

UNAM IZTACALA

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Estudio de la Permeabilidad de la Barrera  
Hematoencefálica en un Modelo Murino  
de Infección con *Taenia crassiceps***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G O**

**P R E S E N T A**

**Antonio Zadir Fragoso Rodríguez**

DIRECTOR DE TESIS:

**DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY**



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2014



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.

## Índice General

### Abreviaturas

<b>Resumen</b>	1
<b>1. Introducción</b>	3
<b>1.1. Respuesta inmune innata</b>	3
<b>1.2. Respuesta inmune adaptativa</b>	4
<b>1.3.- El sistema nervioso central (cerebro) y la respuesta inmune.</b>	7
<b>1.4.- La Barrera Hematoencefálica (BBB)</b>	8
<b>1.5.-La inflamación y el sistema nervioso central</b>	11
<b>1.6.- Moléculas de Adhesión</b>	12
<b>1.6.1.-Transmigración de células sanguíneas y aumento de la permeabilidad en la BBB</b>	13
<b>1.7.- Citocinas y otros mediadores inflamatorios</b>	14
<b>1.7.1.- Citocinadas con influencia en el SNC</b>	15
<b>1.8.- Parásitos Helmintos.</b>	17
<b>1.8.1.- Inmunomodulación por helmintos</b>	18
<b>2.- Justificación</b>	22
<b>3.- Hipótesis</b>	24
<b>4.- Objetivo general</b>	25
<b>4.1.- Objetivos particulares</b>	25
<b>5.- Material y Métodos</b>	26
<b>5.1.- Ratones e Infección.</b>	26
<b>5.2.- Evaluación de la carga parasita de cavidad peritoneal.</b>	26
<b>5.3.- Cuantificación de citocinas.</b>	26
<b>5.3.1.- ELISA. Bloqueo, curva y muestras.</b>	27
<b>5.3.2.- Revelado.</b>	27
<b>5.4.- Permeabilidad de Barrera Hematoencefálica.</b>	27
<b>5.5.- Cuantificación por RT-PCR de VCAM, ICAM y TGF-<math>\beta</math>.</b>	28
<b>5.5.- 1Extracción de RNA.</b>	28
<b>5.6.- Análisis Estadístico.</b>	29
<b>6.- Resultados</b>	30
<b>6.1.- Carga parasitaria</b>	30
<b>6.2.- Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias</b>	30
<b>6.2.1.- Citocinas pro-inflamatorias</b>	30
<b>6.2.2.- Citocina anti-inflamatoria</b>	32

<b>6.3.- Permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica.</b>	33
<b>6.3.1 Permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica en los ratones infectados</b>	33
<b>6.4 Asociación citocinas y Permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica</b>	34
<b>6.5.- Cuantificación por RT-PCR de VCAM e ICAM.</b>	36
<b>6.5.2.- Asociación moléculas de adhesión y permeabilidad</b>	38
<b>6.5.1.- Asociación expresión de Moléculas de adhesión (VCAM-1) y citocinas sistémicas</b>	39
<b>7.- Discusión.</b>	41
<b>8.- Conclusión</b>	47
<b>Referencias</b>	48
<b>Apéndice</b>	51

## Abreviaturas

SNC	Sistema nervioso central
BBB	Del inglés, Blood-Brain Barrier (barrera hematoencefálica)
i.p.	Intra peritoneal
NK	Del inglés, natural killer (asesinas naturales)
IL	Interleucinas
TNF	Factor de necrosis tumoral
IFN	Interferón
Ac	Anticuerpos
APC	Célula Presentadora de antígenos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
Ag	Antígeno
Th	Del inglés, T helper (células T colaboradoras)
TGF- $\beta$	Del inglés, transforming growth factor
Tregs	Células T reguladoras
TJs	Uniones estrechas
SM	Esclerosis múltiple
EAE	Encephalitis autoinmune experimental
ICAM	Molécula de adhesión intracelular
VCAM	Molécula de adhesión vascular
VLA-4	Del inglés, very late antigen
LFA-1	Del inglés, Lymphocyte function-associated antigen
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocito macrófago

PECAM	Molécula de adhesión celular plaquetaria
MIP-2	Del inglés, macrophage inflammatory protein-2
CINC-1	Del inglés, cytokine induced neutrophil chemoattractant-1
FCE	Fluido cerebro espinal
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
WNV	Virus del oeste del Nilo
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
NCC	Neurocisticercosis
(i.p.)	intraperitoneal
WT	Del inglés, Wild-type (silvestres)
CEC	Células endoteliales cerebrales
ZO-1	Zonula de ocludentes-1

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 5 de inmunidad innata de la Unidad de Biomedicina (UBIMED), en la FES-Iztacala, UNAM.**

**Durante la realización de este trabajo se tuvo el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, número de becario 152224, también se contó con el apoyo de PAPIIT con número IN212412**

## **Agradecimientos**

**A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por haber confiado en mí, por aceptarme dentro de su equipo de trabajo y por el apoyo recibido durante y al final de este trabajo.**

**A mi comité de Sinodales, por sus atenciones, apoyo y sus opiniones para poder concluir este trabajo.**

**A la casa máxima de estudios UNAM y FESI por la oportunidad de forjarme**

**A la M en C Imelda Juárez Avelar que sin su apoyo, constancia y enseñanzas este trabajo no habría podido ser.**

**A todo el equipo de trabajo del Bioterio de la FES Iztacala, por el cuidado de los animales utilizados.**

**A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio 5.**

## **Dedicatorias**

### **A mis padres**

**Mamá eres la persona que más amo en este mundo, sin ti creo que yo jamás habría aprendido a seguir adelante, a decirle al mundo que aquí estoy. Sin tu apoyo y sin esas noches de desvelos juntos haciendo maquetas y estudiando, me habría costado mucho más trabajo haber concluido todo esto, y a pesar de que la vida nos ha puesto un nuevo obstáculo, siempre hemos podido salir adelante, y quiero dedicarte este trabajo que ha sido realmente difícil.**

**Papá, eres mi héroe, te acuerdas esa noche en el hospital, que te dije que estaba muy feliz y orgulloso de que fueras mi papá, te amo, hemos pasado por mucho, y te doy las gracias por apoyarme siempre en todo. A ti papá te dedico este trabajo, que no hubiera podido finalizar si todo el apoyo que me diste, agradezco que todas las mañanas te levantes y luches por esta familia que somos, te amo gracias.**

### **A mis hermanas**

**Eréndira y Alondra, quizás no soy el mejor hermano, ni el más inteligente, pero quiero dedicarles esta tesis para que ustedes tengan un ejemplo de que lo que inicia debe concluirse, y que no importa cuando o como, uno debe hacer lo que tiene que hacer. Solo es cuestión de trabajar y echarle ganas. Las amo.**

### **A mis tíos, primos y sobrinos.**

**Hasta hace poco descubrí lo importante que soy para ustedes, de verdad que los aprecio, estimo, valoro, y amo. Les deseó mucho éxito.**

**A mis amigos.**

**A Erika, Josué, Cintia, Mauricio y Joana, a ustedes mis primeros amigos de la Universidad porque sin ustedes creo no habría podido salir de la primera etapa, porque ustedes me han demostrado lo que es una amistad, porque cuando voy a la escuela lo único que quisiera es poder platicar con ustedes y reír.**

**A Serene, Misraim, Iram, Sarai porque con sus comentarios, me enseñaron a ser una persona más competitiva, mejor adiestrada, a ver a la biología de una manera diferente, me enseñaron a trabajar y aguantar muchas adversidades, los extraño.**

**A Monse, Nelly, Jesus, Paola, y Elias a ustedes por ser un amor de personas, por preocuparse por mí, por ser ustedes, inteligentes, luchadores, amables, cálidos y unos campeones, por enseñarme que a veces uno tiene un buen de problemas y aun así, siguen adelante. A ustedes por ser de verdad de lo mejor que me ha pasado.**

**Ari, May y Pola a ustedes por ser de las personas que más me hacen sonreír a ustedes por alegrar mis días.**

**A Gustavo, Ale, Abisai, Moctezuma y Eduardo por ser unos locos, por acompañarme en cada locura, por aconsejarme, por llorar conmigo, por estar ahí y porque son unos locos que no cambiaría por nada**

**Y por último a Víctor, Thalía, Alice, Ime y Tonatiuh a ustedes por todo lo que me han enseñado, lo que han dado por mí, por su tiempo y su calidez.**

**A la Dra. Vero por ser de verdad una persona, humilde, inteligente, honorable y por ayudarme cuando más lo necesitaba.**

## Resumen

Hasta hace dos décadas el Sistema Nervioso Central (SNC) se consideraba como inmunológicamente privilegiado. Actualmente se cuestiona este grado de privilegio debido a la comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el SNC. La naturaleza de esta comunicación no se conoce en su totalidad, pero probablemente las señales más importantes son desencadenadas por un grupo de proteínas que se conocen como citocinas, estas citocinas representan mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, y se les ha atribuido relevancia en patologías y desórdenes del SNC asociados a un aumento en la permeabilidad de la BBB. Las infecciones por parásitos helmintos favorecen la producción de citocinas que controlan la polarización de la respuesta inmune tipo Th1, en la fase aguda de la infección hacia una respuesta de tipo Th2 en la fase crónica de la misma. No hay estudios que demuestren si la presencia sistémica de las citocinas inducidas por la infección helmíntica pudiera alcanzar la barrera hematoencefálica del hospedero (BBB, del inglés Blood-Brain Barrier), permitiendo así la instalación del parásito en el SNC como es el caso de la neurocisticercosis (NCC) provocada por el helminto *Taenia solium* (*T. solium*). En este trabajo utilizamos un modelo murino de infección para determinar si la presencia del helminto *Taenia crassiceps* (que comparte poco más del 90% de características antigénicas con *T. solium*) puede causar alguna alteración en la BBB del hospedero. Se utilizaron ratones ♂ BALB/c de 6-7 semanas de edad infectados vía intraperitoneal (i.p.) con 10 metacístodos de *T. crassiceps* (cepa ORF). Los ratones fueron sacrificados a las semanas 1, 3, 5, 7, 9 y 13 post-infección, se determinaron los niveles de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en suero, la permeabilidad de la BBB y la expresión de las moléculas CAM-1, VCAM-1 en la BBB. Se buscó la posible correlación entre la expresión de citocinas inflamatorias o anti-inflamatorias con cambios en la permeabilidad de la BBB. Los resultados se muestran en dos fases; el impacto de la fase aguda de la infección (fase inflamatoria) y la fase crónica de la infección (fase anti-inflamatoria). La primer fase, se caracterizó por la presencia incrementada de citocinas tipo Th1 (MIF, INF $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y se observó una

regulación positiva de la permeabilidad de la BBB, pero esta no se relacionó con la expresión de moléculas de adhesión en al BBB (ICAM-1). La segunda fase se caracterizó por el aumento de la citocina IL-4 característica de la respuesta anti-inflamatoria Th2, se observó una disminución gradual en la permeabilidad de la BBB asociada al aumento de la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1) y al aumento de TGF- $\beta$  en la BBB. Estos resultados demuestran que el impacto de las citocinas sistémicas inducidas por *T. crassiceps* en la permeabilidad de la BBB está relacionado con el perfil inflamatorio de la fase aguda de la infección, mientras que este efecto se revierte cuando aparece el perfil anti-inflamatorio de la fase crónica.

Palabras clave: Th1, Th2, citocina, ICAM-1, VCAM-1, BBB.

## **1.-Introducción**

Los organismos vertebrados poseen 2 sistemas corporales capaces de aprender y recordar: el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema inmune, la supervivencia de los organismos es altamente dependiente de ambos y la manera en la cual estos dos dominios se sobreponen, es esencial, pero pobremente comprendido [1-3].

El sistema inmune es el encargado de los mecanismos que confieren respuestas protectoras, rápidas y específicas contra los invasores externos [4]. Estos invasores, parásitos, virus y bacterias, varían desde poco peligrosos hasta los altamente peligrosos que ponen en riesgo la vida de su hospedero, como por ejemplo: Plasmodium, VIH e incluso *Treponema pallidum* [5].

El Sistema Inmune está constituido por diversas células, tejidos y moléculas, todas encargados de conferir respuestas protectoras. La respuesta colectiva y coordinada de estas células y moléculas en respuesta a la invasión de sustancias ajenas es lo que conocemos como Respuesta Inmune, la cual se ha dividido en dos tipos de respuestas: Respuesta inmune innata y Respuesta Inmune Adaptativa [4].

### **1.1.-Respuesta Inmune Innata**

La inmunidad innata se refiere a los mecanismos de defensa como barreras físicas, mecanismos bioquímicos y celulares. Las barreras físicas y químicas como los epitelios constituyen una barrera que impide la entrada de patógenos. Mientras que los mecanismos bioquímicos están constituidos por una gran variedad de sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; proteínas de la sangre, que incluyen componentes del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación, citocinas que regulan y coordinan numerosas actividades celulares. Por último la participación de diferentes tipos celulares como fagocitos, macrófagos, neutrófilos, y células citotóxicas NK (del inglés

natural killer) y granulocíticas como los eosinófilos y basófilos. Este tipo de respuesta se caracteriza por estar presente aún sin un estímulo y reaccionar solo a patógenos o sustancias ajenas. Todos en conjunto representan las primeras líneas de defensa frente a los microorganismos [5].

Dentro de las funciones de la respuesta inmune innata está el reclutamiento de células fagocíticas y moléculas efectoras en el sitio de la infección a través de la liberación de citocinas secretadas por las células fagocíticas, las cuales constituyen una gran cantidad de sustancias mediadoras de la inflamación entre las que se encuentran las interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-8 IL-12, así como el factor de necrosis tumoral (TNF) e interferones (IFNs). Por otro lado, la respuesta inmune innata favorece diversas funciones importantes que determinan el curso de la Respuesta Inmune Adaptativa [5].

