



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA RESPUESTA  
INMUNE INNATA EN LA CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL  
MURINA CAUSADA POR *Taenia crassiceps*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**Biol. Gabriela Meneses Ruiz**

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Gladis del Carmen Fragoso González



MÉXICO, D. F.

OCTUBRE DE 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se realizó en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité que evaluó el desarrollo de la tesis estuvo integrado por:

Tutor: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González

Comité tutorial: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Dra. Becker Fauser Ingeborg

El jurado asignado para examinar este trabajo y la presentación del examen de grado fue integrado por:

Presidente: Dra. Kaethe Willms Manning

Vocal: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Vocal: Dr. Fernando Roger Esquivel Guadarrama

Vocal: Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García

Secretario: Dr. Abraham Landa Piedra

Durante el desarrollo del proyecto la autora contó con beca de CONACYT No. de registro 181542.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de ser parte de ella, por todo lo que mi vida ha cambiado desde que me abrió sus puertas, a mi querido segundo hogar GRACIAS!!!

A la Dra. Gladis del Carmen Fragoso, por su tutoría y tiempo para la realización de este proyecto.

A la Dra. Edda Lydia Sciutto, gracias por creer en mí, por estar siempre y motivarte a entrar, continuar y terminar con este proyecto que sin su apoyo y persistencia no hubiera sido posible realizar.

A la Dra. Ingeborg Becker, por su apoyo incondicional y tiempo para discutir y avanzar a cada paso de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de trabajo durante todo este tiempo, gracias.

Al personal académico y administrativo del Instituto, por todo su apoyo.

A la Dra. Miriam Berzumza, Adriana Ruiz, Edith, gracias por su apoyo y colaboración incondicional.

Al personal del bioterio: Gerardo, Gina, Doña Jose, Jorge, Fernando, por todo su apoyo y colaboración para este trabajo.

A mis padres, por todo su amor, consejos, porque gracias a su amor y apoyo, mi vida es lo que es.....

A mis hermanos por su cariño y apoyo, los amo!!, A Martha y Dulce por estar siempre a mi lado, por ser mis compañeras y cómplices de la vida, por todos esos momentos de reír y llorar juntas.

A mi gran familia gracias por su apoyo y cariño.

A la familia May Enríquez, gracias por ser mi familia. Reny y Gun gracias por todo el apoyo y cariño.....

A Carlos May, por sorprenderme día a día y ser mi compañero en la vida, por creer en mí y siempre apoyarme, TE AMO!!

A mi hijo Lucas, por ese gran ejemplo de fortaleza y lucha, por ser el sol de cada mañana, por todo ese tiempo que no estoy a tu lado como yo quisiera... TE AMO.

A ese nuevo ser..., por todo lo que viene a partir de ahora ....

## ÍNDICE

1. RESUMEN . . . . .	1
2. ABREVIATURAS . . . . .	5
3. I NTRODUCCIÓN	
Factores implicados al establecimiento de la infección	
Factores del hospedero:	
Factores genéticos . . . . .	4
Factores inmunológicos . . . . .	8
Factores Sexuales . . . . .	12
Factores del parásito . . . . .	13
Taenia crassiceps . . . . .	14
Biología . . . . .	14
Cisticercos experimental murina . . . . .	16
Estrategias del parásito . . . . .	18
4. A NTECEDENTES	
Cisticercosis experimental murina causada por <i>Taenia crassiceps</i>	
Respuesta inmune . . . . .	19
Factores biológicos relevantes en mediar las diferencias de permisividad a la cisticercosis	

Factores genéticos	.....	. . .	21
Factores sexuales	.....	. . .	23
Factores inmunológicos	. . . . .	... 24	
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	. . . . .	. . .	29
6. HIPÓTESIS	. . . . .	. . .	26
7. OBJETIVOS	. . . . .	. . .	27
8. MATERIALES Y MÉTODOS	. . . . .	... 28	
9. RESULTADOS	. . . . .	. . .	40
10. DISCUSIONES	.....	. . .	83
11. CONCLUSIONES	.....	. . .	98
12. PERSPECTIVAS	. . . . .	. . .	100
13. APÉNDICE I .- Respuesta neuroinmunoendócrina	. . . . .	. . .	101
14. REFERENCIAS	.....	. . .	105
15. ARTÍCULOS PUBLICADOS	. . . . .	. . .	117

