A), y presentan un título ligeramente mayor de anticuerpos IgG2a que los no expuestos (Figura 7 B); esta diferencia es estadísticamente significativa. Por lo tanto la mezcla de metales incrementa la producción de dos isotipos.

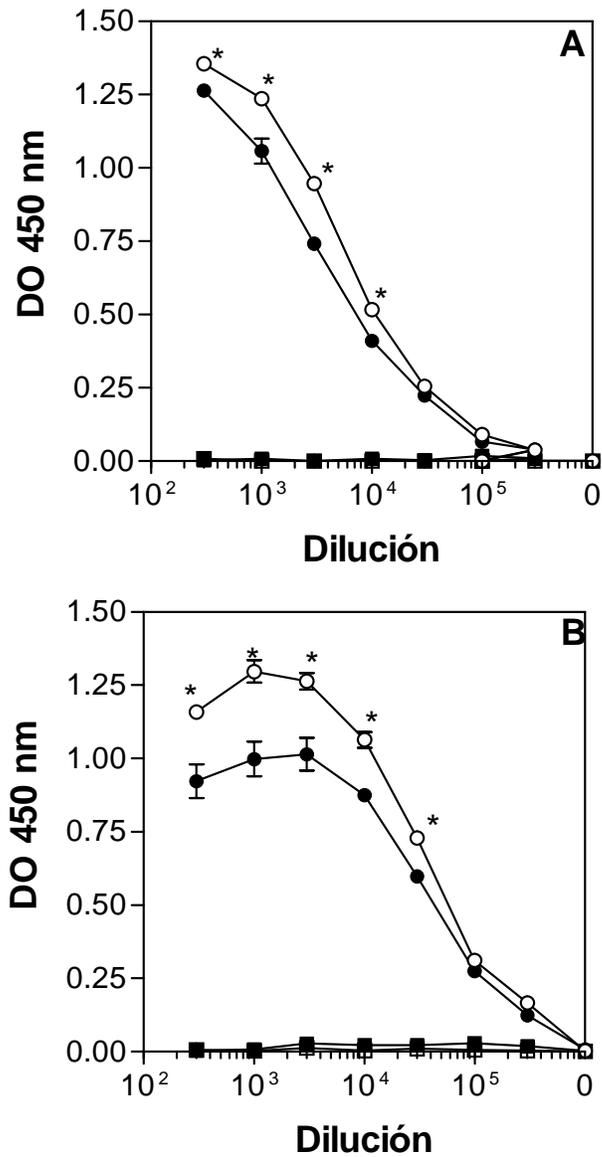


Figura 7. Titulación de isotipos IgG1 e IgG2a en ratones C57BL/6J infectados con *T.gondii*. Ratones no expuestos (●) o expuestos (○) a metales fueron inmunizados con la cepa ts-4 de *T. gondii* y retados con la cepa RH como se indica en la Fig. 4 A. Se determinó el título de anticuerpos del isotipo IgG1 (A) e IgG2a (B) antes del reto. El análisis estadístico que se utilizó fue ANOVA con un intervalo de confianza del 95%. (* $p < 0.05$).

IV1.2 Infección con la cepa Me49

Se determinó el efecto de los metales en ratones infectados con quistes de la cepa Me49, además comparamos las cepas de ratón C57BL/6J y BALB/c, que son susceptibles y resistentes respectivamente, a la infección por *T gondii*

En la figura 8A observamos que los ratones de la cepa C57BL/6 machos no expuestos presentan el 80 % de sobrevivencia al día 15 y disminuye al 50 % al día 80. En contraste, los ratones expuestos presentan el 70 % de sobrevivencia al día 80 y disminuye al 40 % al día 130. Por lo tanto, la mezcla de metales retarda la mortalidad causada por los quistes de la cepa Me49. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la figura 8B observamos que el 80 % de los ratones BALB/c machos no expuestos presentan el 80 % de sobrevivencia al día 3 y este porcentaje de sobrevivencia se mantiene durante todo el experimento. En contraste, los ratones expuestos mostraron el 100 % de sobrevivencia. Por lo tanto, la mezcla de metales retarda la mortalidad.

Con el fin de determinar si la exposición a la mezcla de metales afectaba el estado de salud global de los animales, se registró el peso corporal de cada ratón cada 8 días desde el primer día de exposición a la mezcla de metales y durante todo el tiempo de la infección con *T.gondii*. Al comparar los animales C57BL/6 expuestos y no expuestos (Fig. 9A), observamos que durante el tiempo aumentan de peso, y después de infectarlos disminuye el peso y no lo recuperan, por la infección. Por lo tanto, la exposición a metales no modifica el estado de salud de los ratones. En la figura 9B al comparar a los animales BALB/c expuestos y los no expuestos, observamos que con el tiempo la mezcla de metales no afecta el estado de salud. Por lo tanto, la mezcla de metales no afecta el estado de salud de los animales.

Los ratones BALB/c recuperan peso después de la infección, lo cual refleja que es una cepa resistente a la infección. En contraste, con la cepa C57BL/6 los ratones no recuperan peso corporal y reflejan la susceptibilidad a la infección con *T. gondii*.