## **1.2.- Respuesta Inmune Adaptativa**

La Inmunidad Adaptativa recibe este nombre debido a que tiene la capacidad de responder adaptándose al tipo de infección y distinguir diferentes patógenos. Se produce con el tiempo y es específica contra el patógeno o antígeno que le de origen. Es decir, se produce como una respuesta específica teniendo como principal característica la memoria inmunológica, debido a que después de la eliminación de algún antígeno, se mantiene circulante o se almacena en un grupo de células adaptadas para dicho estímulo ya conocido [6].

Las características de la inmunidad adaptativa son la especificidad para moléculas diferentes, la especialización para responder a diferentes tipos de microorganismos y la capacidad de recordar y responder con mayor fuerza tras exposiciones repetidas al mismo organismo [5, 6].

La Inmunidad Adaptativa se clasifica en dos tipos. Según la participación de los componentes que la constituyen se ha clasificado en: Respuesta Inmune Celular,

orquestrada principalmente por los linfocitos T, y la Inmunidad Humoral en la que participan linfocitos B, quienes son los encargados de la producción de los anticuerpos y que reconocen de manera específica los antígenos [5].

Linfocitos B son las únicas células capaces de producir anticuerpos (Ac) que reconocen antígenos extracelulares y actúan como mediadores específicos de la Inmunidad Humoral. En este proceso de reconocimiento antigénico, los linfocitos B son ayudados por las células presentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas y macrófagos. Optimizando esta presentación se encuentra un grupo de moléculas llamado complejo principal de histocompatibilidad (MHC, del inglés Major Histocompatibility Complex). La especificidad del MHC para presentar el antígeno (Ag) a linfocitos TCD8+ ó TCD4+ los ha dividido en moléculas de clase I (MHC-I) o de clase II (MHC-II), respectivamente [5].

### 1.1.3.- Linfocitos T

Los linfocitos T son las células responsables de la inmunidad celular, reconocen Ags, pero no sintetizan Ac, y presentan características sobresalientes como el reconocimiento de Ags unidos al MHC, y Ags que se expresan en la superficie de otras células. Los linfocitos T se dividen en dos grupos: a) linfocitos T citotóxicos que expresan en su membrana moléculas de diferenciación tipo 8 (CD8 del inglés cluster differentiation); este tipo de linfocitos participa activamente en la eliminación de las células infectadas o células tumorales. b) linfocitos T cooperadores o linfocitos Th (Th, del inglés T helper) que se caracterizan por expresar en su superficie moléculas de tipo CD4 (TCD4+) [4, 5].

Los linfocitos TCD4+ han sido subdivididos en base al perfil de citocinas que sintetizan en respuesta a la estimulación antigénica en linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1) o linfocitos Th2. Los linfocitos Th1 se caracterizaron por la secreción de interleucina (IL)-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) que actúan en la generación de la respuesta inmune inflamatoria. Los linfocitos Th2 producen citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 que actúan en las respuestas inmunes anti-inflamatorias [7].

Actualmente se ha subdividido en otro grupo la células Th17, llamados así por la citocina; característica de este subgrupo es la IL-17 e IL-23, este subgrupo celular es estimulado en respuesta a bacterias y hongos por las células dendríticas que producen citocinas como la IL-6, IL-1 e IL-23 un aspecto importante es que la citocina TGF- $\beta$  promueve el desarrollo de este subgrupo cuando están presentes otros mediadores como la IL-6 e IL-1 [7]. Un cuarto grupo celular llamado células T reguladoras (Tregs) generadas in-vitro a partir de la estimulación crónica con antígenos en presencia de la IL-10, estas células se caracterizan por secretar niveles elevados de la IL-10 y TGF- $\beta$  con escasa producción de la IL-17 e IL-4 [4]. En concreto estas células mantienen el orden del sistema inmunológico mediante la aplicación de una regulación negativa dominante en otras células [8].

Estas son las armas del sistema inmune que responden rápida y eficazmente contra los patógenos que se han detectado con anterioridad y tienen la capacidad de la expansión de clones de linfocitos específicos a esos antígenos [5].

Muchos de los subtipos de células Th se regulan de manera negativa entre sí, por ejemplo, la activación del subtipo Th1 inhibe la activación del subtipo Th2 y viceversa. Así la respuesta inmune a diferentes tipos de infecciones tiende a ser dominada por un subtipo Th sobre el otro [7]. La respuesta innata y adaptativa trabajan coordinadamente para combatir la infección, preservar la energía y ayudar a reparar el tejido afectado. Aunque cuando se produce una activación excesiva y/o continua puede ser incluso negativa, dañando al hospedero. Por lo que debe estar sujeta a finos mecanismos de regulación[7].

### **1.3.- El sistema nervioso central (SNC) y la respuesta inmune.**

El cerebro es uno de los órganos más complejos que se conoce. Tiene un peso promedio de 1.3 kg y está formado de aproximadamente 100 billones de neuronas y con 10 veces más esta cantidad de células de la glía, las Neuronas y glía están organizadas en una alta complejidad tridimensional en forma de fibras interconectadas, y aunque el cerebro solo constituye el 2% del peso del cuerpo, utiliza el 20% del suministro de sangre. La sangre es suministrada a través de una red singularmente compleja de vasos sanguíneos que se extiende a más de 650 km y abarca un área de superficie de aproximadamente 20m<sup>2</sup>, la distancia media entre los capilares es de 40 µm, lo que permite el equilibrio de solutos casi instantáneamente en todo el espacio intersticial del cerebro para moléculas pequeñas [9].

Sin embargo, a diferencia de casi todos los demás órganos del cuerpo donde hay un libre intercambio entre la sangre y el líquido intersticial, los capilares en el cerebro han evolucionado para limitar el movimiento de moléculas y células entre la sangre y el cerebro. Esta característica es importante ya que le provee de una defensa natural contra tóxicos y agentes infecciosos que circulan en la sangre y es conferida por las uniones estrechas de las células endoteliales formando así la Barrera Hematoencefálica (BBB, del inglés Blood-Brain Barrier)[9, 10].

Hasta hace 2 décadas atrás se consideraba al SNC como inmunológicamente privilegiado, es decir se pensaba que difícilmente ingresaban células del sistema inmune a este sitio debido a la existencia de la BBB, la cual regula el tráfico de células inflamatorias y mediadores del torrente sanguíneo al parénquima cerebral. Actualmente se cuestiona este grado de privilegio debido a que se conoce la existencia de la activación del Sistema Inmune Innato y se ha descrito la presencia de linfocitos (1/3/mm<sup>3</sup>) en el líquido cerebroespinal de pacientes sanos [11].

En años posteriores se ha observado que los leucocitos de todos los tipos tienen la habilidad de entrar al SNC, así como también se sabe que el SNC dispone de células inflamatorias innatas, como la microglía y los macrófagos, las cuales poseen una función importante en la propagación de señales inflamatorias [1, 11, 12].

La experimentación ha revelado que el SNC presenta gran variedad de respuestas inmunes e inflamatorias locales y que además ejerce un importante control sobre el sistema inmune, en particular sobre su respuesta inmune en la fase aguda [4, 11].

Por ejemplo, el cerebro recibe señales del tejido dañado o infectado, que pueden tener un origen nervioso (por medio de los nervios sensoriales) o humoral (por medio de moléculas específicas en el sistema circulatorio). La naturaleza de las señales que circulan por el sistema ventricular no se conoce en su totalidad, pero parecen incluir prostaglandinas, bradicidinas, radicales libres, y las proteínas del complemento. Aunque, probablemente las señales más importantes son un grupo de proteínas que se conocen como citocinas [13, 14].

Se han descrito diversas formas en las que pueden actuar las citocinas, se sabe que el SNC tiene mecanismo de transporte con los cuales las citocinas provenientes de la sangre, tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-2 y TNF $\alpha$ , pueden llevar información al SNC [15]. Estas citocinas representan mediadores pro-inflamatorios, que se les ha atribuido relevancia en patologías y desórdenes del SNC asociados al aumento en la permeabilidad de la BBB [16].

#### **1.4.- La Barrera Hematoencefálica (BBB)**

La BBB es una asociación de células de naturaleza poco permeable por lo que actúa como una interface funcional entre el sistema circulatorio (por lo tanto el sistema inmune) y el cerebro. Ésta mantiene la homeóstasis del microambiente del SNC, entre sus funciones están la protección del SNC de los agentes

potencialmente neurotóxicos circulantes en la sangre, el transporte activo y difusión de sustancias de los capilares al parénquima nervioso, así como el metabolismo de sustancias provenientes del encéfalo o de la sangre [17].

La BBB se localiza en el endotelio capilar del encéfalo en un 99%, exceptuando las regiones encefálicas denominadas órganos circumventriculares tales como la eminencia media, la pituitaria, el plexo coroide, el órgano subformical, el órgano vacuoso, la lámina terminalis y el área del postrema fig.1[18-20].

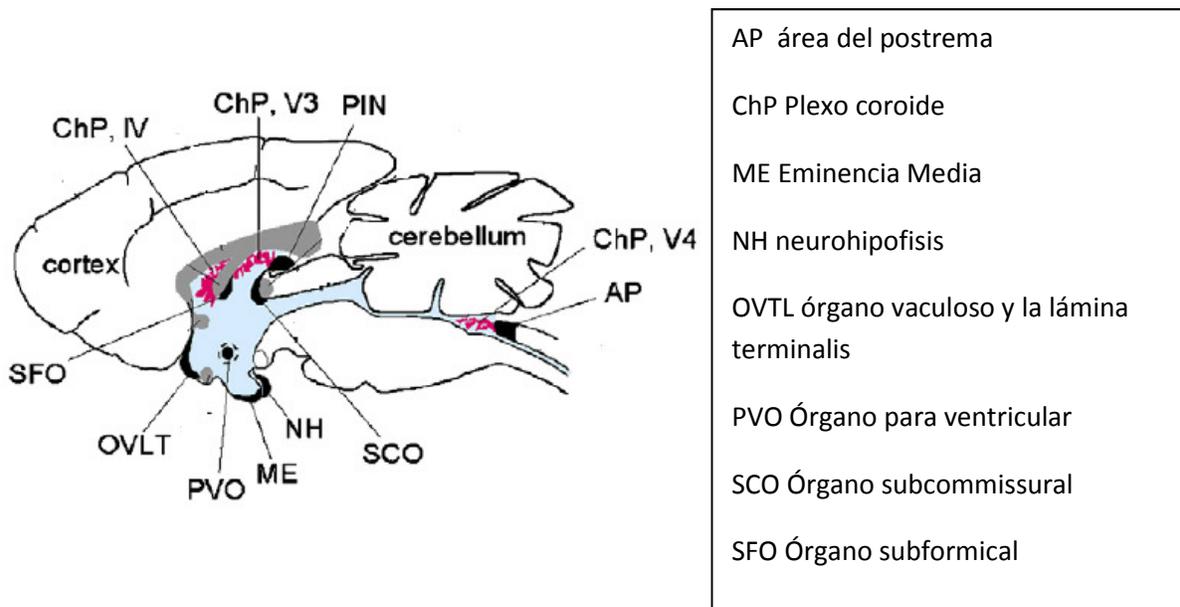


Fig1. Distribución anatómica de los órganos circumventriculares en mamíferos son representados en vista sagital en el cerebro (A) El código de color en negro se muestran los órganos circumventriculares y en rojo los plexos coroideos, las comisuras axonales en gris, el líquido ventricular en azul y tejido cerebral es mostrado en blanco [19].

Como se mencionó en la parte superior, la BBB es una estructura compleja, que está constituida por una monocapa de células que incluyen un endotelio altamente estrecho a través de las uniones estrechas (TJs, del inglés Tight Junctions) y el basamento de membrana compuesto principalmente por el colágeno de tipo IV, la

lámina basal, pericitos, la microglia perivascular, proteoglicanos, diversas glicoproteínas. Así como la asociación del final del pie del astrocito (fig. 2) [18, 20, 21]. Todos estos tipos celulares son indispensables para el desarrollo y mantenimiento de las funciones de la BBB. La cual tiene un papel regulador que facilita la captación de nutrientes esenciales, como vitaminas y hormonas que mantienen el crecimiento y metabolismo cerebral, así como el equilibrio iónico. En ausencia de la BBB el SNC sería afectado por cambios simples [22, 23].

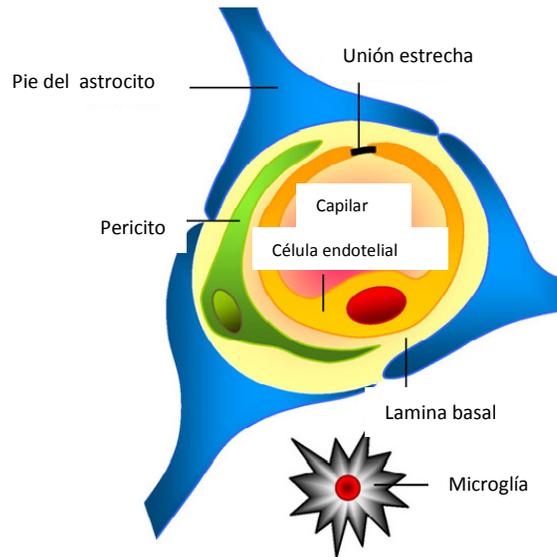


Fig. 2. Componentes de la BBB. La asociación celular de la BBB está compuesta por las TJs de las células endoteliales en donde sus márgenes están sellados por la difusión acuosa de la ruta paracelular, los pericitos se encuentran distribuidos discontinuamente a lo largo de la vascularización del cerebro, ambas células están encerradas en la membrana basal, a la cual forman la matriz extracelular del pie final del astrocito, que delimita al parénquima cerebral. Los procesos de los pies de los astrocitos forman una red compleja rodeando los capilares cerrando así la asociación celular [21].

La BBB también limita la infiltración celular, ya que la permeabilidad de ésta es más baja comparada con los otros órganos periféricos la capa de células endoteliales provee de una superficie tromborresistente que previene la adhesión

plaquetaria, leucocitaria, y la activación de la cascada de coagulación, sin embargo cuando la inflamación se presenta en enfermedades tales como SM o Encefalitis, un gran número de leucocitos migran dentro del cerebro, se considera que el aumento en la permeabilidad se debe a una apertura de las uniones estrechas y por el aumento de la actividad pinocítica así como la formación de canales trans-endoteliales [21].