## 1. RESUMEN

En la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* se han identificado diferencias en la permisividad a la instalación y reproducción del parásito. Factores biológicos del hospedero como el sexo, el fondo genético y la respuesta inmunológica tienen un papel relevante en la mediación de dichas diferencias; la combinación de los huéspedes hembras y la cepa BALB/cAnN constituye la condición más permisiva, mientras que la combinación de machos con la cepa C57BL/6J es la condición más restrictiva. En este trabajo se estudió la respuesta inmune temprana entre ratones permisivos (BALB/cAnN) y restrictivos (BALB/cJ y C57BL/6J) a la infección. En el estudio entre sublíneas de BALB/c: BALB/cAnN (permisiva) y BALB/cJ (restrictiva) encontramos al día cinco de infección un incremento de células NK (12.4% vs. 3.2%) y macrófagos peritoneales (16.4% vs. 3.5%) en BALB/cJ con respecto a la sublínea BALB/cAnN, relacionados con la restrictividad a la instalación del parásito.

En cuanto al estudio entre BALB/cAnN y C576BL/6J (restrictiva), se evaluó además el efecto del género. Encontramos que ambos sexos de la cepa permisiva desarrollan una mayor respuesta en los tiempos estudiados; dicha respuesta está dada al día 5 por células NK (hembras 21% vs. 8%, machos 46% vs. 9%), IKDCs (hembras 11% vs. 0.1%, machos 13% vs. 0.3%) y solo en hembras un incremento de IFN $\gamma$  (215pg/ml vs. 8pg/ml), así como un mayor número de cisticercos vesiculares con la capacidad de crecer y reproducirse, mientras que en la cepa restrictiva se encontró al día 3, un incremento en ambos sexos de células NKTs (hembras 3% vs. 0.1%, machos 7% vs. 0.7) y de IL-12, solo en machos al día 5 de infección (615pg/ml vs. 216pg/ml), junto con cisticercos en su mayoría coloidales y sin capacidad de crecer ni reproducirse: estos parásitos en su mayoría mueren. En cuanto a la relevancia de los factores sexuales, encontramos en la cepa BALB/cAnN un incremento al día 5 de infección en machos de células NK (46% vs. 21%) totales comparación de las hembras, y de IFN $\gamma$  (215pg/ml vs. 35pg/ml) a favor de las hembras, mientras que en la cepa restrictiva hay un incremento al día 3, de células NTKs (7.4% vs. 3.2%) e IL-12 al día 5 (615pg/ml vs. 197pg/ml) en los machos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la relevancia de la respuesta innata en mediar las diferencias de permisividad a la cisticercosis; al parecer, el incremento de dicha respuesta facilita la instalación y la reproducción del parásito.

## 2. ABREVIATURAS

Células NK: Células naturalmente asesinas.

IKDCs: Células dendríticas asesinas.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PRRs: Receptores de reconocimiento de patógenos.

TLRs: Receptores tipo Toll.

C-TL: Receptores tipo lectina.

NLR: Receptores intracelulares tipo NOD.

LPS: Lipopolisacárido.

LTA: Ácidos lipoteicoicos.

DCs: Células dendríticas.

Células NKT: Células naturales asesinas T.

SEA: Antígeno soluble de huevo de esquistosoma.

CD2: Células dendríticas con maduración programada.

iNKT: Células asesinas naturales invariantes.

EGF: Factor de crecimiento epidermal.

BMPS: Promotores morfogénicos óseos.

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta.

ON: Óxido nítrico.

PGE2: Prostaglandina.

E2: Estradiol.

P4: Progesterona.

T4: Testosterona.

DTH: Dihidrotestosterona.

CPA: Células presentadoras de antígeno.

SSI: Solución salina isotónica.

H-E: Hematoxilina-Eosina.

PBS: Amortiguador de fosfatos.

PBS\*: Amortiguador de fosfatos con suero fetal bovino y azida de sodio.

BSA: Albúmina de suero bovino.

ITS: Espaciador transcrito interno.

IIB: Instituto de Investigaciones Biomédicas.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### Factores implicados en el establecimiento de la infección

De manera natural, los organismos estamos en contacto con el ambiente y recibimos diferentes estímulos ambientales y retos patogénicos que constantemente ponen a prueba la adaptación del organismo a la vida. Durante el desafío a los retos patogénicos, no todos los individuos que comparten un nicho ecológico se enferman o infectan del mismo patógeno.