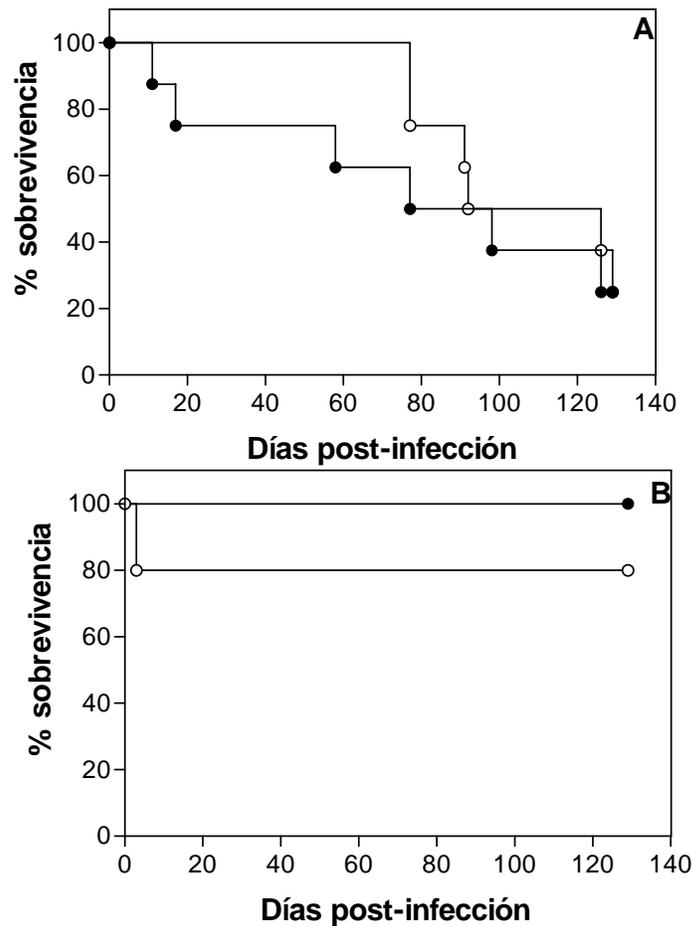


Figura 8. Porcentaje de supervivencia en ratones C57BL/6J y BALB/c machos infectados con quistes de la cepa Me49 de *T. gondii*. Ratones de las cepas C57BL/6J (A) y BALB /c (B) no expuestos (●) o expuestos (○) durante tres semanas a la mezcla de metales fueron infectados con la cepa Me49. La exposición continuó durante todo el experimento. Las curvas fueron comparadas por la prueba “logrank” usando el programa PRISM.

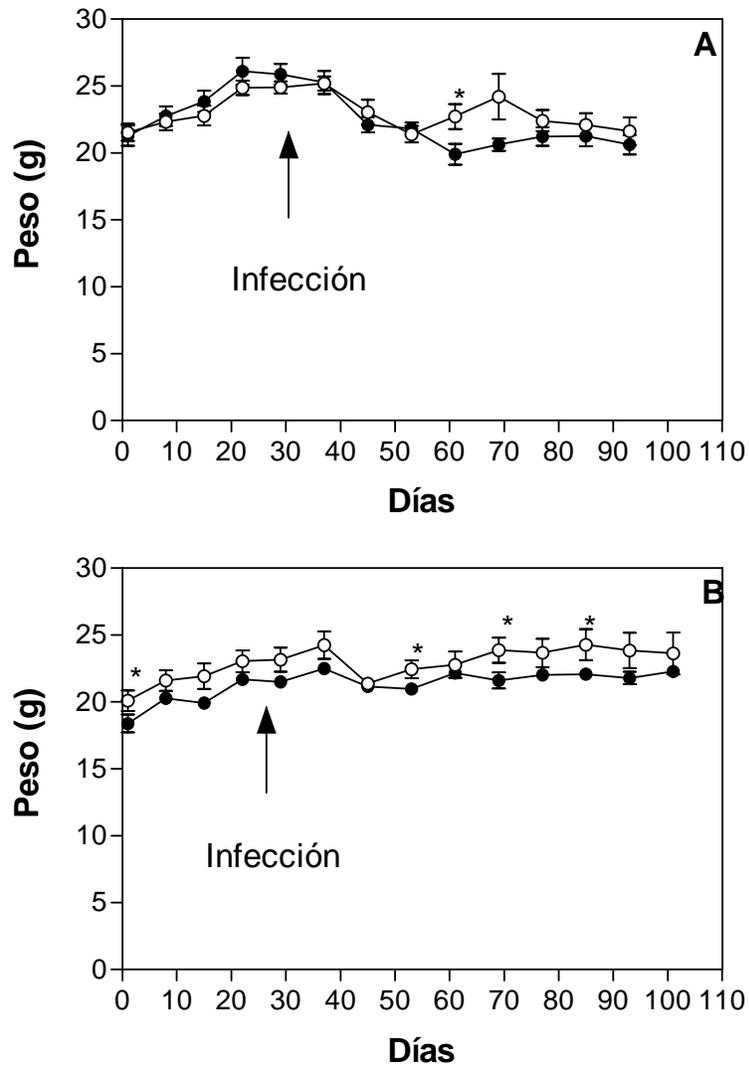


Figura 9. Peso corporal de ratones C57BL/6J (A) y BALB/c (B) machos infectados con quistes la cepa Me49 de *T. gondii*. Ratones no expuestos (●) o expuestos (○) a la mezcla de metales fueron infectados. El peso se registró cada 8 días. El análisis estadístico que se utilizó fue la prueba t de student con un intervalo de confianza del 95% (*p<0.05).

Se estudió los efectos de los metales a nivel inmunológico y determinamos los anticuerpos anti- *Toxoplasma gondii* generados después de infectarlos con la cepa Me49 de *T. gondii*. Se sangraron los ratones cada 10 días después de infectarlos y se obtuvo el suero con el fin de determinar si el efecto de los metales modifica la producción de anticuerpos durante el transcurso de la infección.