La BBB por si misma juega un papel activo en la mediación de la respuesta neuroinmune tanto por la producción de mediadores inflamatorios como por la expresión de moléculas de adhesión [21].

### **1.5.-La inflamación y el sistema nervioso central**

La respuesta inflamatoria dentro del SNC se caracteriza por la activación de la microglía, astrocitos y por la expresión de mediadores inflamatorios, así como también por la infiltración de células inflamatorias circulantes [11].

El SNC posee células inflamatorias como la microglía y los macrófagos, los cuales poseen una función importante en la recepción y propagación de señales inflamatorias, la microglía es una población celular altamente receptiva con un importante papel de vigilancia inmune en el SNC, constituye cerca del 5 al 15% de la población celular total del cerebro y forma una red diseminada en el SNC capaz de detectar y reaccionar ante las modificaciones del ambiente. Se halla en reposo y posee una morfología ramificada capaz de monitorear el ambiente cerebral compartiendo muchas propiedades con los macrófagos, como la producción de citocinas inflamatorias y la capacidad fagocítica [11].

El infiltrado celular que puede darse en el SNC está claramente documentado en ciertas patologías como en la isquemia, donde los leucocitos procedentes de la sangre periférica son las células inflamatorias que se acumulan en el tejido cerebral. Esta infiltración se lleva a cabo a través de varios pasos: la activación

endotelial, rodamiento, adhesión y migración endotelial, que conduce a la acumulación de dichas células en el tejido cerebral [11, 24]. La unión de los leucocitos a las células endoteliales, a través de moléculas de adhesión con sus respectivos ligandos, puede activar vías de señalización en ambas células que inducen la amplificación de la respuesta inflamatoria [11, 24]

## **1.6.- Moléculas de Adhesión**

Después de la amplificación de la respuesta inflamatoria la liberación de los mediadores inflamatorios como las citocinas induce al reclutamiento de células inmunes, para ejemplificar, el primer tipo de leucocitos que se infiltran en el SNC isquémico son los neutrófilos, esto generalmente ocurre entre 6-12 horas post trauma los monocitos se acumulan en el área de daño entre 12-24 horas después del inicio de la isquemia, transformándose rápidamente en macrófagos capaces de fagocitar toda materia orgánica muerta, mientras que los linfocitos llegan al parénquima cerebral en periodos más tardíos, sin embargo, se ha descrito en el modelo de EAE que la entrada de linfocitos se da entre 6 a 9 horas [25] . Este infiltrado es posible por la presencia de tres familias de moléculas de adhesión homólogas que son responsables de la adhesión y migración de los leucocitos al área inflamada: y son las inmunoglobulinas, las integrinas y las selectinas [5].

La súper-familia de las inmunoglobulinas comprende un gran grupo de moléculas que se caracteriza por la presencia de una o más unidades de homología Ig. En las células endoteliales este grupo es representado por ICAM-1 e ICAM-2 (del inglés, Intracelular Adhesión Molecule) y VCAM-1 (del inglés, Vascular Cell Adhesion Molecule). Estas moléculas reconocen su ligando en los leucocitos y permiten la adhesión y migración de estas células fuera del torrente sanguíneo.

Las células endoteliales del cerebro son capaces de expresar diversas moléculas de adhesión, se ha observado que en cultivos de células endoteliales de cerebro la expresión de estas moléculas es altamente regulada por IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$

por lo que la migración de los leucocitos a través de la monocapa de células endoteliales podría ser observada después del tratamiento con IFNF- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , además, ha sido también demostrada la participación de VLA-4 (del inglés Very Late Antigen) y VCAM-1 en la adhesión de linfocitos a las células endoteliales cerebrales estimuladas *in vitro* con LPS, IL-1 e IL-6. El fomento de adhesión de los leucocitos en el endotelio cerebral podría ser mediado a través de la ruta LFA-1 (del inglés Lymphocyte Function-associated antigen/ICAM-1) así como la VLA-4/VCAM-1 durante las enfermedades inflamatorias cerebrales. Estas moléculas de adhesión son de gran importancia para permitir la migración de los linfocitos a través de la BBB [20].

### **1.6.1 Transmigración de células sanguíneas y aumento de la permeabilidad en la BBB**

Se sabe que el tráfico de leucocitos dentro del SNC es limitado, sin embargo durante la inflamación los leucocitos pueden infiltrarse al parénquima cerebral por la vía BBB. Se ha descrito que en enfermedades como la esclerosis múltiple (SM), encefalitis viral y especialmente en la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) hay aumento en la expresión de moléculas de adhesión [12].

ICAM se expresa en las células endoteliales durante las enfermedades inflamatorias, se sabe que actúa en el pegado molecular de linfocitos circulantes. ICAM no solo participa en este proceso, también es activado por la extravasación a través de la BBB. Esto incluye la fosforilación de la tirosinacinasasa de adhesión focal, este complejo molecular hace que ICAM induzca una ruptura en la BBB [22]

Por otro lado, la permeabilidad de la BBB se ha visto acompañada al mismo tiempo con su pérdida en enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias tales como: SM, encefalitis, enfermedad de Alzheimer y accidentes vasculares cerebrales, los cuales muestran un decaimiento o debilitamiento de la BBB asociado a la migración de los leucocitos causando la inflamación [26]. El aumento

de la permeabilidad está asociado con la alteración concomitante de varios factores a nivel estructural, molecular y la regulación al alza de varios factores vaso-activos que actúan en diferentes momentos después de una lesión [22]. En un modelo de daño causado por frío se observó debilitamiento en la permeabilidad de la BBB asociado con el aumento de varios factores como la bradicinina, poliaminas, radicales de oxígeno, óxido nítrico y el VEGF (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor ) [22].

### **1.7.- Citocinas y otros mediadores inflamatorios**

Las citocinas son proteínas pequeñas de bajo peso molecular que normalmente se producen en pequeñas cantidades. Sin embargo, esta producción se exagera rápidamente como respuesta al daño y a la enfermedad. Entre ellas se incluyen interferones, interleucinas, factores de necrosis tumoral y quimiocinas. Muchas de ellas son producidas de forma local en los tejidos dañados y actúan sobre las células vecinas, aunque, algunas entran en el flujo sanguíneo alcanzando órganos distantes, incluyendo el cerebro. Son las citocinas las responsables de activar la mayoría de las respuestas inmunes en las enfermedades e infecciones [7, 27].

La mayoría de las citocinas estimulan el sistema inmune, y son diversos los componentes clave de los procesos inflamatorios que favorecen los cambios locales en el flujo sanguíneo y la liberación de la segunda ola de moléculas inflamatorias. Aunque las citocinas comparten muchas de sus acciones y funciones, también varían de forma significativa entre ellas. Algunas tienen características de pro-inflamatorias mientras que otras inhiben los procesos inflamatorios). Las principales citocinas que actúan en los procesos de inflamación son: IL 1, IL-6, TNF $\alpha$  [11, 20, 28], mientras que las principales citocinas anti-inflamatorias son IL-10 e IL-4 [7, 11].

Investigaciones recientes han demostrado que muchas citocinas contribuyen de manera importante en el desarrollo y daño neuronal en ciertas enfermedades del

cerebro, tales como la esclerosis múltiple, infarto y Alzheimer. Además, las citocinas pueden favorecer la apertura de la BBB lo cual podría tener influencia en el transporte de sustancias dañinas dentro del cerebro, así, la producción en exceso de algunas citocinas en el cerebro o a nivel sistémico, que logren atravesar la BBB podrían ser potencialmente dañinas a las neuronas [11, 17, 21, 27].

Por otro lado, las citocinas pro-inflamatorias IL-1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL-6 y GM-CSF producidas y secretadas por la microvasculatura endotelial de las células del cerebro tienen un papel importante para iniciar el cambio en moléculas de adhesión en las células endoteliales como PECAM-E-Selectina e ICAM-1 permitiendo que células inmunes puedan infiltrarse en el SNC causando anomalías en la BBB [22].

Varios estudios han reportado un aumento marcado en la permeabilidad de células endoteliales cultivadas después de la exposición al TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e histamina [22]. La producción de IL-1 $\beta$  en el cerebro da como resultado una rápida inducción de quimio-atrayentes de neutrófilos MIP-2 (del inglés Macrophage Inflammatory Protein 2) y CINC-1 (del inglés Cytokine Induced Neutrophil Chemoattractant-1) [22]. Estas observaciones no dejan lugar a dudas de la influencia de las citocinas en la modificación de la barrera hematoencefálica y su influencia sobre el SNC.

### **1.7.1.-Citocinas con influencia en el SNC**

La IL-1 es producida en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés, principalmente por macrófagos, monocitos y células dendríticas. La IL-1 $\beta$  se sintetiza en respuesta al TNF- $\alpha$  [11]. Se conocen varias isoformas de las cuales la IL-1 $\beta$  es la que se encuentra predominante dentro del SNC, ésta es sintetizada por varios tipos celulares como la microglia, astrocitos, neuronas y células endoteliales. La expresión de IL-1 $\beta$  aumenta rápidamente después de diferentes estímulos neurotóxicos o después de un

proceso isquémico. La IL-1 $\beta$  es un potente pirógeno, que media la temperatura corporal, diferentes estudios han demostrado que la inyección interventricular de IL-1 $\beta$  aumenta la formación del edema cerebral, el tamaño de la zona infartada así como el aumento de la permeabilidad de la BBB [11, 21].

La IL-6 es una glicoproteína segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación esta inducida por la IL-1 $\beta$  y se incrementa en respuesta al TNF $\alpha$ . Entre otras funciones, activa la formación de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. La IL-6 puede contribuir al daño provocado por la inflamación en el cerebro y está implicada en la regulación de la apoptosis neuronal, es así que los niveles plasmáticos de IL-6 pueden ser un indicador del deterioro neurológico temprano, además se ha reportado que en el trauma cerebral la liberación de IL-6 por los astrocitos induce la apertura de la BBB[11, 19, 21].

El TNF $\alpha$  es liberado principalmente por macrófagos. En el SNC constituye el principal mediador de la inflamación, induce una cascada de eventos celulares que culminan con la muerte neuronal. El análisis de la expresión temporal del RNAm de esta citocina en ratas isquémicas ha revelado que la sobreexpresión del TNF- $\alpha$  es proporcional a la sobreexpresión de IL-1 e IL-6. Inicialmente se observa aumento en la expresión entre 1-3 hrs. después de la inducción de la isquemia cerebral y posteriormente vuelve a haber un segundo pico de expresión entre las 24-36 horas. Además la administración interventricular de esta citocina incrementa el número de células inmunes en el Fluido Cerebro Espinal (FCE) y aumento en los niveles de albúmina, lo que sugiere que favorece la disrupción de la BBB [20], [11].

El TGF- $\beta$  (del inglés Transforming Growth Factor beta) es una citocina multifuncional con una distribución generalizada, regula procesos como la proliferación, diferenciación celular así como un papel importante en la inmunidad [11]; en el cerebro TGF- $\beta$  tiene una producción local y presenta un importante

papel en la vigilancia inmunológica disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, también se halla presente en niveles demostrables en el FCE. El TGF- $\beta$  tiene la habilidad de suprimir la proliferación de linfocitos T así como también para suprimir la expresión de moléculas quimiotrayentes producidas por los astrocitos. Se ha demostrado que puede regular negativamente las moléculas de adhesión un efecto contrario a las IL-1 $\beta$  y IFN- $\gamma$ [1].

El MIF, originalmente identificado como una citocina de células T es considerado como un mediador crítico de la cascada inflamatoria y por tanto de la respuesta inmune innata. El MIF induce la producción de citocinas inflamatorias que a su vez estimulan aún más la producción de MIF formando un circuito de retroalimentación positiva durante las etapas iniciales de la cascada inflamatoria[29]. Se ha encontrado que MIF presenta un papel esencial en la respuesta inmune en enfermedades por virus como la del Virus del Oeste del Nilo (WNV del inglés west Nile Virus) agente causal de la encefalitis por el WNV. En esta patología se ha experimentado con ratones deficientes al MIF, y se ha observado que estos ratones presentan reducción en el número de infiltración de leucocitos infectados por WNV en todas las regiones del cerebro, por lo tanto se considera que su acción está implicada en el reclutamiento de células inmunes [30]

### **1.8 Parásitos Helmintos.**

Los parásitos helmintos son organismos complejos algunos con la habilidad de vivir por décadas en sus hospederos. Estos infectan más de dos billones de personas alrededor del mundo y causan una marcada morbilidad y en algunos casos discapacidad [31]. Los helmintos son un grupo evolutivamente muy antiguo y diverso, sin embargo, hay una convergencia notable en las formas en que modulan el sistema inmune por medio de “la supresión inmunopatológica”, donde están implicados diversos tipos celulares como las células TCD4+, células T

reguladoras (Treg), TCD8+ y células Th 17 que responden a TGF $\beta$ , IL-10 y citocinas del perfil Th2 [32].

En los individuos infectados, el parasitismo puede conducir a graves complicaciones inmunopatológicas, tales como las enfermedades granulomatosas y falla de órganos. Sin embargo, es más común cierta interacción armónica, hospedero-parásito y pareciera ser que clínicamente pasan desapercibidos por el sistema inmune [31].

### **1.8.1 Inmunomodulación por helmintos**

Las infecciones por parásitos helmintos son uno de las enfermedades endémicas de muchos de países con economías emergentes como México. Particularmente, los parásitos helmintos generan una gran variedad de enfermedades dado que pueden alojarse en diferentes tejidos y órganos como el tracto gastrointestinal, piel, vejiga, músculos, hígado, ojos, pulmones y cerebro [33].

Los efectos inmunomoduladores de los helmintos están enmarcados de manera general por la supresión del sistema inmune-antígeno específica. Por ejemplo, pacientes con tejidos infectados con helmintos, tales como schistosomiasis y filariasis, han dado una concepción de que estas infecciones están asociadas con una baja modulación de la Respuesta Inmune; en algunos casos con una atenuación medible de las respuestas a los antígenos del parásito [31].