La infección está determinada por características del hospedero tales como el fondo genético, los factores inmunológicos y el sexo, factores del parásito y de exposición; la interacción de éstos determina la susceptibilidad de cada individuo.

#### Factores del hospedero

##### Factores genéticos

El fondo genético tiene un papel primordial en la susceptibilidad a diferentes patógenos, mediando de manera importante las diferencias de susceptibilidad a distintas enfermedades.

Variaciones en el fondo genético pueden modificar notablemente la susceptibilidad de un individuo a una infección o condición patológica.

Los ratones BALB/c son un claro ejemplo de esto. Esta cepa de ratones fue mantenida por Halser J. Bagg en 1913 en New York; la colonia fue

sistemáticamente mantenida por cruzas entre hermanos por 15 años, tiempo en el que paso por varios investigadores Little and Mac Dewell en Washington y Muller en la Universidad de Texas, así como por diversas compañías, que las han distribuido a diversos grupos de investigación (Figura 1).

### Historia de BALB/cAnN y BALB/cJ

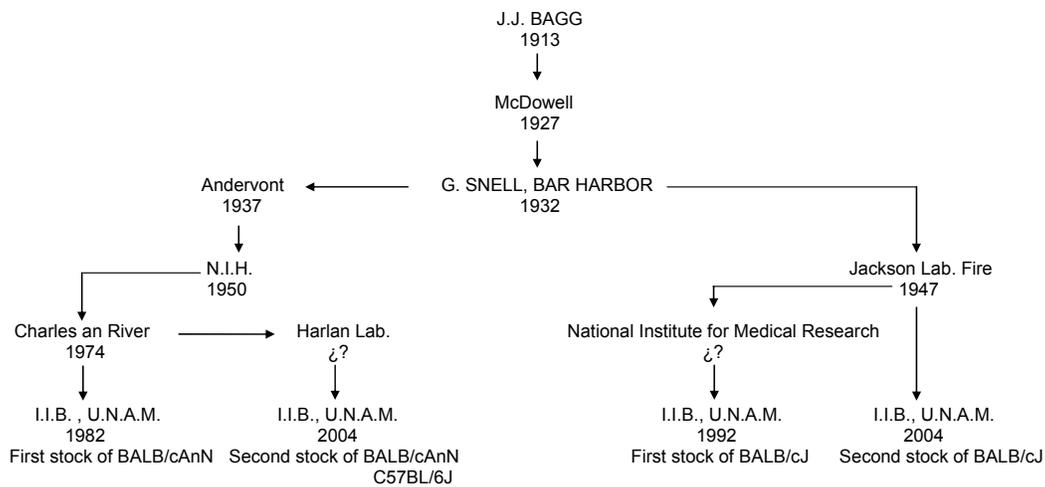


Figura 1.- Historia del origen del primer y segundo stock de ratones BALB/cAnN y BALB/cJ del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Esta figura es adaptación del original descrito por Bailey (1978), de los laboratorios Jackson.

Como consecuencia de la separación de la cepa BALB/c en distintos ambientes de mantenimiento y reproducción, actualmente se han derivado diversas sublíneas de BALB/c: BALB/cAnN, BALB/cJ, BALB/cBy, BALB/cGaJ, BALB/cGrRKJ, BALB/cWtEiJ, BALB/cAnNCrt, y se han reportado diferencias genéticas, algunas de las cuales se han asociado con distintas susceptibilidades a infecciones y crecimiento de tumores (Potter, 1985).

Entre las diferencias fenotípicas de estas sublíneas destacan las encontradas entre BALB/cAnN y BALB/cJ, como se ilustra en la Tabla 1.

Claramente se aprecia que las cepas han tenido modificaciones que repercuten en la susceptibilidad o resistencia a infecciones.

Las diferencias de susceptibilidad o resistencia son también muy evidentes cuando se comparan cepas de ratones con distinto fondo genético, como se observa entre BALB/cAnN y C57BL/6J (Tabla 1).