En las figuras 10A y 10B observamos la titulación de anticuerpos IgG vs. *T. gondii* de los ratones de la cepa C57BL/6 machos. Se genera una respuesta inmune contra *T.gondii* durante el transcurso de la enfermedad. Observamos que el título se incrementa a través del tiempo entre los expuestos y no expuestos. En contraste, los animales expuestos (Fig. 10A) presentan una mayor D.O. que los no expuestos (Fig. 10B), lo cual refleja el título del suero; esta diferencia fue estadísticamente significativa. Por lo tanto, la mezcla de metales aumenta la producción de los anticuerpos totales durante el transcurso de la enfermedad y es estadísticamente significativo.

En las figuras 10C y 10D observamos la titulación de anticuerpos IgG vs. *T. gondii* del suero de los ratones de la cepa BALB/c machos. Se genera una respuesta inmune contra *T.gondii* durante el transcurso de la enfermedad. La D.O. entre los expuestos (10C) y no expuestos (10D) no presenta diferencias significativas. Por lo tanto, el efecto de la mezcla de metales no modifica la producción de anticuerpos durante el transcurso de la enfermedad en los ratones BALB/c.

Se determinó si también los metales modifican la producción de isotipos IgG1 e IgG2a. En las figuras 11A y 11B al comparar los títulos de anticuerpos IgG1 de ratones C57BL/6J machos, observamos que los expuestos (11A) presentan una D.O. mayor. Por lo tanto, la mezcla de metales aumenta el título de anticuerpos IgG1.

En la figura 11C y 11D observamos la titulación de anticuerpos IgG2a, la D.O. incrementa durante el transcurso de la enfermedad. En contraste, los expuestos presentan una D.O. mayor que los no expuestos; esta diferencia es estadísticamente significativa. Por lo tanto, en los ratones C57BL/6J machos, la mezcla de metales aumenta los títulos de los dos isotipos, tanto IgG1 como IgG2a.

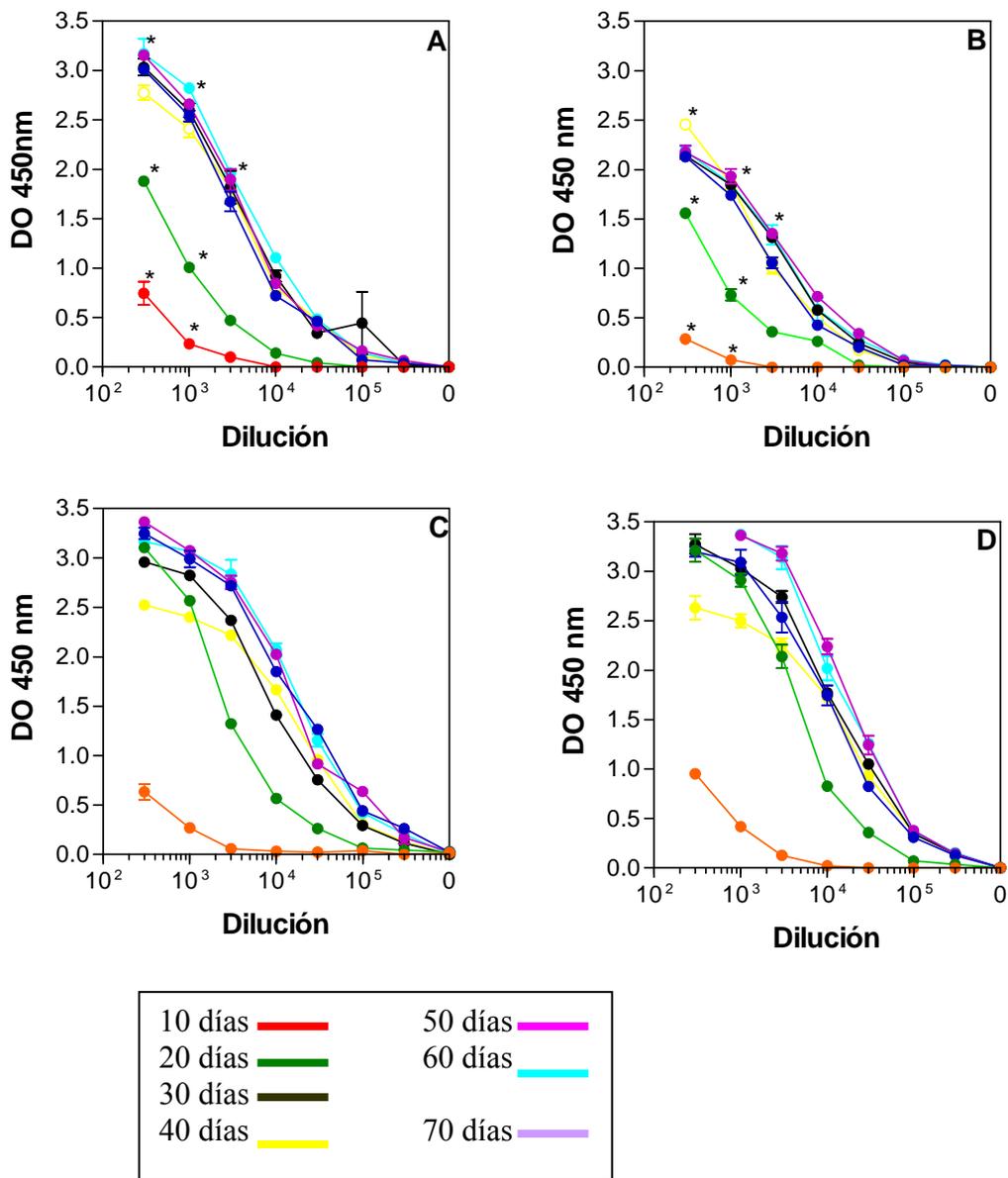


Figura 10. Cinética de anticuerpos IgG anti *T. gondii* de ratones C57BL/6J de ratones (A, B) y BALB/c (C, D), infectados con quistes la cepa ME49 de *T.gondii*. Ratones expuestos (A, C) o no expuestos (B, D) a metales. Se determinó el título en suero cada 10 días después del reto. El análisis estadístico que se utilizó fue ANOVA con un intervalo de confianza del 95%. (* p<0.05).