La respuesta inmune de éstos se caracterizan porque en la fase aguda inducen altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) mientras que en la fase crónica presentan una respuesta asociada a citocinas anti-inflamatorias (IL4, e IL-10) [31, 34]

En las infecciones crónicas por helmintos se inducen fuertes respuestas inmunes que pueden modular subsecuentes retos a otros patógenos no relacionados [35]. Esta respuesta ha dejado claro el cambio de una respuesta tipo Th1 inicial a una

respuesta Th2 en la fase crónica que es mucho más permisible para el establecimiento definitivo del parásito dentro del hospedero. A esta modulación se le han reportado efectos benéficos en enfermedades del sistema inmune [31]. Se asume que los productos liberados por los parásitos vivos en el sitio de infección pueden colectarse, estos productos excretados/secretados tienen efectos sobre la activación diferencial de las células del sistema inmune o indirectamente sobre los mecanismos de regulación negativa del sistema inmune [32].

Las citocinas del perfil Th2 favorecidas por la infección tienen influencia directa sobre los tejidos, al cambiar el microambiente que, junto con las quimiocinas atraen a ciertas poblaciones celulares bloqueando la expresión de moléculas de adhesión sobre las monocapas endoteliales, e inhibir así la migración de las células del sistema inmune hacia el sitio local de la infección [31].

Una de las helmintiasis de distribución universal es la cisticercosis, que es una enfermedad presente de manera importante en países de bajo nivel socioeconómico en los que el cerdo es una fuente importante de alimentación [33].

El parásito *Taenia solium* es el céstodo responsable de la cisticercosis humana, causada por la forma larvaria de este parásito, de gravedad variable según la localización, este puede albergarse en tejidos y órganos. El alojamiento de cisticercos en el SNC, patología conocida como la neurocisticercosis NCC es con mayor frecuencia motivo de consulta médica [36].

En los últimos años el modelo experimental murino de cisticercosis causada por *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) ha sido útil para estudiar los diferentes factores biológicos e inmunológicos que participan en la resistencia ó susceptibilidad en esta parasitosis. Los resultados experimentales obtenidos con este modelo se ha extrapolado a la cisticercosis humana, ya que con este modelo se ha avanzado en la sustitución de antígenos de *T. solium* por antígenos de *T. crassiceps* para el

inmuno-diagnóstico de la neurocisticercosis (NCC) humana, debido a la gran similitud antigénica que presentan ambos parásitos [37, 38].

*T. crassiceps*, es un céstodo parásito que durante su ciclo de vida requiere de un hospedero intermediario (roedor) en la fase de metacéstodo y de un hospedero definitivo (canidos) en la fase adulta (fig. 3). El ciclo comienza por la ingestión de cisticercos vivos presentes en roedores silvestres por los canidos, luego los huevecillos de los adultos son liberados al ambiente, estos al ser liberados pueden contaminar granos (cereales) de los cuales se alimentan los hospederos intermediarios y al ser presas son consumidos por los huéspedes definitivos con lo que el ciclo se reinicia [33].

La respuesta inmune contra *T. crassiceps*, estudiada en el modelo murino de infección, se ha caracterizado por una respuesta inicial tipo Th1, con presencia de IL-1, TNF $\alpha$ , e IFN- $\gamma$  que restringe el crecimiento del parásito. Pero se mantiene solo por un periodo más o menos de 4 semanas, después se da una polarización hacia una respuesta de tipo Th2 caracterizada por citocinas como IL-4, IL-10 e IL-6 que permite el establecimiento del parásito. Esta polarización de la respuesta Th1 a Th2 se ha sugerido está regulada por la presencia del helminto [39].

Por otro lado, la respuesta de tipo Th2 se ha visto que tiene un efecto sobresaliente sobre una de las subpoblaciones de macrófagos, que son atraídos por este perfil de citocinas, estos son los Macrófagos Alternativamente Activados (MoAA). Recientemente se describió que la infección con *T. crassiceps* reclutan MoAA en un microambiente tipo Th2 y que estos parecen ser necesarios para el establecimiento de este parásito [40].

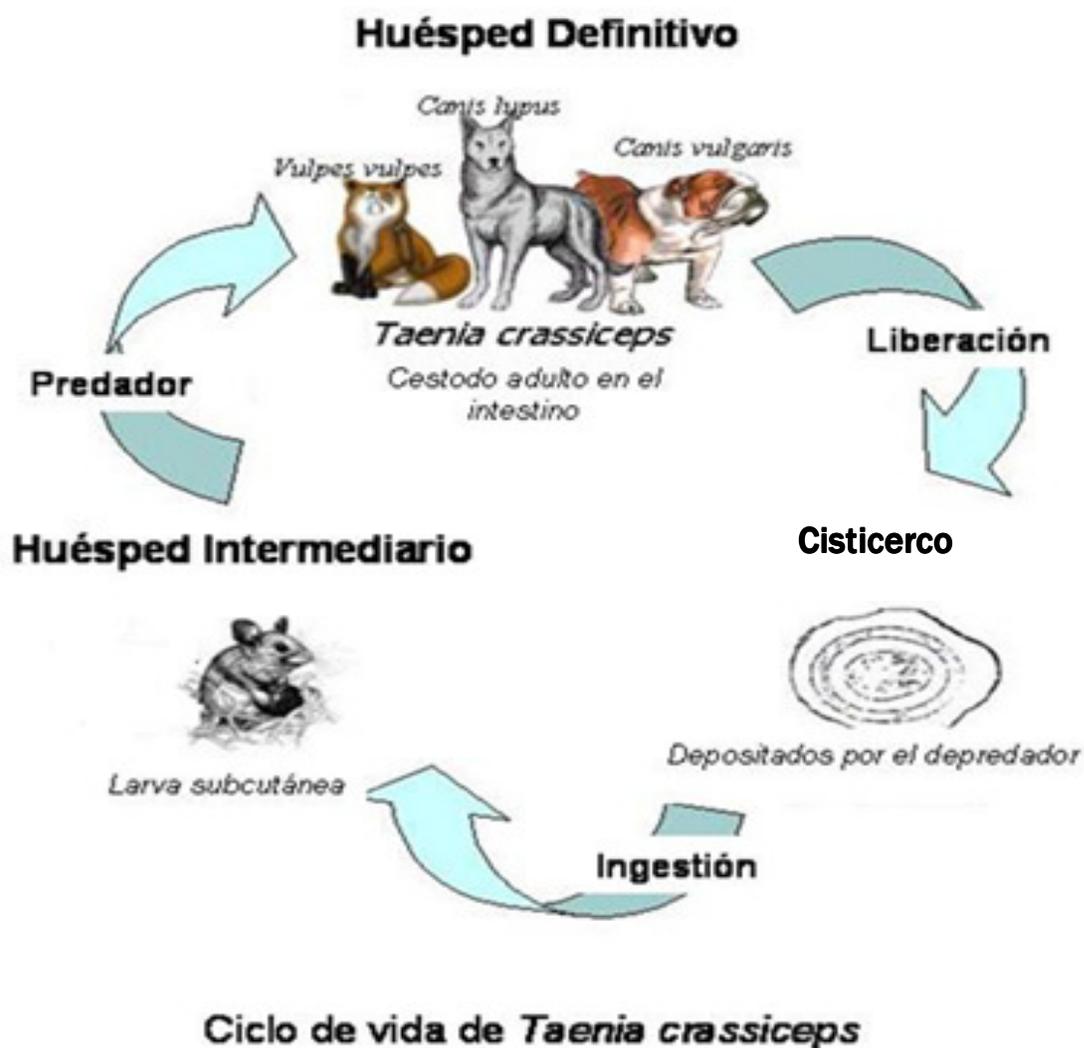


Fig. 3.-ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. El ciclo principia con el adulto dentro del intestino de hospedero definitivo (canidos), donde se producen huevecillos, los cuales son liberados al ambiente en las heces, estos son ingeridos por los hospederos intermediarios (roedores), En la naturaleza estos intermediarios son presas de canidos como zorros, lobos y en algunos casos por perros de domésticos, con lo que el ciclo se reinicia [30].

## 2. Justificación

El SNC es un sitio considerado inmunológicamente privilegiado, donde la BBB controla la entrada de leucocitos bajo condiciones fisiológicas normales. Mientras que, durante las enfermedades inflamatorias del SNC como, la SM, EAE, la meningitis bacteriana, así como procesos infecciosos o inflamatorios, la BBB muestra un decaimiento que favorece la entrada de los leucocitos al SNC por medio de moléculas que controlan el tráfico específico a través de la BBB, como lo son las moléculas VCAM-1 e ICAM-1 [21].

Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han reportado que la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 en el endotelio del cerebro, en condiciones normales, es excepcionalmente baja. Sin embargo, estos se incrementan con la exposición a citocinas tales como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  así como a lipopolisacáridos (LPS). El incremento en la expresión de estas moléculas se da relativamente rápido después del reto. Por ejemplo se ha observado su sobre-expresión desde las 5 horas después de la administración i.p. de la molécula pro-inflamatoria TNF- $\alpha$  y se mantienen 24 horas después, lo que sugiere que la exposición a un microambiente inflamatorio podría influir en la expresión de moléculas de adhesión y afectar la permeabilidad de la BBB. Por otro lado, se ha observado que citocinas anti-inflamatorias, como TGB- $\beta$ , reduce la adhesión de las células T a la BBB [12, 41].

Otros estudios han observado que la inyección intracraneal de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  incrementan la permeabilidad de la BBB [42]. La presencia de otras citocinas como la IL-6 en patologías implicada en diferentes desórdenes inflamatorios neurológicos sugiere que la IL-6 tiene un papel crítico en la BBB. Ratones que sobre-expresan IL-6 en los astrocitos muestran anormalidades neuropatológicas con una decaimiento de la BBB. Ratones inducidos con Meningitis bacteriana, deficientes de IL-6 muestran un incremento en la permeabilidad a diferencia de los ratones Wild-type (WT) [43].

En infecciones por helmintos, que muestran una respuesta inmune tipo Th1 en la fase aguda de la infección y una fuerte respuesta inmune tipo Th2 en la fase crónica se podría ver afectada la BBB por la presencia sistémica de citocinas, permitiendo así la instalación del parásito en el SNC como es el caso de la NCC provocada por *T. solium*. Así, la presencia de citocinas inflamatorias (Th1) o anti-inflamatorias (Th2) y los niveles incrementados de las moléculas de adhesión podrían afectar la trans migración de células inmunes al SNC [44]. Por lo que, en este trabajo de tesis estudiamos en el modelo murino de infección por *T. crassiceps* si el ambiente de citocinas en diferentes etapas de la infección pueden modificar la BBB alterando la permeabilidad de la misma.

### **3. Hipótesis**

La infección con cisticercos de *Taenia crassiceps* modifica la permeabilidad de la BBB, debido a una respuesta inmune inflamatoria caracterizada por citocinas de tipo Th1 en la fase aguda de la infección.

#### 4. Objetivo general

- Analizar si la infección por *Taenia crassiceps* en la fase aguda y en la fase crónica induce cambios en la BBB en un modelo murino.

#### 4.1. Objetivos particulares

- Determinar en ratones ♂ BALB/c infectados con 10 o 20 cisticercos de *T. crassiceps* el crecimiento parasitario en la cavidad peritoneal a lo largo de 13 semanas.
- Cuantificar la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero de ratones infectados con *T. crassiceps*, en las fases aguda y crónica de la infección.
- Medir la permeabilidad de la BBB en ratones infectados con *T. crassiceps* a lo largo de 13 semanas, que comprende las fases aguda y crónica de la infección.
- Determinar la expresión de las moléculas de adhesión ICAM y VCAM en el cerebro de los ratones infectados con *T. crassiceps*.

## 5. Material y Métodos

**5.1 Ratones e Infección.** Se Utilizaron ratones BALB/c ♂ de 6-7 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 14 ratones fueron infectados con 10 metacestodos de *T. crassiceps* (cepa ORF) vía i.p y 8 ratones se mantuvieron sin infección como controles. Todos los grupos estuvieron en las mismas condiciones dentro del Bioterio de la Universidad con libre acceso a alimento y agua con 12 horas de luz y oscuridad.

**5.2 Evaluación de la carga parasita de la cavidad peritoneal.** Los ratones infectados fueron sacrificados con el fin de contabilizar los metacestodos se inyectaron 5 ml de solución salina vía intraperitoneal para lavar la cavidad peritoneal, la extracción de los parásitos se hizo mediante una incisión en la cavidad y son fueron con una jeringa, estos fueron lavados con solución salina y colocados en una caja Petri para su contabilización.

**5.3 Cuantificación de citocinas.** Para el análisis de citocinas se obtuvo el suero de los ratones sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> en las semanas 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 13 siguiendo la norma nacional NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Los desechos biológicos fueron manejados de acuerdo a la norma de Bioseguridad de nuestra facultad. De cada ratón se obtuvo sangre periférica para la obtención de suero y se determinó, por medio de la técnica ELISA sándwich, la producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, e IL-4 (controles e infectados), siguiendo las recomendaciones del proveedor (Peprotech, México). Se utilizaron placas para ELISA de 96 pozos (NUNC Maxisorp), estas fueron sensibilizadas con el anticuerpo de captura diluido en PBS a una concentración de 2 $\mu$ g/ml específico para cada citocina (purified antimouse IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4 y MIF). Se sensibilizaron con 100  $\mu$ L por pozo utilizando una micropipeta multicanal. Se dejaron incubar toda la noche a 4 °C.

**5.3.1 ELISA. Bloqueo, curva y muestras.** Después de la incubación se lavó la placa 4 veces con PBS-tween 0.05%. Posteriormente la placa fue secada y se bloqueó la placa con 200 µl de buffer de bloqueo PBS-BSA 1% esto para evitar el pegado inespecífico (200 µL POR POZO) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante dos horas. Transcurrido el tiempo se lavó de nuevo 4 veces (PBS-Tween) y se procedió a hacer la curva de citocina recombinante murina por duplicado en las dos primeras hileras de pozos de la placa, cada punto de la curva se hizo por duplicado empezando con una concentración de 12500 pg/ml realizándose diluciones a la mitad, hasta el pozo 11, el pozo 12 solo se agregó PBS-BSA al 1%. A los pozos restantes se agregaron 50 µl de las muestras de los sueros y se incubaron a 4° C durante toda la noche.