Tabla 1.- Diferencias reportadas entre sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ, y entre BALB/c y C57BL/6J

Diferencias entre cepas		
BALB/cAnN y BALB/cJ		
Descripción		Referencia
BALB/cJ	Cambios en los niveles de enzimas para la síntesis de catecolaminas	Ciaranello et al., 1974
BALB/cAnN	Alta susceptibilidad al desarrollo de plasmocitomas	Potter and Wax, 1981
BALB/cJ	Incremento en los niveles de $\alpha$ -fetoproteína	Pollarf et al., 1982
BALB/cAnN	Pérdida de expresión de la proteína Qa-2	Mellor et al., 1985
BLAB/cJ	Reducción en el número de copias del gen Mup-1.5	Shi et al., 1989
BALB/cJ	Restriictiva a la cisticercosis causada por <i>Taenia crassiceps</i>	Fragoso et al., 1998)
BALB/cAnN	Feminización en machos inducida por la infección del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	Larralde et al., 1995; Aldridge et al., 2007

## BALB/c y C57BL/6J

---

Descripción		Referencia
C57BL/6J	Resistente a <i>Leishmania major</i> , respuesta Th1	Sacks and Noben-Trauth 2002
BALB/c	Resistencia a la toxoplasmosis	Fux et al., 2003
C57BL/6J	Resistente a <i>Litomosoides sigmodantis</i>	Le Goff et al., 2002
BALB/c	Resistencia a <i>Tripanosoma cruzi</i>	Roggero et al., 2002

### Factores inmunológicos

La respuesta inmune a través de la respuesta natural (innata), así como la adquirida (adaptativa), resguardan la salud del organismo de invasiones de patógenos y daños a los tejidos, actuando por acción de las células inmunes y sus componentes.

La respuesta innata es la primera línea de defensa y responde inmediatamente después del primer contacto con el patógeno. Esta respuesta se activa a través del reconocimiento de lo propio y lo ajeno, tras el reconocimiento de estructuras moleculares conservadas producidas por patógenos (Janeway et al., 1989), denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), y son éstos los que activan la respuesta innata. Los receptores responsables de este reconocimiento son los denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tales como los receptores tipo Toll (TLRs), los receptores tipo lectina-C (C-TL) y los receptores intracelulares tipo NOD (NLR) (Janeway et al.,

1992; Medzhitov, 2000). Entre los PAMPs más estudiados están los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas, los ácidos lipoteicoicos (LTA) de bacterias grampositivas, los peptidoglicanos, las dobles cadenas de RNA producidas por virus durante el ciclo de infección, etc.

Estas moléculas son productos del metabolismo de los agentes infecciosos, no del hospedero, y su reconocimiento indica al sistema inmune innato la presencia de una infección.

Durante la respuesta inmune innata, las células que participan en los procesos tempranos de la infección, como los macrófagos, neutrófilos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, las células dendríticas (DCs), células asesinas (NK), células asesinas T (NKT), células dendríticas asesinas (IKDCs) y células endoteliales, están especializadas para funcionar en diferentes estados de la infección y para interactuar entre sí.

El tipo de activación que reciben las células a través de los diferentes receptores es crucial para la respuesta que desarrollarán, y está dada principalmente por la naturaleza del patógeno. Los macrófagos y las CDs son claros ejemplos de la relevancia en el tipo de activación, ya que de ésta dependerá el desarrollo de una adecuada respuesta adaptativa (Janeway, 1992).

La respuesta inmune innata posee una gran variedad de efectos antimicrobianos que difieren en la inducción, el sitio de expresión, los mecanismos de acción y la actividad contra diferentes clases de patógenos.

Tras el reconocimiento de la infección, se induce de manera importante la producción y secreción de citocinas pro-inflamatorias (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1,

IL-6, IL-8, IL12, IL-15, IL-18 así como de algunas quimiocinas que disparan la activación endotelial y el reclutamiento de células inflamatorias, sobrerregulando la respuesta inflamatoria. Estos eventos, inducen la activación y maduración de macrófagos y células dendríticas para promover la presentación de antígenos (Hoebe et al., 2003).

El reconocimiento de los agentes infecciosos genera tres tipos de señales que controlan la activación de la inmunidad adaptativa (Janeway and Medzhitov, 1998). Primero, el reconocimiento del agente infeccioso inicia una respuesta inflamatoria local, el segundo, el reconocimiento de PAMPs por los PRRs expresados en CDs, incrementa la expresión de moléculas MHC-II e induce su maduración y expresión de moléculas coestimuladoras (CD80-CD86). Y finalmente la activación de la inmunidad innata dispara la inducción de citocinas efectoras que críticamente controlan el tipo de respuesta efectora montada por el sistema inmune adaptativo.