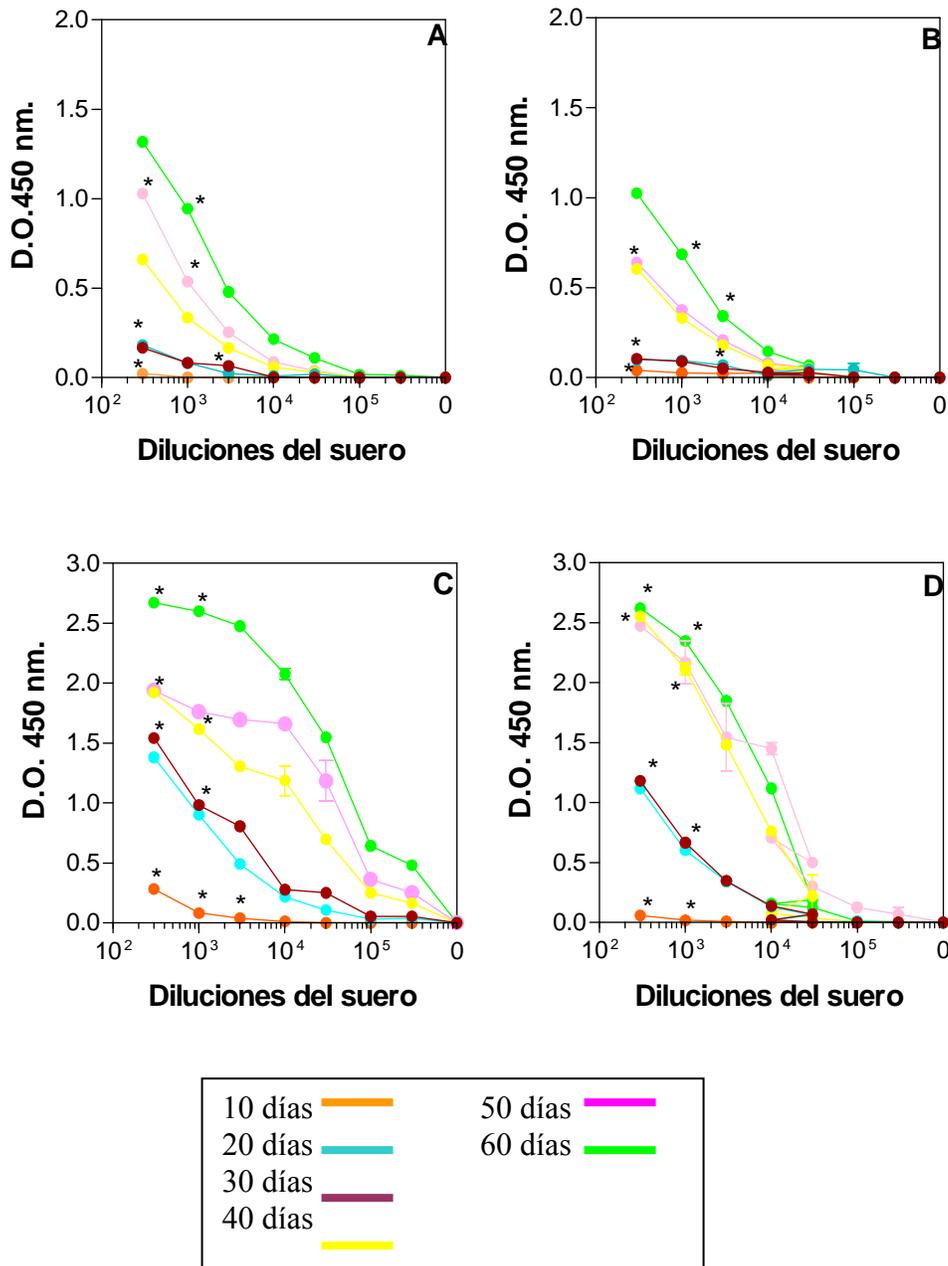


Figura 11. Cinética de isotipos IgG1 (A, B) e IgG2a (C, D) en ratones C57BL/6J infectados con quistes de la cepa Me49 de *T.gondii*. Ratones expuestos (A, C) o no expuestos (B, D) a metales. Se determinó el título en suero cada 10 días después del reto. El análisis estadístico que se utilizó fue ANOVA con un intervalo de confianza del 95%. (* p<0.05).

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diariamente el ser humano se encuentra expuesto a un amplio espectro de contaminantes presentes en la comida, el agua y el aire. Dentro de estos contaminantes ambientales encontramos a los metales, los cuales tienen la capacidad de modificar las actividades de las células del sistema inmune por diferentes mecanismos dependiendo del metal, concentración y biodisponibilidad. El resultado de esa modulación puede ser un estado inmunosupresor o el desarrollo de un proceso alérgico. Un desequilibrio en la regulación inmune por metales puede conducir a una producción inadecuada de esa respuesta (Marth, *Jelvocan* 14 (4); 375-386, 2001).

En el presente trabajo nuestro objetivo fue determinar el efecto de una mezcla de Mn, Ni y Cu en ratones machos C57BL/6J, los cuales son susceptibles a la infección contra *T. gondii*. Comenzamos a realizar el experimento con ratones machos C57BL/6J y como controles ratones BALB/c, los cuales son resistentes a *T. gondii*.