**5.3.2 Revelado.** Se sacó la placa de incubación y se llevó a temperatura ambiente, se lavó 4 veces y se secó por aspiración para adicionar el anticuerpo biotinilado correspondiente a cada citocina a una concentración de 1 µL/mL y se agregaron 100µl por pozo, se incubó por una hora a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación se lavó cuatro veces la placa y se secó por aspiración, seguido a esto se agregó a cada pozo 100 µl de streptoavidina peroxidasa diluida 1:4000 en PBS-BSA 1% y se incubó de 30 a 45 min a temperatura ambiente, se lavó la placa 5 veces con PSB-Tween, por último se preparó una solución de revelado con 100µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 11 mL. De ABTS y posteriormente se agregaron 100 µL por pozo, y se dejó incubando a temperatura ambiente por 15 min y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (Thermo LabSystems) a 405 nm. Nota: para la citocina MIF la solución de bloqueo consiste en una mezcla de PBS+BSA AL 1% +1.5 gr de sucrosa+0.05 gr de azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), la curva de la recombinante para MIF comienza a una concentración de 10000 pg/ml.

**5.4 Permeabilidad de Barrera Hematoencefálica.** Para el análisis de la permeabilidad de la BBB en las semanas 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 13 post-infección se decidió formar grupos de tres, en los cual estaba conformado por un ratón control

y 2 ratones infectados que recibieron por vía intravenosa colorante azul de Evans (250µm de colorante por cada 30 g de peso)[45] (Dos horas después fueron sacrificados por medio de dislocación cervical. Se obtuvieron los cerebros de los ratones y se colocaron en tubos de 15 ml con tapón de rosca (Falcon) que contenían 1400µl de acetona y 600µl de PBS. Se trituraron y se dejaron perfundir por 24 hrs para el análisis posterior del sobrenadante tenido. Los sobrenadantes fueron analizados con un espectrofotómetro (Thermo, Biomate 3) a una longitud de onda de 620 nm[45].

**5.5 Cuantificación por RT-PCR de VCAM, ICAM y TGF-β.** Se utilizaron cerebros de ratones controles, y de ratones con infecciones de 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 13 semanas para determinar la expresión de las moléculas de adhesión VCAM, ICAM y TGF-β. Se obtuvo el RNA con trizol (Sigma-Aldrich, México) utilizando la técnica sugerida por el proveedor.

**5.5.1 Extracción de RNA.** Se obtuvieron los cerebros de ratones tanto infectados como de los controles y se colocaron en 1ml de trizol (SIGMA-Aldrich) por cada 50-100 mg de tejido dentro de un tubo ependorft para almacenarlos a -70°C, posteriormente se descongelaron las muestras y se agregaron 200 µL de cloroformo grado molecular (J. T. BAKER 9180-02) por cada ml de trizol agregado (40 µL si se agregaron 200 µL de trizol) y se agitó vigorosamente en un vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después se centrifugaron las muestras a 14000 rpm durante 10 min. Después de centrifugar las muestras quedan tres fases: una superior transparente, una ligera natita blanca y en la parte inferior queda el trizol, se toma solamente la parte transparente evitando tocar alguna de las otras dos. Se tomó el sobrenadante y se le agregó 500µl de isopropanol por cada ml de trizol utilizando (50 µL si se utilizaron 200 µL de trizol). Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. Se decantó y resuspendió la pastilla, se lavó con etanol al 70 % mínimo 2 veces y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min. La pastilla se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 min, finalmente

se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua grado molecular. El cDNA fue preparado utilizando el Kit First strand sythesis superscript II (Invitrogen) a partir de 5  $\mu$ g de RNA total. Las muestras de cDNA fueron estandarizadas basándose en el contenido de cDNA de GAPDH. Los oligonucleótidos fueron para GAPDH F-TCGGTGTGAACGGATTTGGC y R-CTCTTGCTGAGTGTCCCTTGC [46], intraceullar adhesión molecule-1 ICAM-1 F-CAACTGGAAGCTGTTTGAGCTG R-TAGCTGGAAGATCGAAAGTCCG[47], Vascular adhesión molecule VCAM-1 F-CAAGGGTGACCAGTCATGA, R-TGTGCAGCCACCTGAGATCC[47], TGF-B F-GCCCTTCCTGCTCCTCAT, R-TTGCATGGTAGCCCTTG[48]

El PCR se realizó en un volumen total de 50  $\mu$ l de buffer PCR en presencia de DNTPs 0.2 M, 0.2 Mm de cada primer y 2.5 U de Taq Polimerasa platinumium (invitrogen) utilizando un termociclador (Corvett Research,). Después de 40 ciclos de amplificación, los productos de PCR fueron separados por electroforesis (50 V) en un gel de agarosa al 1.5% y visualizados con tinción de bromuro de etíidio (0.5 $\mu$ g/ml) en el sistema de documentador de geles Biosens SC 645; el análisis se realizó con el programa PSRemote.

**5.6 Análisis Estadístico.** Se analizó una n=60 ratones, 20 controles y 40 infectados (3 experimentos independientes, cada uno con una n=20) con la prueba *t* de student considerando significativa una  $P < 0.05$ , se utilizó el programa GraphPad Prism 5.

## 6. Resultados

### 6.1 Carga parasitaria.

Para evaluar la evolución de la infección por *T. crassiceps* se cuantificó la carga parasitaria, para lo cual se contabilizaron los cisticercos de la cavidad peritoneal en las semanas 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13 post-infección. En la **figura 4** se puede observar el incremento de la carga parasitaria a partir de la semana 7, en la semana 9 en adelante el incremento se dio de manera exponencial.

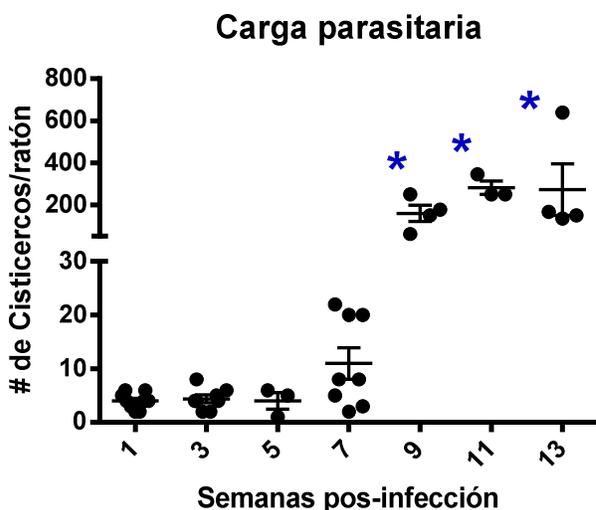


Fig.4. Número de cisticercos de *T. crassiceps*. La gráfica muestra el curso de la replicación de los cisticercos en cavidad peritoneal, después de la infección i.p. con 10 metacestodos de *T. crassiceps* en ratones ♂ BALB/c. La media representa el promedio de cisticercos obtenidos por ratón. n= 60; \* p< a 0.05 respecto a la semana 1, 3, 5 y 7. GraphPad Prism 5.

### 6.2 Cuantificación de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

#### 6.2.1 Citocinas pro-inflamatorias

Recientemente se ha propuesto que las citocinas pro-inflamatorias tienen un papel importante en el cambio de la permeabilidad de la BBB, por lo que en este trabajo de tesis determinamos en suero (a nivel sistémico) las concentraciones de las citocinas IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 y MIF durante el transcurso de la infección con *T. crassiceps* hasta la semana 13 post-infección.

Como se puede observar en la figura 5, en las primeras semanas pos-infección hubo incremento de las citocinas pro-inflamatorias MIF, IL-1  $\beta$  e IFN- $\gamma$   $p < 0.05$  (fig. 5 a, b y d). Sin embargo, al hacerse crónica la infección sus niveles empezaron a decaer. Para las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  a partir de la semana 7, se observó esta disminución, mientras que para el MIF se observó en tiempos más tempranos, alrededor de la semana 3, **sin embargo**, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de la IL-6.

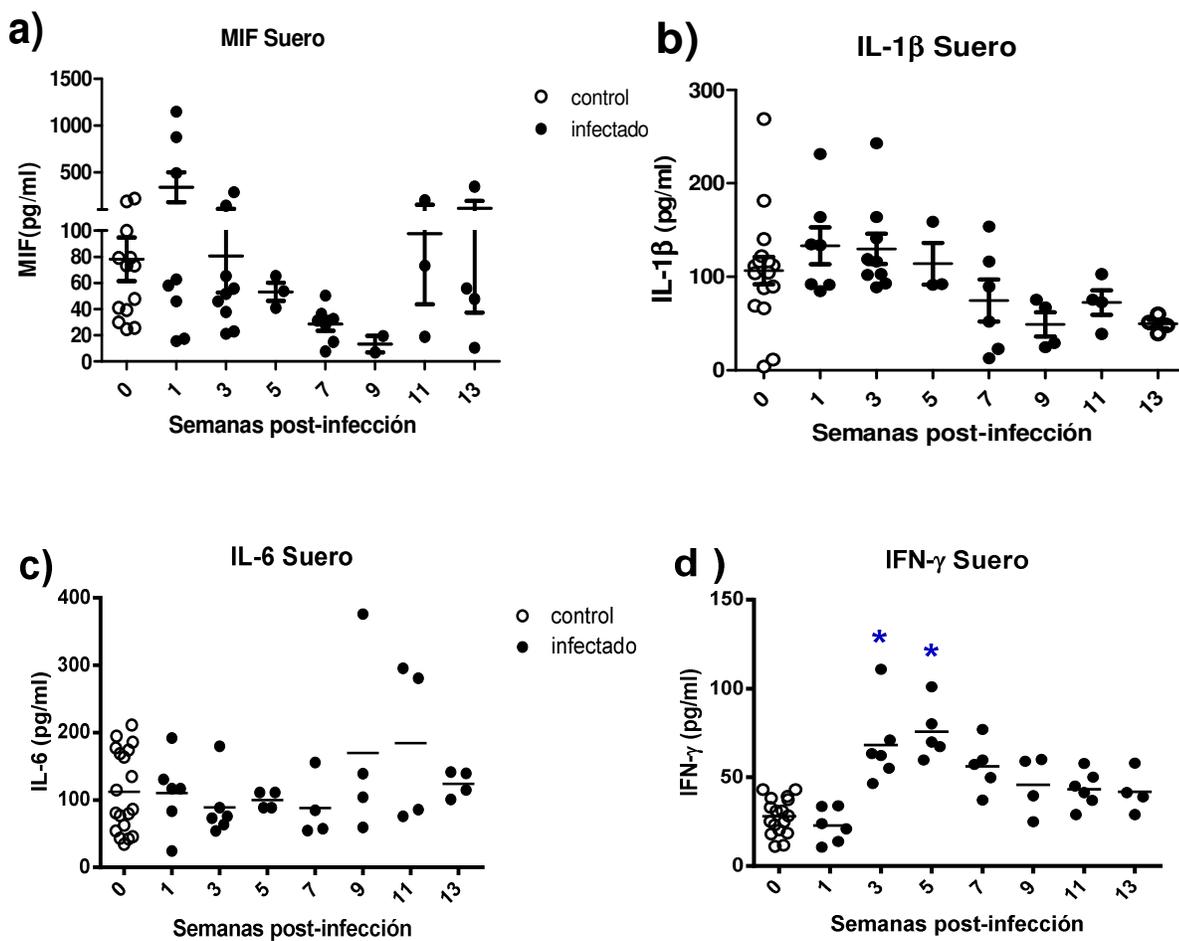


Fig.5 Concentración de citocinas pro inflamatorias en suero de ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps*, a) MIF, b) IL-1 $\beta$  c) IL-6 y d) IFN- $\gamma$ . Los resultados representados de 3 cinéticas independientes n=20 con resultados similares, \* estadísticamente diferentes con respecto al tiempo 0. Prueba U de Mann-Whitney  $P < 0.05$  GraphPad Prism 5.

### 6.2.2 Citocina anti-inflamatoria

Las infecciones causadas por Helmintos presentan un cambio de citocinas Th1 a una de tipo Th2, se ha demostrado que el incremento de la IL-4 es característico de una respuesta tipo Th2; aquí observamos cómo el incremento se dio a partir de la semana 11 **figura 6** en esta semana las citocinas Th1 comenzaron a tener una tendencia negativa véase **figura 5**

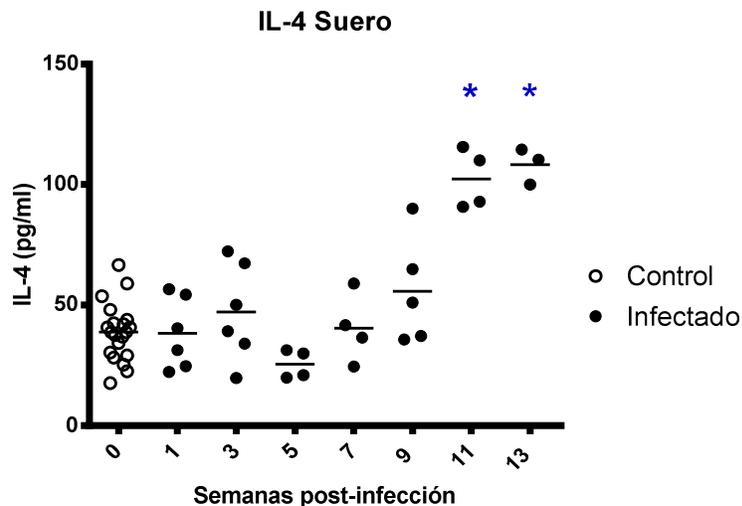
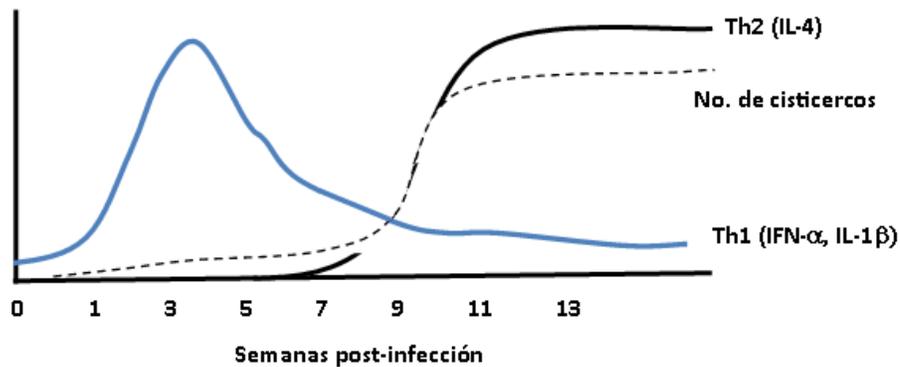


Fig.6. Concentración de citocinas anti-inflamatorias en suero de ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps* via i.p. cuantificación de la citocina anti-inflamatoria IL-4 para el análisis se utilizó la técnica de ELISA sándwich. Los resultados de 3 cinéticas independientes n=60 con resultados similares \* representan diferencias estadísticamente significativas con respecto al tiempo 0.  $p < 0.05$  prueba U de Mann-Whitney  $P < 0.05$  GraphPad Prism 5.