El reconocimiento de patógenos por TLRs suele resultar en la activación celular dada por la producción de citocinas proinflamatorias, y en el caso de CDs, además se incrementa la expresión de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40, así como de moléculas MHC-I y II, llevándolas a su maduración; sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos PAMPs de helmintos pueden provocar un estado inmaduro; tal es el caso del antígeno soluble de huevo de esquistosoma (SEA), que a través de TLR4 expresado en CDs lleva a las células a un estado inmaduro con bajos niveles en la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas proinflamatorias (MacDonald and Maizels, 2008). Estas células pueden promover una fuerte respuesta tipo Th2 cuando son activadas después vía TLR, ocasionando un estado de

“maduración programada “DC2” (Kane et al., 2004) e inhibiendo la producción de IL-12 (Goodridge et al., 2005).

En infecciones parasitarias por helmintos, la respuesta inmune protectora está dada por una respuesta tipo Th2, por lo que el reconocimiento y el tipo de activación de las células innatas es crucial para su desarrollo (Finkelman et al., 2004).

La participación de otros componentes de la respuesta inmune innata, como células y citocinas proinflamatorias, se ha descrito en el control de otras parasitosis. Tal es el caso de las células asesinas naturales invariantes (iNKT) durante la infección bacterial con *Listeria monocytogenes*, las cuales producen grandes cantidades de IFN $\gamma$  que conlleva al desarrollo de una respuesta adaptativa tipo Th1, eficiente para el control de patógenos intracelulares (Emoto et al., 2009).

Adicionalmente, se ha encontrado que en el modelo experimental de infección por *Burkholderia pseudomallei* se induce en ratones BALB/c (susceptibles), una mayor producción de IFN $\gamma$  por células NK, ocasionando la muerte del hospedero, mientras que en ratones C57BL/6J (resistentes) la producción de IFN $\gamma$  es menor y la respuesta inflamatoria es regulada (Ghee y Yunn-Hwen, 2006); esto muestra que también en un proceso inflamatorio exacerbado la propia respuesta inflamatoria puede provocar la muerte del hospedero, más que la infección.

Por lo tanto, un balance entre una respuesta inmune innata y su control determinará la resolución de un proceso infeccioso o su evolución a un proceso patológico crónico. La participación de la respuesta inmune innata en el

proceso de infección es determinante, ya que no sólo depende de ella evitar la instalación del patógeno, sino además, en caso de no poder contener dicha instalación, la respuesta innata es responsable de dar las condiciones microambientales y de activación celular adecuadas para el desarrollo de una adecuada respuesta inmune adaptativa de acuerdo con el desafío patogénico presente.

Al igual que el sistema inmune, el sistema nervioso está adaptado para responder rápidamente a los cambios que comprometen la salud (Borghetti et al., 2009). La comunicación entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune ocurre por vías bidireccionales, como se ilustra en el apéndice I (Nagy y Berczi, 1978; Besedovsky et al., 1981; Berci et al., 1998).

#### Factores sexuales

Con respecto a la participación de los factores sexuales, se ha reportado que pueden modular la respuesta inmune del hospedero (Shuurs and Verheul, 1990).

En el caso de *Trypanosoma cruzi*, se ha reportado que los estrógenos y su influencia sobre la respuesta inmune incrementan la resistencia del hospedero en ratones resistentes (Alexander and Mckean, 1996). Recientemente, Roggero (2009) reporta que el incremento de corticosterona durante la infección con *T. cruzi*, impide la producción excesiva de citocinas proinflamatorias, protegiendo al hospedero de una respuesta inflamatoria exacerbada en ratones BALB/c (resistentes), comparado con los ratones

C57BL/6J (susceptibles), efecto que se da a través de la activación del eje hipófisis-pituitaria-adrenal (HPA) en ratones BALB/c.

La comunicación bidireccional del sistema inmune y el sistema neuroendócrino puede tener un papel relevante en el metabolismo, la producción y el mantenimiento de la homeostasis, así como en la eficiencia de la respuesta inmune en contra de agentes infecciosos (Berci et al., 1998; 2001).