Inicialmente utilizamos la inmunización con la cepa ts-4 y el subsecuente reto de la cepa RH como modelo para estudiar el efecto de los metales en la toxoplasmosis. Pfefforkorn obtuvo una serie de mutantes termosensibles a partir de la cepa virulenta RH (Pferfforkorn et al, 1976). Una de ellas, ts-4, no persistió en el hospedero dos meses después de ser inoculada y tampoco encontraron quistes en ella. En este modelo observamos que los ratones expuestos a la mezcla de metales de manera crónica no muestran diferencias en la mortalidad, en comparación con los animales no expuestos. Ya que la mezcla de metales no causó ningún efecto y no hubo diferencias estadísticamente significativas, se decidió cambiar el uso de la cepa ts-4 por la cepa Me49, la cual es avirulenta, forma quistes y es más representativa de las cepas naturales (Z.G. Guoo. et al; 1997).

Con el fin de conocer el efecto de los metales en la generación de una respuesta inmune protectora contra *T. gondii*, inicialmente se determinó la mortalidad de los ratones. Observamos que los ratones expuestos de la cepa C57BL/6J presentaron un retraso en la mortalidad en comparación con los animales no expuestos. Sin embargo, los ratones de la cepa BALB/c expuestos y no expuestos no murieron. Por lo tanto sólo observamos efecto en la cepa C56BL/6J, que es susceptible a Toxoplasma.

Otro parámetro fue determinar si la mezcla de metales afectaba el estado de salud de los animales. Observamos que en los ratones C57BL/6J expuestos y no expuestos, después de

infectarlos, pierden peso y no lo vuelven a recuperar. En contraste, observamos que en los ratones de la cepa BALB/c expuestos y no expuestos, después de infectarlos, recuperan peso aunque no observamos diferencias significativas entre los expuestos y no expuestos. Por lo tanto, la exposición a la mezcla de metales no modificó el estado de salud aparente de los ratones en ninguna de las dos cepas. Por lo tanto, las concentraciones que se emplearon para la mezcla no causan daño.

En la cinética de aparición de anticuerpos IgG-anti-*T. gondii* en los ratones C57BL/6J, observamos que el título de anticuerpos se incrementa en los animales expuestos en comparación con los no expuestos. Sin embargo, en los ratones de la cepa BALB/c, el título es muy semejante en ambos grupos y no presentan diferencias significativas. Por lo tanto, los metales están induciendo la aparición más rápida de anticuerpos anti-*T. gondii* en los ratones C57BL/6J. En nuestros resultados observamos que el estado de salud de los ratones expuestos no se ve afectado pero presentan un retraso en la mortalidad en comparación con los animales no expuestos. Al estudiar la producción de anticuerpos, observamos que la mezcla de metales modificó la producción de anticuerpos totales.

Aunque se ha estudiado el efecto de algunos metales individualmente sobre el sistema inmune, pocos son los estudios que se han realizado sobre el efecto que pueden tener cuando están en una mezcla.

Se ha reportado que un exceso o deficiencia de Mn (II) en el organismo tiene efectos citotóxicos en los linfocitos T e incrementa la cantidad de linfocitos polimorfonucleares (Zolikoff; et al 2002). En el humano la ingestión de NiCl₂ (10mg) estimula el sistema inmune induciendo la maduración de linfocitos T. La exposición al Ni (II) tiene un efecto directo en la actividad de los macrófagos así como la supresión de la respuesta de las células NK e incrementa la resistencia de la formación de tumores en el sistema respiratorio (Albert, 1997). También se sabe que el Cu (II), es un metal que participa en la regulación de la secreción de citocinas; la producción de IL-2 se ve reducida en casos de deficiencia de cobre así como el número de neutrófilos en sangre periférica humana (Persival, 1998, Seudari, 1990).

En algunos de los estudios se ha observado que la mezcla de Pb, Cd y Co tiene un efecto inmunosupresor (Lawrence et al, 1979).

También una mezcla de Cu, Au y Ag tiene un efecto anti-inflamatorio en un modelo murino con artritis y retarda el progreso de la enfermedad (L. Thunus et al; 1995). En estudios anteriores se demostró que una mezcla de Ni y Zn modula la respuesta inmune (Lawrence, D.A.1981) y también puede alterar o suprimir la producción de anticuerpos (Koller, 1973; Koller et al., 1976; Lawrence et al 1979).

Se ha observado que los metales Pb y As cuando están combinados causan un efecto inmunotóxico más fuerte que cuando se administran solos. Existe un efecto sinérgico cuando están en una mezcla y cualquier modulación en el sistema inmune puede causar inhibición en la capacidad de proteger al hospedero así como susceptibilidad a agentes infecciosos y patógenos (B. Bishayi, M.Sengupta., 2006).

Posteriormente se determinó si la mezcla de metales modifica la producción de los isotipos IgG1 e IgG2a, característico de una respuesta Th2 y Th1, respectivamente.

En la cinética del isotipo IgG1, observamos que la D.O. se incrementa en ambos grupos, pero los animales expuestos presentan un D.O. mayor en comparación con los no expuestos. En la cinética del isotipo IgG2a, observamos que en ambos grupos se incrementa la D.O., pero los ratones expuestos presentan una D.O. mayor y un título mayor en comparación con los no expuestos y una diferencia estadísticamente significativa. Por lo tanto, la mezcla de metales incrementó la producción de los isotipos tanto IgG1 como IgG2a. Se sabe que en este modelo, la infección a *T. gondii* hay una respuesta de tipo Th1 que es protectora.