En la figura 7 se resume de forma esquematizada la cinética de los perfiles de citocinas Th1 y Th2 observados a nivel sistémico en los ratones infectados con *T. crassiceps* a lo largo de 13 semanas de infección. Esto nos da una idea de cómo se va regulando la respuesta de tipo Th1 a una de tipo Th2 en los ratones ♂ infectados con *T. crassiceps*. Con este esquema se puede apreciar que la respuesta tipo Th1-inflamatoria restringe la replicación del cisticerco, pero cuando cambia a una respuesta tipo Th2 anti-inflamatoria la replicación del cisticerco se vuelve exponencial, de acuerdo a lo reportado previamente por Terrazas y col [39].



**Fig. 7. Esquema simplificado de la respuesta inmune durante la infección murina de *T. crassiceps*.** La línea azul sólida representa la respuesta inicial tipo Th1, la línea negra sólida representa la respuesta inmune tipo Th2 y la línea punteada representa la carga parasitaria y su crecimiento a través de 13 semanas de infección.

### 6.3 permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica.

Debido a la homología antigénica que presenta *T. crassiceps* con *T. solium* y esta última presenta tropismo por el SNC, se decidió medir la permeabilidad de la BBB durante el transcurso de la infección

#### 6.3.1 Permeabilidad de la BBB en los ratones infectados

En la figura 8 se observa el incremento de la permeabilidad de la BBB en las primeras semanas de infección hasta la semana 7. La mayor permeabilidad se observó en la semana 5, de manera interesante la permeabilidad a partir de la semana 7 comenzó a disminuir. Hasta casi llegar al tiempo cero en la semana 13 post-infección. Esto nos sugirió que quizá el perfil de la respuesta inmune inflamatoria observada en la fase aguda de la infección por *T. crassiceps* estuviera influyendo en la mayor permeabilidad observada en la BBB, afectando quizás la expresión de moléculas de adhesión e incluso directamente sobre las uniones estrechas de la vasculatura del SNC.

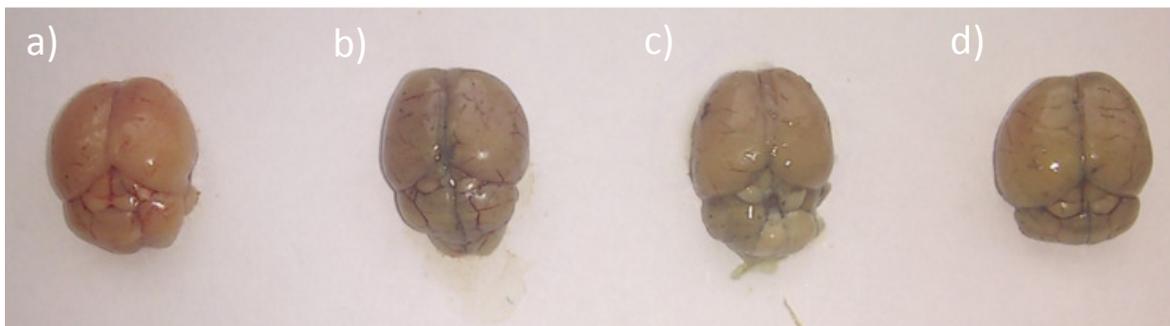
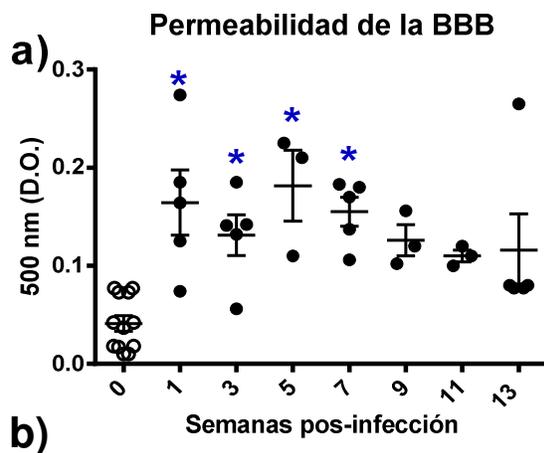


Fig. 8. Cinética de la permeabilidad de la BBB en cerebros de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. A) Densidad óptica (620nm) de la permeabilidad del azul de Evans en la BBB. Los resultados obtenidos representan 3 cinéticas independientes, de izquierda a derecha el primer cerebro representa un control, el segundo 5 semanas, tercero 11 semanas. n=60 \*representa diferencias significativas con respecto al tiempo 0. Prueba U de Mann-Whitney  $P < 0.05$  GraphPad Prism 5. B) Fotos representativas de la permeabilidad del azul de Evans en los cerebros.

#### 6.4 Asociación citocinas permeabilidad de la Barrera Hematoencefálica

Para relacionar el perfil de citocinas con la permeabilidad de la BBB comparamos el perfil de las citocinas IL-1 $\beta$ , MIF, IFN- $\gamma$  e IL-4 con la permeabilidad de la BBB observada.

Como ya se mencionó, se observó un importante aumento en la permeabilidad de la BBB desde la semana 1 hasta la 7 p.i., este periodo coincide con las citocinas inflamatorias IL-1 $\beta$ , MIF e IFN $\gamma$  presentaron sus niveles más altos a nivel sistémico (hasta la semana 7 p.i.) (figura. 9).

De manera interesante, cuando las citocinas pro-inflamatorias van en descenso, posterior a la semana 7, la permeabilidad presentó el mismo comportamiento, disminuyó. Este fenómeno estuvo acompañado del incremento posterior a la semana 7 p.i. de la concentración sistémica de la citocina anti-inflamatoria IL-4 (figura.10).

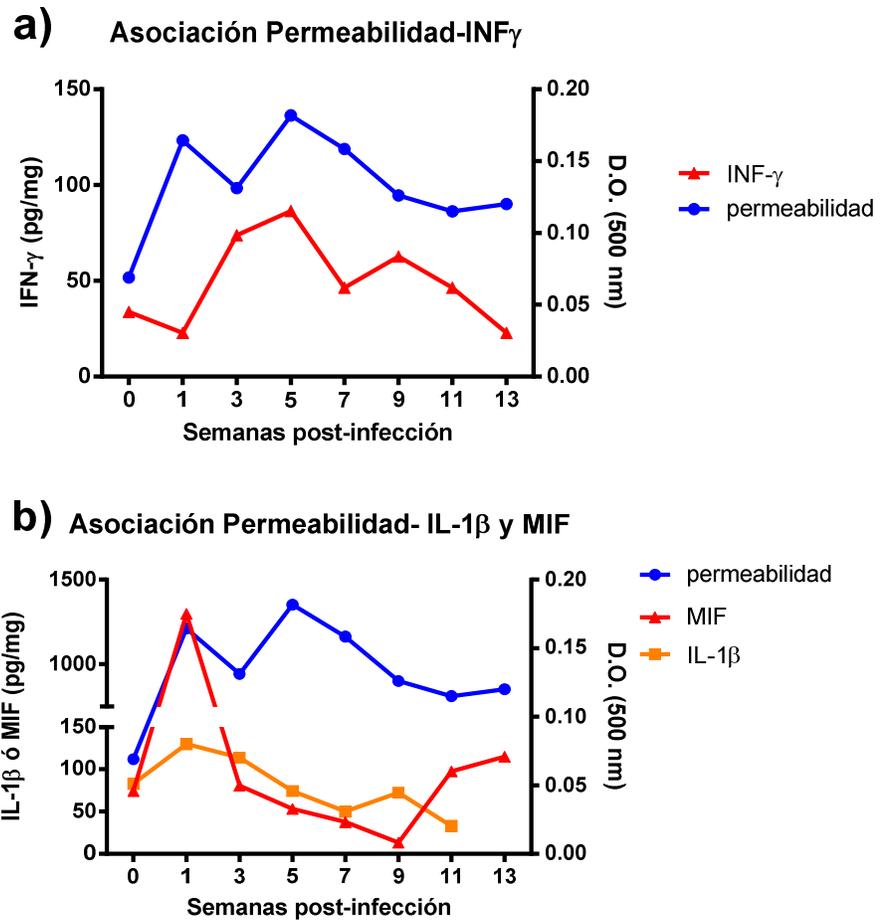


Fig. 9. Asociación de citocinas pro-inflamatorias-permeabilidad BBB. Comparación de la permeabilidad de la BBB con citocinas pro-inflamatorias en cerebros de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. a)  $INF_{\gamma}$  permeabilidad; b) IL-1 $\beta$  e IL-6 los resultados obtenidos representan 3 cinéticas independientes n=60 \*representa la diferencia estadística con respecto al tiempo 0 prueba U de Mann-Whitney. P< 0.05 Graph Pad Prism 5.

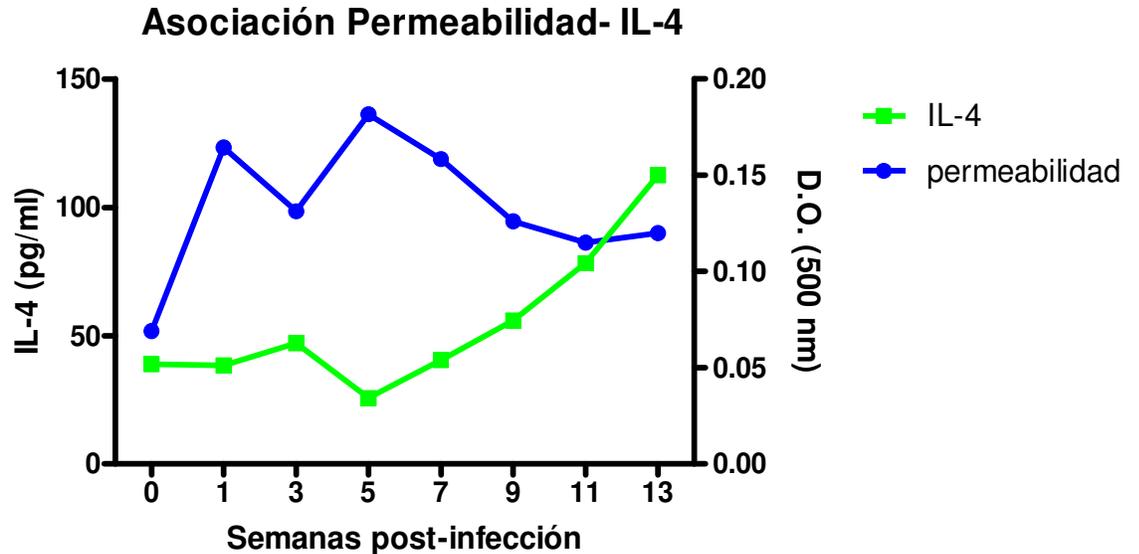


Fig. 10. Asociación de la permeabilidad de la BBB con IL-4 anti-inflamatorias en cerebros de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. los resultados obtenidos representan 3 cinéticas independientes n=60 \*representa la diferencia estadística con respecto al tiempo 0 prueba U de Mann-Whitney P 0.05 Graph Pad Prism 5.

### 6.5.- Cuantificación por RT-PCR de los transcritos de VCAM e ICAM.

Además de las citocinas, las moléculas de adhesión y unión también tienen una importante función en la apertura de las uniones estrechas, alteraciones en su expresión basal pueden causar aumento en la permeabilidad de los tejidos, de ahí la importancia de saber si la infección podría actuar sobre estas moléculas, para lo cual determinamos en el cerebro de los ratones infectados la expresión por RT-PCR de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, así como la expresión *in situ* de TGF- $\beta$  tiene un papel regulador en las moléculas de adhesión (**figura 11a-b**).

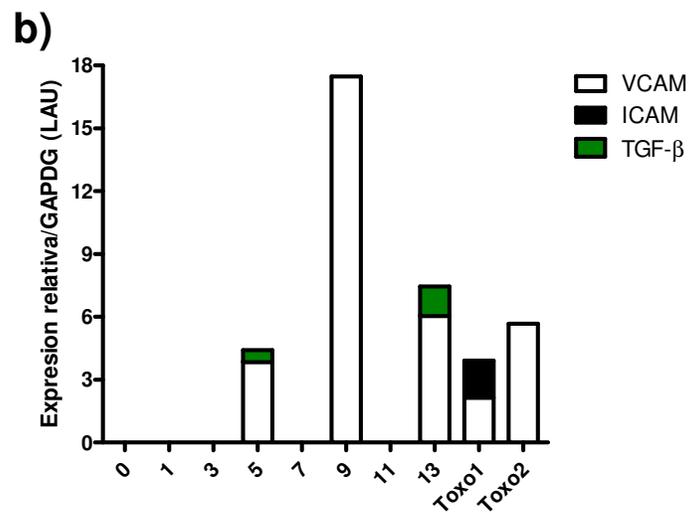
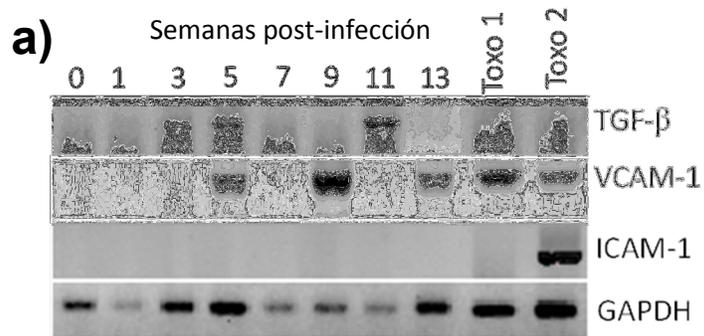


Fig.11. Cinética de la expresión relativa de los transcritos para ICAM-1, VCAM-1 y TGF- $\beta$ . La determinación se realizó en cDNA obtenido de los cerebros de ratones BALB/c infectados vía i.p. con 10 cisticercos de *T. crassiceps* y como controles positivos se utilizaron cerebros de ratones infectados con *Toxoplasma gondii*. a) Electroforesis en geles de Agarosa de los transcritos analizados. b) relación de la expresión relativa VCAM-1, ICAM-1 y TGF- $\beta$ /GAPDH. Los resultados obtenidos representan 3 cinéticas independientes n=3. Prueba *t* de student.  $P < 0.05$  Graph Pad Prism 5.