En este sentido, el estudio integral de la respuesta neuroinmunoendócrina en los modelos experimentales permitirá tener un mejor panorama del desarrollo de las respuestas hacia los diferentes estímulos estudiados.

#### Factores del parásito

Por otra parte, algunos factores del parásito también participan en la evolución del proceso infeccioso; entre éstos está la intensidad del contacto, su capacidad de infectar (la cual puede ser modificada por alteraciones en el DNA), la patogenicidad, virulencia, variabilidad y viabilidad.

Un claro ejemplo de la variabilidad del parásito es el observado en *Plasmodium*, causante de la malaria o paludismo, de este parásito del cual se conocen más de 175 especies; al menos diez de ellas infectan al hombre y cuatro provocan la enfermedad: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*, (Chavatte et al., 2007); de éstas *P. falciparum* es la más virulenta y la que produce la mayor mortalidad (Jiang et al., 1972), mientras que *P. vivax multinucleatum* presenta manifestaciones graves y a veces mortales en varias regiones de China Central y muestra diferencias morfológicas importantes con

*P. vivax* común. Otras especies de *Plasmodium* infectan a otros animales, incluyendo aves, reptiles y roedores.

En el caso de *Taenia crassiceps*, no ha sido evaluada hasta ahora su variabilidad, pero con excepción de la cepa ORF no se espera encontrar cambios.

### Taenia crassiceps

El metacéstodo de *Taenia crassiceps* se ha utilizado durante varios años en la cisticercosis experimental murina.

#### Biología

*Taenia crassiceps* (Zeder, 1800; Rudolphi en 1820), es un céstodo con ciclo de vida indirecto que durante su estado adulto o tenia infecta comúnmente a familias de animales que habitan en la zona norte del hemisferio, como *Vulpes*, *Alopex*, *Canis*, *Mustela*, *Felis*, *Putorius* y experimentalmente a perros, jerbos y hámsteres (Willms et al., 2010).

La tenia se aloja en el intestino del cánido, y una vez madura produce y libera miles de huevos al medio a través de las heces. Los huevos son ingeridos de manera accidental por roedores, los hospederos intermediarios, en donde se desarrollarán a cisticercos (*Cysticercus longicollis*), alojándose en diferentes cavidades del roedor (Rudolphi, 1819).

En infecciones experimentales realizadas con huevos a roedores de laboratorio, se ha encontrado que el cisticerco puede alojarse en diferentes partes del cuerpo (cuello, 22.1%.; extremidades, 16.1%.; axila, 13.5%.; cráneo, 10.8%.; abdomen, 10.2%.; espalda, 7.5%.; pecho, 7%.; cavidad peritoneal, 5.4%.; cerebro, 3.2%.; espacio subcutáneo, 2.1%.; cavidad pleural, 1.6%.; cuerpo adiposo del ojo, 0.5%) (Freeman, 1962; Del Valle, 1989).

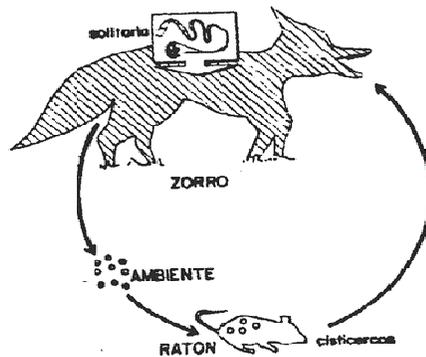


Figura 2.- Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

Taxonomía

Taenia crassiceps

Zeder (1800)

**Reino:** Animalia

**Clase:** Cestoda

**Orden:** Cylophyllidea

**Familia:** Taeniidae

**Género:** *Taenia*

**Especie:** *Taenia crassiceps*

Cisticercosis experimental murina

Studer y Baer reportaron en 1949 que el metacéstodo podría ser mantenido por inoculación intraperitoneal en ratones.

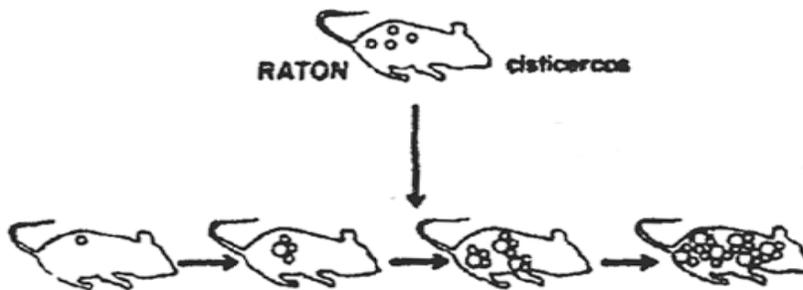


Figura 3.- Los cisticercos inoculados en la cavidad peritoneal tiene la capacidad de reproducirse de manera asexual, por gemación.