En este estudio observamos que la mezcla de Mn, Ni y Cu retrasó la mortalidad en los ratones machos C57BL/6J infectados con quistes de la cepa Me49 de *T. gondii*. Así como también se observó un incremento de los anticuerpos totales y un incremento de los isotipos IgG1 e IgG2a.

El presente estudio se demuestra que la mezcla de Mn, Ni y Cu en ratones C57BL/6J modifica la producción de anticuerpos totales durante el progreso de la infección con *T. gondii*.

VI. REFERENCIAS

1. - Fishbein L., Furt A, Mehlman M.A. 1987. Genotoxic and carcinogenic metals. En: Environmental and occupational occurrence and exposure. Pricenton Scientific Publishing. USA: 330-339.
2. - Frausto da Silva J.J.R. and Williams J.1991. The inorganic chemistry of life. En: The biological chemistry of the elements. 5th Edition, Worth Publishers. New York. Pp. 6-11.
3. - Ochial, E. Toxicology of heavy metals and biological defense. 1995. Journal of chemical education: 72 (6): 479-484.
4. - Foulkes E.C. En: Biological membranas in toxicology. Philadelphia Taylor & Francis Publishers: 1(3): 848-852.
5. - Frausto da Silva J.J.R and Williams J. 1991. The inorganic chemistry of life. The biological chemistry of the elements. En: Kinetic considerations of chemical reactions, catalisis and control. 5TH Edition, Worth Publishers. New York. Pp. 98-100.
6. - Fishbein L. 1987. Bioavailability and interactions of metals: Considerations, in: Fishbein L, Furst A, Mehlman M.A. Genotoxic and carcinogenic metals. En: Environmental and occupational occurrence and exposure. Pricenton Scientific Publishing. USA: 245-264.
7. – Casarret S. and Daull’s K. Toxicology. 2001. The basic science of poisons. 4th Edition. Prentice Hall.USA. Pp. 354-366.
8. – Larsfrieg J, Gunnar K, Nordberg L. 1990. Handbook on the toxicology of metals Vol II. Elservier. USA. Pp. 568-581.
9. - Marth E. S., Jelvocan B, Kleinhappl A, Gutsch S, Barth A. 2001. The effect of heavy metals on the inmune system at low concentrations. International Journal Environmental: 14(4): 375-386.

- 10.- Lawrence D., Mc Cabe M. 2002. Immunomodulation by metals. *International Immunopharmacology*: 2: 293-385.
11. - Frausto da Silva J.J.R. and Williams J. 1991. The inorganic chemistry of life. En: *The biological chemistry of the elements. Manganese Chemistry*. 5th Edition, Worth Publishers. New York. Pp. 14: 372-465.
12. - Mannhart C. 1995. Sport and nutrition. *Antioxidants?* : 84: 963-969.
13. - Pincemail J., Lecomte J., Catiau J. 2000. Free radical and Biology Medical. En: *Evaluation of autoantibodies against oxidized LDL and antioxidant status in top soccer and basketball players alter 4 months of competition*: 28:559-565.
14. - Clarkson PM, Thompson HS. 2000. Antioxidants. En: *What role do they play in physical activity and health?* *American Journal Clinical Nutrition*: 72: 375-465.
15. - Aschner M., Vrana K. E., Zheng W. 1999. Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS): *Neurotoxicology*: 20 (2-3):173-80.
16. - Goyer R.A.1998. Nutrition and metal toxicity. *American Journal Clinical Nutrition*: 61: 203-216.
17. - Speich M., Pineau A. 2001. Minerals trace elements and related biological variables in athletes and during physical activity. *Clinical Chemistry Acta*: 312:1-11.
18. - Griem P., Gleichman E. 1995. Metal ions induce autoimmunity, *Journal the immunology*: 7: 831-838.
19. – Frausto da Silva J.J.R. and Williams J. 1991. The inorganic chemistry of life. En: *The biological chemistry of the elements*. 5th Edition, Worth Publishers. New York. Pp. 16: 400-411.
20. – Carter D.E. 1995. Oxidation-reduction reactions. *Environmental Health Perspect*: 106:17-19.

21. – Rojas E., Herrera L.A., Poirrier L. 1999. Are metals dietary carcinogens? *Mutation Research*: 443:157-181.
22. - Gregor J. L. 2003. Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potencial biomarkens *Neurotoxicology*: 20 (2-3):205-12.
23. – Huang Y.C., Ghio A.J., Storehuerner J., Mc Gree J., Carter J.D., Grambow S.C, Devlin R.B. 2003. The role of soluble components in ambient fine particles- induced changes in human lungs and blood. *Toxicology*: 15 (4): 327-42.
24. – Ali SF, Duhart HM, Newport GD, Lipe GW, Slikker W.Jr. 1995. Manganese-induced reactive oxigen species-comparison between Mn (II) y Mn (III). *Neurodegeneration*: 4 (3): 329-34.
25. - Sadek A H, Rauch R, Schulz P.E. 2001. Parkinsonism due to manganism in a welter. *Toxicology*: 22 (5): 393-401
26. - Spearrs A. J. W, Hatffield E., Forbes R.M., Koenig S.E. 1978. Studies on the role the manganese in the ruminant. *Journal Nutrition*: 313-320.
27. – Maughan R J. 1999. Role of micronutrients in sport and physical activity. *Clinical Medical*: 55: 683-90.
28. - – Frausto da Silva J.J.R. and Williams J. 1991. The inorganic chemistry of life. En: *The biological chemistry of the elements. Nickel and Cobalt: remnants of early life*. 5th Edition, Worth Publishers. New York. Pp. 16: 400-411.
29. - Jen P., Costa M. 1985. Introduction of chomosomal damage in Chinese hamsters ovary cells by soluble particulate nickel compounds: prefential fragmentation of the heterochromatic long armo f the X-chromosome by carcinogenic crystalline NiS particles. *Cancer Respiratory*. 45: 2320-2325.
30. - Jakobson E., MAsjedi K., Aalborg N., Lundeberg L., Karlberg A.T., Scheynius A. 2002. Cytokine production in nickel- sensitized individuals analysed whith enzyme- linked immunosport assay: posible implication for diagnosis. *Br J Dermatology*: 147 (3): 442-9.
- 31.- Kyungtae K., Sang- Han Lee. 2002. Nickel (II) - Induced Apoptosis in Murine T cell Hybridoma cell is associated with increased Fas ligand expression. *Toxicology and Pharmacology*: 185: 41-47.