Los resultados obtenidos mostraron que no hubo influencia sobre ICAM-1 pero si sobre VCAM-1 al igual que TGF- $\beta$ . La expresión de VCAM-1 se dio en las semanas 5, 9 y 13; alcanzando la máxima expresión en la semana 9. La expresión del RNAm de TGF- $\beta$  se observó en las semanas 5 y 13. Es de llamar la atención que en la semana 9, cuando hubo mayor expresión de VCAM-1, el transcrito de TGF- $\beta$  no tuvo expresión. Por el contrario, cuando estuvo presente TGF- $\beta$  los niveles de expresión de VCAM-1 no fueron tan altos, esto se observó en la semana 5 y 13 (fig.11b). Esto podría sugerir que hay una regulación de TGF- $\beta$  sobre VCAM-1.

#### **6.5.1.- Asociación moléculas de adhesión y permeabilidad.**

Para demostrar si las moléculas de adhesión presentan una relación con la permeabilidad de la BBB se comparó la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y TGF- $\beta$  y la permeabilidad de la BBB. Se encontró que no hay correlación directa, solo en la semana 5 en la cual se presentó la mayor permeabilidad, lo anterior está probablemente asociado al primer pico de expresión de VCAM-1, sin embargo en la semana 7, a pesar de que no se presentaron las moléculas de adhesión ni de TGF- $\beta$  la permeabilidad de la BBB continuó siendo mayor que el grupo control, al aumentar la expresión de VCAM-1 la permeabilidad de la BBB comenzó a disminuir (figura 12).

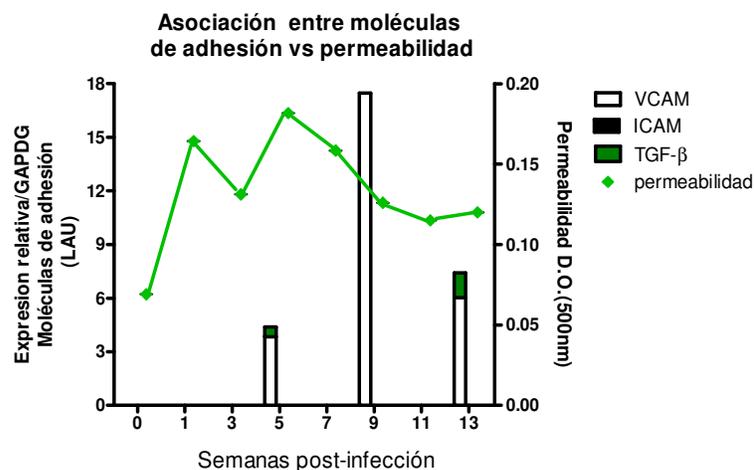


Figura 12. Asociación de la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y TGF- $\beta$  en cerebro y la (densidad óptica (permeabilidad de la BBB) de cerebros de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. los resultados obtenidos representan 2 cinéticas independientes.

### 6.5.2.- Asociación de la expresión de moléculas de adhesión (VCAM-1) y citocinas sistémicas.

Con la finalidad de establecer si existe alguna relación entre la expresión de las citocinas sistémicas generadas por la infección de *T. crassiceps* y la expresión en el SNC de VCAM-1 se trató de correlacionar en cinética de tiempo la expresión de la citocina pro-inflamatoria más representativa, la IFN- $\gamma$  y la anti-inflamatoria IL-4 con el patrón de expresión de VCAM-1 (fig 13a). No se encontró una asociación directa con ninguna de estas dos citocinas.

Esta misma asociación se trató de hacer con la expresión de las citocinas pro-inflamatorias MIF e IL-1 $\beta$  con la expresión de VCAM-1. Se observó que cuando los niveles de MIF e IL-1 $\beta$  estaban incrementados no se expresó la VCAM-1 (fig 13b). Se sabe que estas citocinas presentan una regulación negativa de VCAM sin embargo, aún falta por indagar más sobre esta aparente correlación.

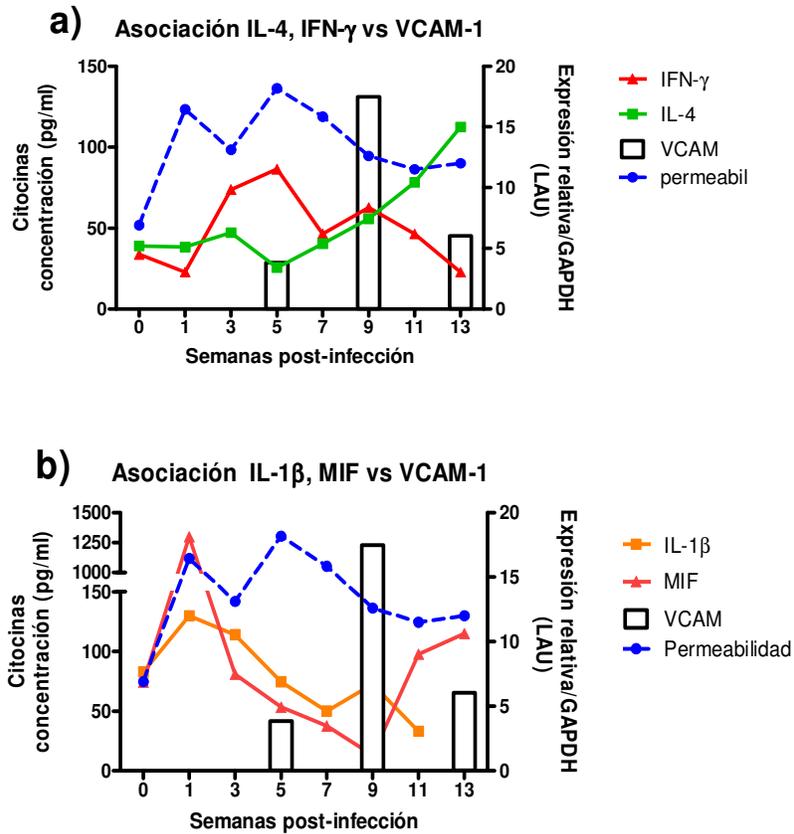


Fig. 13. Asociación de la expresión de VCAM-1 en cerebro y la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias séricas. La cinética de citocinas se representa en líneas continuas (pg/ml), la expresión de VCA-1 en barras (unidades relativas LAU). La permeabilidad está representada en la línea punteada y solo representa la tendencia de ésta.

## **7.- Discusión.**

La BBB es un tejido compuesto por células epiteliales especializadas que protegen al SNC de los cambios eventuales de un organismo. Dicho tejido presenta características muy peculiares que lo hace diferir de los demás epitelios como son la presencia de las uniones estrechas (TJs) [17, 21], debido a esto, el SNC se ha considerado un órgano inmunológicamente privilegiado. A pesar de ello, diversos estudios demuestran que el SNC presenta una vigilancia inmune donde participan muchos mediadores, los cuales se ha descrito que pueden influenciar sobre la permeabilidad de la BBB [1, 20, 22, 49].

Es muy variada la manera en la cual las citocinas provenientes del torrente sanguíneo pueden acceder y proveer información al SNC. Unos de los posibles mecanismos podría ser que actúan a nivel de los órganos circunventriculares, otro a nivel del nervio vagal y/o a través de los nervios aferentes, alterando así la permeabilidad de la BBB con lo cual permitiría a otras moléculas y células acceder al SNC y como consecuencia promover patologías o agravarlas [9, 12, 28].

Se conoce que el cerebro lesionado tiene cierta comunicación con los órganos periféricos a través del sistema nervioso autónomo, y muchas de las señales que son enviadas no sólo activan las células inmunes residentes en el cerebro, también las células inmunes en la periferia. Estas células inmunes migran hacia el sitio de la lesión y liberan citocinas, quimiocinas y otras moléculas, causando efectos perturbadores o protectores en el cerebro lesionado. Esta comunicación bidireccional que mantiene al cerebro lesionado y el sistema inmunitario periférico regulan la progresión de la patología, así como la reparación de los tejidos [50] Por lo tanto, la respuesta inmune periférica podrían alterar la permeabilidad de la BBB debido a esta comunicación.

En esta tesis los resultados muestran dos fases; la fase inflamatoria y la fase anti-inflamatoria característico de las infecciones por parásitos helmintos [31, 36]. La primera fase, que corresponde a las semanas 1, 3, 5 y 7, se caracterizó por la

producción de citocinas tipo Th1 (MIF, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , ) estas muestran un aumento hasta la semana 7 (véase fig. 5). Las citocinas con mayor relación fueron IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , y MIF. Previamente se ha reportado que las citocinas inflamatorias juegan un papel importante en la adhesión y tráfico de los leucocitos sobre los epitelios aumentando su permeabilidad [11, 12, 20, 24, 26-28]. Nosotros encontramos una relación “directa” entre esta fase aguda de inflamación con la permeabilidad, detectando un comportamiento similar en la cinética de producción de citocinas inflamatorias y el aumento en la permeabilidad de la BBB.

La segunda fase, semanas 9, 11 y 13 se caracterizó por el aumento de la citocina tipo Th2 (IL-4). En esta fase se pudo apreciar una disminución gradual en la permeabilidad de la BBB (véase fig.6).

Las citocinas que son moléculas de bajo peso molecular pueden presentar una producción exacerbada como respuesta al daño y a enfermedad, son mensajeros importantes del sistema inmune y afectan en muchos aspectos al SNC. Así, los resultados obtenidos en esta tesis podrían explicarse tomando en cuenta que se ha propuesto que las citocinas tienen un efecto dosis-dependiente en la función de la BBB, es decir, altas concentraciones de citocinas pueden hacer susceptibles a las Células Endoteliales Cerebrales (CEC) a apoptosis mediada por caspasas. Mientras que muy bajas concentraciones de citocinas promueven la disminución de la BBB por la inducción de alteraciones en la organización de los complejos de unión [51].

Por otro lado, el SNC presenta diversos receptores para las citocinas, particularmente se conoce la expresión de receptores a lo largo de todo el cerebro para la citocina IL-1 $\beta$ . También se sabe que las células residentes del SNC pueden sintetizar IL-1  $\beta$  y que esta molécula tiene un papel central sobre la activación de las moléculas de adhesión, así como una clara sinergia con las citocinas TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  en los procesos inflamatorios del SNC [11, 51, 52]. En algunas enfermedades como la SM la presencia de IL-1 $\beta$  se relaciona con la

actividad de la enfermedad, además esta citocinas también tiene relación con la edad y ciertamente tiene una fuerte influencia sobre las uniones estrechas participando activamente en su remodelación.

En línea con lo anterior, el IFN- $\gamma$ , otra citocina del perfil inflamatorio, también ha sido reconocida como una molécula con una gran influencia sobre el reacomodo de las uniones estrechas y sobre el citoesqueleto de las células epiteliales [53]. Se ha propuesto que el IFN- $\gamma$  tiene señalización interna, y como resultado aumenta la permeabilidad de la BBB e induce la apoptosis [11, 51]. Un dato interesante, en este trabajo de tesis es que el IFN- $\gamma$  tuvo una cinética de expresión similar al de la permeabilidad.

En las células epiteliales, el IFN- $\gamma$  presenta una redistribución en la expresión de las proteínas de las uniones estrechas, por ejemplo, en ratones se ha demostrado que inhibe la producción de ZO-1 y las claudinas, que son moléculas importantes de las uniones estrechas [51, 53]. En la SM la deficiencia en estas moléculas es causa de daño a la BBB y en consecuencia se da un aumento en la permeabilidad de la BBB. Además, el aumento del TNF $\alpha$  y del IFN- $\gamma$  se ha relacionado con el incremento de los efectores de las caspasas JNK y PKC, que inducen a su vez la muerte celular y por consiguiente la disfunción de la BBB [51, 53].

La IL-6 es otra citocina del perfil inflamatorio evaluada en esta tesis. Aunque en este trabajo no tuvo un impacto importante, se sabe que esta citocina puede estar involucrada en la apertura de las uniones estrechas [21]

El MIF, que es una citocina inflamatoria preformada, también tuvo poca influencia sobre la permeabilidad, aunque en ratones genéticamente deficientes para el MIF se reportó que su ausencia disminuye la infiltración de células infectadas con el WNV, con lo que se podría sugerir que esta citocina afecta la permeabilidad de la BBB, sin embargo, aún falta más por evaluar esta cuestión [30]

El perfil anti-inflamatorio observado después de la semana 7 post-infección con *T. crassiceps* estuvo asociado a la disminución de las citocinas inflamatorias y al incremento de la IL-4, y éste correlacionó con la disminución de la permeabilidad de la BBB. La IL-4 es una de las citocinas que se ha propuesto que está involucrada en el reclutamiento de poblaciones celulares encargadas de la reparación del tejido. Se ha observado que IL-4 tiene influencia sobre VCAM-1, por consiguiente podrían ayudar sobre la reparación del tejido dañado. Adicional a esto, la experimentación de IL-10 (citocina característica de las linfecciones por helmintos) sobre cultivos de células de los órganos circunventriculares inhiben la liberación de citocinas pro e inflamatorias como son la IL-6 y el TNF- $\alpha$  de las células epiteliales y por tanto inhibe la inflamación del SNC [54].

El SNC presenta barreras tanto químicas como físicas, la principal barrera física es la BBB, la cual se ve afectada en ciertas patologías. Cuando el SNC llega a presentar inflamación, ésta pierde sus propiedades de Barrera (diálogos entre el sistema inmune y el sistema nervioso). Las citocinas características de dicha inflamación corresponden a un perfil inflamatorio tipo Th1 (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), que son las responsables de regular el reclutamiento de las células inmunes dentro del cerebro aumentando la vigilancia inmunológica. La vigilancia inmunológica del SNC es modulada por moléculas de adhesión, citocinas y algunos receptores presentes en el epitelio de los capilares cerebrales [22]. Estas moléculas de adhesión, citocinas y receptores influyen directamente sobre la permeabilidad de la BBB y en el inicio de las patologías como son la SM y EAE. Estas patologías se han caracterizado por aumentar la expresión de moléculas de adhesión, entre ellas la VCAM-1 y la ICAM-1, por lo tanto, se ha sugerido que el aumento en las moléculas de adhesión puede significar el inicio de una encefalopatía o encefalitis [49]. En la experimentación se ha encontrado que la administración intraperitoneal de LPS y citocinas inflamatorias como el TNF $\alpha$  favorecen la expresión de citocinas periféricas que pueden influenciar directamente sobre la expresión de moléculas de adhesión en los diferentes órganos y el SNC [41].

En este trabajo la influencia de las citocinas (tanto inflamatorias como la IL-4 anti-inflamatoria) sobre la ICAM-1 no tuvo efecto; a este respecto se ha reportado que ciertas cepas de ratones son más susceptibles a presentar anomalías en el SNC. La cepa BALB/c está adecuada a un perfil de tipo Th2, por lo tanto la ICAM-1, que es positivamente regulada por las citocinas tipo Th1, presentó niveles muy bajos de expresión aun cuando hubo citocinas pro-inflamatorias incrementadas en la fase aguda de la infección. Esta condición Th2 de los ratones BALB/c ha explicado la resistencia de esta cepa para desarrollar la EAE [52].

Sin embargo, las citocinas del perfil Th1, como se ha mencionado, sí pueden influenciar sobre el citoesqueleto y sobre las uniones estrechas de las células epiteliales de la vasculatura cerebral y además pueden acceder al SNC por las diferentes vías pudiendo modificar la permeabilidad de la BBB [9, 12, 28, 51]. Por estas razones a pesar de que en la primera fase no se presentó la expresión de la ICAM-1 no significa que no haya un impacto sobre las células endoteliales que conforman la BBB.

La IL-4 tiene influencia en la regulación positiva de la VCAM-1; existe un reporte que menciona que la VCAM-1 podría ser el resultado del cambio de linfocitos Th1 y de macrófagos a linfocitos Th2 en el infiltrado leucocitario durante la EAE [52]. Por lo que no se descarta la posibilidad de que la VCAM-1 ayude en el reclutamiento de la células Th2 que pudieran estar involucradas en la reparación del tejido, debido a la disminución en la permeabilidad observada en la fase crónica de la infección por *T. crassiceps*. Se ha reportado que en el cerebro isquémico la reparación del tejido se favorece por la producción de factores angiogénicos tales como TGB- $\beta$ , además de la presencia de citocinas anti-inflamatorias tales como IL-4, IL-10 e IL-3 [51, 54]

Finalmente, en la infección crónica con *T. crassiceps* se ha comprobado que la severidad en la EAE se disminuye significativamente [55] lo que llevó a pensar que

la infección por este helminto puede contribuir a la reparación del tejido de la BBB como consecuencia del ambiente anti-inflamatorio generado por la infección crónica.

## 8. Conclusiones

El modelo murino de infección con cisticercos por *Taenia crassiceps* sí modifica la permeabilidad de la BBB. Esta modificación se establece en dos fases: La primera fase se caracterizó por el aumento de la permeabilidad en relación con las citocinas inflamatorias generadas en la fase aguda de la infección. La segunda fase se caracterizó por un restablecimiento de la resistencia a la permeabilidad relacionada con las citocinas anti-inflamatorias.

Las citocinas IL-1 $\beta$ , MIF e IFN- $\gamma$  están involucradas en el aumento de la permeabilidad de la BBB.

La citocina IL-4 está relacionada con la disminución de la permeabilidad de la BBB.

Los cerebros de los ratones BALB/c infectados no exhiben la producción de ICAM-1 pero si de VCAM-1.

Probablemente la expresión de VCAM-1 y TGF- $\beta$  en el cerebro están relacionados en la reparación del fenotipo de la BBB.

## 9. Referencias

1. Hickey, W.F., *Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system*. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 118-24.
2. Aloisi, F., F. Ria, and L. Adorini, *Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes*. *Immunol Today*, 2000. **21**(3): p. 141-7.
3. Edelman, G.M., *Neural Darwinism: selection and reentrant signaling in higher brain function*. *Neuron*, 1993. **10**(2): p. 115-25.
4. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. Updated, 2nd ed2006, Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders. ix, 324 p.
5. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. 2nd ed2004, Philadelphia, Pa.: Saunders. ix, 322 p.
6. Roitt, P.D.S.M.D.B.I., *Inmunología*. 11ª ed2008, Philadelphia, Pa.: Panamericana
7. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 7th ed2012, Philadelphia, Penn.: Elsevier Saunders. x, 545 p.
8. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* *Immunity*, 2009. **30**(5): p. 626-35.
9. Palmer, A.M., *The blood-brain barrier*. *Neurobiol Dis*, 2010. **37**(1): p. 1-2.
10. Chusid, J.G. and J.J. McDonald, *Correlative neuroanatomy & functional neurology*. 14th ed1970, Los Altos, Calif.: Lange Medical Publications. 453 p.
11. Cuenca-Lopez, M.D., et al., *[Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: cellular inflammatory response and inflammatory mediators]*. *Rev Neurol*, 2010. **50**(6): p. 349-59.
12. Hickey, W.F., *Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles*. *Semin Immunol*, 1999. **11**(2): p. 125-37.
13. Bitzer-Quintero, O.K. and I. Gonzalez-Burgos, *Immune system in the brain: a modulatory role on dendritic spine morphophysiology?* *Neural Plast*, 2012. **2012**: p. 348642.
14. Rojas W. M., A.J.M., Aristizabal B., Cano R. L.E., Gómez O., Lopera H., *Inmunología de rojas* 2007, MeDELLIN Colombia CIB.
15. !!! INVALID CITATION !!!
16. Abbott, N.J., *Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*. *J Anat*, 2002. **200**(6): p. 629-38.
17. Abbott, N.J., *Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability*. *Cell Mol Neurobiol*, 2000. **20**(2): p. 131-47.
18. Pachter, J.S., H.E. de Vries, and Z. Fabry, *The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003. **62**(6): p. 593-604.
19. Joly, J.S., et al., *Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs*. *Semin Cell Dev Biol*, 2007. **18**(4): p. 512-24.
20. de Vries, H.E., et al., *The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases*. *Pharmacol Rev*, 1997. **49**(2): p. 143-55.
21. Abbott, N.J., et al., *Structure and function of the blood-brain barrier*. *Neurobiol Dis*, 2010. **37**(1): p. 13-25.
22. Nag, S., *Pathophysiology of blood-brain barrier breakdown*. *Methods Mol Med*, 2003. **89**: p. 97-119.
23. Nag, S., *Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels*. *Methods Mol Med*, 2003. **89**: p. 3-36.

24. Rossi, B., et al., *Vascular inflammation in central nervous system diseases: adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(4): p. 539-56.
25. Hickey, W.F., B.L. Hsu, and H. Kimura, *T-lymphocyte entry into the central nervous system*. J Neurosci Res, 1991. **28**(2): p. 254-60.
26. Zlokovic, B.V., *The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders*. Neuron, 2008. **57**(2): p. 178-201.
27. Bilbo, S.D. and J.M. Schwarz, *The immune system and developmental programming of brain and behavior*. Front Neuroendocrinol, 2012. **33**(3): p. 267-86.
28. Banks, W.A., S.A. Farr, and J.E. Morley, *Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes*. Neuroimmunomodulation, 2002. **10**(6): p. 319-27.
29. Leng, L. and R. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S475-7.
30. Arjona, A., et al., *Abrogation of macrophage migration inhibitory factor decreases West Nile virus lethality by limiting viral neuroinvasion*. Journal of Clinical Investigation, 2007. **117**(10): p. 3059-3066.
31. Maizels, R.M. and M. Yazdanbakhsh, *Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 733-44.
32. McSorley, H.J., et al., *Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth Heligmosomoides polygyrus*. Eur J Immunol, 2012. **42**(10): p. 2667-82.
33. Omar O.Barriga *Zoonosis y Enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* 2003, Organizacion Panamerica de la Salud Whashintong p. 560.
34. Terrazas, L.I., et al., *Taenia crassiceps cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility*. Parasitol Res, 1999. **85**(12): p. 1025-31.
35. Waknine-Grinberg, J.H., et al., *Schistosoma mansoni infection reduces the incidence of murine cerebral malaria*. Malar J, 2010. **9**: p. 5.
36. Imirizaldu, L., et al., *[Neurocysticercosis. An emergent disease]*. An Sist Sanit Navar, 2004. **27**(2): p. 201-9.
37. Larralde, C., et al., *Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia solium*. Arch Pathol Lab Med, 1990. **114**(9): p. 926-8.
38. Sciotto, E., et al., *Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with T. solium antigens against experimental murine T. crassiceps cysticercosis*. Parasite Immunol, 1990. **12**(6): p. 687-96.
39. Terrazas, L.I., et al., *Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps)*. J Parasitol, 1998. **84**(1): p. 74-81.
40. Reyes, J.L., et al., *Early removal of alternatively activated macrophages leads to Taenia crassiceps cysticercosis clearance in vivo*. Int J Parasitol, 2010. **40**(6): p. 731-42.
41. Henninger, D.D., et al., *Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse*. Journal of Immunology, 1997. **158**(4): p. 1825-32.
42. Wong, D., K. Dorovini-Zis, and S.R. Vincent, *Cytokines, nitric oxide, and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier*. Exp Neurol, 2004. **190**(2): p. 446-55.
43. Paul, R., et al., *Lack of IL-6 augments inflammatory response but decreases vascular permeability in bacterial meningitis*. Brain, 2003. **126**(Pt 8): p. 1873-82.

44. Bueno, E.C., et al., *Cellular immune response of patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases)*. Acta Trop, 2004. **91**(2): p. 205-13.
45. Silva, N.M., et al., *Toxoplasma gondii: the severity of toxoplasmic encephalitis in C57BL/6 mice is associated with increased ALCAM and VCAM-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability*. Exp Parasitol, 2010. **126**(2): p. 167-77.
46. Renshaw, M., et al., *Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4697-701.
47. Lindsey, J.W. and L. Steinman, *Competitive PCR quantification of CD4, CD8, ICAM-1, VCAM-1, and MHC class II mRNA in the central nervous system during development and resolution of experimental allergic encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 1993. **48**(2): p. 227-34.
48. Okamura, M., et al., *Analysis of gene expression profiles of forestomach tumors in rasH2 mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea*. Arch Toxicol, 2004. **78**(12): p. 688-96.
49. Dopp, J.M., S.M. Breneman, and J.A. Olschowka, *Expression of ICAM-1, VCAM-1, L-selectin, and leukosialin in the mouse central nervous system during the induction and remission stages of experimental allergic encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 1994. **54**(1-2): p. 129-44.
50. An, C., et al., *Molecular dialogs between the ischemic brain and the peripheral immune system: Dualistic roles in injury and repair*. Prog Neurobiol, 2013.
51. Lopez-Ramirez, M.A., et al., *Role of caspases in cytokine-induced barrier breakdown in human brain endothelial cells*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 3130-9.
52. Anthony, D.C., et al., *Age-related effects of interleukin-1 beta on polymorphonuclear neutrophil-dependent increases in blood-brain barrier permeability in rats*. Brain, 1997. **120 ( Pt 3)**: p. 435-44.
53. Wolburg, H. and A. Lippoldt, *Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation*. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(6): p. 323-37.
54. Harden, L.M., et al., *Critical role for peripherally-derived interleukin-10 in mediating the thermoregulatory manifestations of fever and hypothermia in severe forms of lipopolysaccharide-induced inflammation*. Pflugers Arch, 2013.
55. Reyes, J.L., et al., *Taenia crassiceps infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cell Immunol, 2011. **267**(2): p. 77-87.

## Apéndice

### Reactivos y soluciones

Buffer de Fosfatos(PBS) para 10 Litros. A un pH 7.4

80 gr. NaCl (J.T. Baker)

11.6 gr Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T Baker)

2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (J.T.Barker)

2 gr KCL (J.T. Barker.)

Azul de Evans al 1%

Por cada 10 ml de solución salina se coloca 0.1 g de azul de Evans (Hycel de México)

Paraformaldehido al 4%

Agregar 50gr paraformaldehido en 1000 ml de agua destilada y mantener en agitacion y calendar hasta llegar a una temperature de 60°C al haber alcanzado esta temperature adicionar una gota de NaOH al 1M acuosi hasta que se disuelva.

Solucion de lavado (ELISA)

1000 ml de PBS más 0.4% de Tween (SIGMA.)

Solucion de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS mas 1% de albumina serica bovina (.USBiological)

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg. de ABTS, en 5 L. de acido citrico (tecsiquim al 0.1 M en Agua destilada y con NaOH (REASOL) llevar a pH 4.53 realizar alicuotas de 11ml. en tubos y mantener en congelacion a -70 °C hasta su uso.

Bromuro de Etidio

Stock 1000x solución 0.5 mg/ml

50 mg de Bromuro de etidio en 100 ml de agua, Diluir 1:1000 para teñir geles y proteger de la luz