32. - Zhang Z.J., Troll W., Koenig F.L., Frenkel K. 1990. Carcinogenic silfide salts of nickel and cadmium induce H₂O₂ formation by polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Respiratory*: 50 : 7564-7570.

33. - Schiffer R.B., William F., Sundeman W.Jr. 1990. The effect of exposure to dietary nickel and zinc upon humoral and cellular immunity in SJL mice. *Journal immunology*: 213-221.

34. – Norseth T. 1980. Cancer hazards caused by nickel and chromium exposure. *Journal toxicology environmental health*: 6: 1219-1227.

35. - Carter D.E. 1995 Oxidation-reduction reactions of metal ions *Environmental Health Perspect*: 106: 17-19.

36. – Huang Y.C., Ghio AJ, Storehuerner J, Mc Gree J, Carter JD, Grambow SC, Devlin RB. 2003. The role of soluble components in ambient fine particles- induced changes in human lungs and blood. *Toxicology*. 11: 15 (4): 327-42.

37. – Roelofs K. and Xianzhu W. 2003. Infectious nickel Tolerant: A reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *The Journal of Immunology* 12: 567-72.

38. – Bala S. and Failla M.L. 1999. Copper deficiency reversibly impairs DNA synthesis in activated T lymphocytes by limiting interleukin 2 activity. *Prentice Hill USA*. Vol. 89. Pp. 6794-6797.

40. – Frausto da Silva J.J.R. and Williams J. 1991. The inorganic chemistry of life. En: *The biological chemistry of the elements*. Copper: extracytoplasmic oxidases and matrix formation. 5th Edition, Worth Publishers. New York. Pp. 15: 388-400.

41. - Lukaski Hc. 1995. Micronutrients (magnesium, zinc and copper): are mineral supplements needed for athletes? *International Sport Nutrition*: 5: 579-83.

42. O' Connor JM., Bonham M.P., Turley E. 2003. Copper supplementation has no effect on markers of the DNA damage and liver function in healthy adults. *Annual Nutrition Metabolism*: 47: (5): 201-6.

43. – Percival S.S: 1998. Copper and immunity. *American Journal Clinical Nutrition* 67: 1064-1068.

44. - Ito N., Phillips S.E., Mc Pherson V., Keen M.C., Stevens J.N., Yadav C.1991. Galactose oxidase Natura: 87-90.
45. - Lontie R.1991. Copper protein and copper enzymes, Vol I. CRC Press. Boca Florida. Pp. 683-90.
46. – Abdulla M. and Chmielnicka J. 1990. New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. Biology Trace Elements: 23: 25-53.
47. – Graham GG, Cordano A. 1976. Copper deficiency in human subjects. Trace elements in human health and disease. Vol. I. Zinc and copper. New York: Academic Press: 363-72.
48. – Handy R.J. 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity; two sides of the same toxicological process? Biochemistry and Physiology Part A 135: 25-28.
49. – Scuderi P. 1990. Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. Cellular Immunology: 126: 391-405.
50. – Carruthers M. 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Tropica: 81: 111-122.
51. – Montoya J.G., Liesenfeld O. 2004. *Toxoplasmosis*. The Lancet. Vol. 363. 1965-1975.
52. – Aliberti J. 2001. Host Persistence: Exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii* Immunology: Vol. 5: 162-169.
53. – Apt W.B. 1985. *Toxoplasmosis* in developing countries. Parasitology Today; 11: 44- 46.
- 54 – Luft B.J. and Remington J. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clinical. Infection diseases: 15: 211-222.
55. – Remington J., McLead J.S. and Desmouts R.G.1995. Remington In: Infections diseases of the fetus and newborn infant. W.B. Saundersco., Philadelphia. PA. Pp. 140-267.

56. – Duncanson D., Terry R.S., Smith J.E. and Hide G. 2001. High levels of congenital transmission of *T. gondii* in a commercial sheep flock. *International Journal. Parasitology*: 31:1699-1703.
57. – Sin- Yew Wong and Remington. 1994. Toxoplasmosis in pregnancy. *Clinical. Infantil Diseases*: 18: 853-62.
58. – Dubey J.P. 1998. Advances in the cycle of *T. gondii*. *International Journal Parasitology*: 28:1019-1024.
59. – Howe D.K. and Sibley D. *Toxoplasma gondii*. 1995. Comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *The Journal of infectious diseases*: 172: 1561-6.
60. – Bhopale G.M. 2003. Pathogenesis of Toxoplasmosis. *Comparative immunology, Microbiology & Infectious diseases*: 26:213-222.
61. - Gilber R, Gras L. 2003. Effect of timing and type of treatment on the risk of mother to child transmission of *T. gondii*. *Biology*: 110: 112-20.
62. – Liesenfeld S. and Remington J. 2001. *Toxoplasmosis* in: Martens M. *fares: Infections in women*. PA: Sounders: 57-59.
63. – Luft B.J. and Remington J. 1983. Outbreak of central-nervous-system Toxoplasmosis in western Europe and North American- *Lancet*: 1: 781-84.
- 64 – Frenkel J.K. 1974. Pathology and pathogenesis of congenital *Toxoplasmosis*. *Bull N Y Academy Medical*: 50: 182-91.
- 65 – Holland G.N. 1999. Reconsidering the pathogenesis of ocular *Toxoplasmosis*. *American Journal Ophthalmology*: 728: 502-05.
66. – Montoya J.C, Remington J. S 1996. *Toxoplasmic chorioretinitis* in the setting of acute acquired *Toxoplasmosis*. *Clinical Infection. Diseases*: 23: 277-82.
67. - - Luft B.J. and Remington J. 1992. *Toxoplasmosis encephalitis* in AIDS. *Clinical Infection Diseases*: 15:211-222.
68. – Mariuz P, Bosler E.M., Luft B.J. 1997. *Toxoplasma pneumoniae*. *Seminary. Respiratory Infection*: 12: 40-43.
69. – Gazzinelli, R, T., Amichay D. 1996. Role of macrophage- derived cytokine in the induction and regulation of cell mediated immunity to *T. gondii*. *Microbiology. Immunology*: 219: 127-140.

70. – Sher A., Oswald L.O., Hieny S. and Gazzinelli R. 1993. *T. gondii* induces a T-independent INF- γ response in NK cells which requires both adherent accessory cells and TNF- α . *Journal Immunology*: 150: 3982- 3989.
71. – Denkers E.Y., Gazzinelli R.T., Martin D. and Sher A. 1993. Emergence of Nk1.1+ cells as effectors of immunity in MHC class I-deficient mice. *Journal Medical*: 178: 1465-1472.
72. – Gazzinelli R., Hieny S., Sher A. 1993. IL-12 is required for the T-cell independent induction of INF- γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Academy Science. USA*: 90: 6115-6119.
73. – Houtter C.A., Chizzonite R. and Remington J.S. 1995. IL-1 is required for IL-12 to induce production of INF- γ by NK cells. *Journal Immunology*: 155: 4367- 4354.
74. – Houtter C.A., Neyer L.E., Gabriel J., Kennedy M., Grabstein K.H. 1997. The role of the CD28/B7 interaction in regulation of NK cell responses during infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal. Immunology*: 158: 2285-2293.
75. – Houtter C.A., Remington J.S. 1994. Production of gamma interferon by natural killer cells from – infected SCID mice: regulation by IL-10, IL-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infectology. Immunology*: 62: 2818-2824.
76. – Lob J.E., Chang H., Fodor M. 1992. Dissection of the interferon gamma-MHC class II signal transduction pathways. Reveals that types I and type II interferon system share common signaling component (S). *EMBO J.* 11: 1351-1363.
77. – Finkelman F. Holmes M. Katons S. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype. *Annual Review. Immunology*: 8: 303-333.
78. – Handman E. and Remington J.S. 1980. Antibody response to *Toxoplasma* antigens in mice infected with strains of different virulence. *Infection. Immunology*. 40: 215-225.
79. – Jacobson N.G., Szabo J., Weber- Nordi R.M., Zhong Z. 1995. Interleukin-12 signaling in T helper type 1 cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (STAT) s and STAT 4. *J. Expedition Medical*: 181: 1755-1762.
80. – Gazzinelli R., Denkers E.Y., Sher A. 1993. Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infection Agents. Diseases*: 2: 139-149.

81. – Gazzinelli R., Denkers E.Y., Sher M. Wysocks S., Hayashi H. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early INF- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal Immunology*.153: 2533-2543.
82. – Chien Y., Jores S. and Crowley P. 1996. Recognition by $\gamma\delta$ T cells. *Annual Review Immunology*. 14: 511- 532.
83. – KaufmannS.H., Ladel E. 1994. Role of T cell subsets in immunity against intracellular bacteria: experimental infections of knock-out mice with *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Immunology* : 152: 1856-1860.
84. – Mombaerts P., Camerini V., Stone B.J. 1993. Different roles for $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in immunity against an intracellular pathogen. *Nature*: 365: 53- 56.
85. - Gazzinelli R.T., Brezin A, NussenblattR. 1994. *Toxoplasma gondii*: acquired ocular toxoplasmosis in the murine model, protective role of INF- γ and TNF- α .*EP. Parasitology*: 78: 217-229.
- 86 – Luft B.J, Kansas G., Engleman E.G. and Remington J.S. 1984. Functional and quantitative alterations in T lymphocyte subpopulations in acute toxoplasmosis. *Journal Infection Diseases*: 150: 761-767.
87. – Kumar S., Miller L.M., Quakyi I.A.1988. Cytotoxic T cells specific for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Nature*: 334: 258- 260.
88. – Overath P. and Harbecke D.1993. Course of *Leshmania* infection in beta 2-microglobulin-deficient mice.*Immunology*:37: 13-17.
89. – James S. L.1995. Role of nitric oxide in parasite infections. *Microbiology Review*: 59: 533-547.
90. – Marshall A.J. and Denkers E.1998. *Toxoplasma gondii* triggers granulocyte-dependent,cytokine-mediated lethal shock in D- galactosamine sensitized mice. *Infection Immunology* : 66: 1325-1333.
91. – Romani L., Mencacci A. Cenci E. Spaccapelo R. 1997. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J. Immunology*: 158: 5349-5356.
92. – Roberts C.W., Ferguson J.P., Jebbari H. 1996. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immunology*: 64: 897-904.