En 1962, Freeman aisló de un zorro la cepa de *Taenia crassiceps* llamada ORF; inicialmente se realizaban los pases manteniendo el ciclo completo, entre cánidos como hospederos definitivos y entre ratones de laboratorio como hospederos intermediarios. Después el parásito fue mantenido por pases intraperitoneales seriales de ratón a ratón. En 1962, Freeman reportó que ya no era posible el establecimiento del cisticerco ORF en el hospedero definitivo, por lo que solo sería posible su mantenimiento por pases entre ratones.

En 1965, en Michigan, fue aislada de ratón (*Microtus pennsylvanicus*), una nueva cepa de *Taenia crassiceps*, llamada KBS. Desde entonces, ambas cepas, ORF y KBS, fueron mantenidas en ratones de laboratorio por inoculación intraperitoneal.

En este periodo se reportaron diferencias morfológicas y del potencial de reproducción significativas entre estas dos cepas. Dorais reportó en 1969 que la cepa ORF tiene mayor tasa reproductiva que la KBS, y Freeman reportó en 1965 que la cepa ORF presenta forma irregular en los ganchos del róstelo, y aunque el escólex se desarrolla frecuentemente en los cisticercos ORF, no es una estructura normal, ya que no se desarrolla completamente y presenta anomalías en los ganchos. Estas anomalías en la cepa ORF pudieran ser promovidas por la selección artificial forzada, basada en el método empleado para su inoculación serial, como lo señaló Smith en 1972.

Así, la cepa ORF modificó su método de reproducción sexual/asexual por uno exclusivamente asexual.

También se han encontrado diferencias antigénicas entre las cepas ORF y KBS (Fox, Kuhn y Esch, 1971). Estas diferencias podrían deberse a la modificación

generada durante el proceso de la producción del escólex, en la cual los ganchos presentan modificaciones y el róstelo no es funcional en la cepa ORF, resultando en algún cambio en la síntesis de proteínas.

Se ha propuesto que estas diferencias pudieran estar directa o indirectamente relacionadas con la ausencia de un par de cromosomas homólogos (representados por el par número II de la cepa KBS) en ORF (Kuhn, 1971).

Se han aislado otras cepas de *Taenia crassiceps*: HYG, Toi, WFU (Norteamérica), COLA y GIKS (Alemania); excluyendo a la cepa mutante ORF, no se conocen diferencias entre las otras cepas (Willms et al., 2010).

En cuanto a las diferentes cepas y su grado de virulencia, no se ha evaluado por completo; en este sentido, la mayoría de los estudios se han realizado con la cepa ORF, y Everhart reportó en 2004 que la cepa de ratones BALB/cJ es altamente permisiva a los cisticercos de la cepa WFU. Sin embargo, aún está pendiente la evaluación de la virulencia de las cepas de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

#### Estrategias del parásito

Existen evidencias de moléculas del hospedero que son capaces de señalar a segundos mensajeros del parásito; entre estas moléculas se encuentra el factor de crecimiento epidermal (EGF), que pertenece a la familia de los promotores morfogénicos óseos (BMPS) y es reconocido por *Toxoplasma gondii* (Meissner et al., 2002), *Plasmodium falciparum* (Marshall et al., 1997) y *Schistosoma*

*mansoni* (Remoue et al., 2002); se sabe que los patógenos lo utilizan para su diferenciación celular, crecimiento y proliferación (Dissous et al., 2006).

Otro miembro de la familia BMPs es el TGF $\beta$ , que es secretado por casi todas las células inmunes, principalmente linfocitos, macrófagos, células endoteliales y plaquetas.

El TGF $\beta$  está involucrado en el control del crecimiento, la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular.

Se ha reportado que inhibe el crecimiento en células epiteliales, mientras que en las células mesenquimatosas su función depende del entorno: es un agente fibrogénico importante, incrementa la expresión de colágeno y puede tener una fuerte acción antiinflamatoria.

#### 4. ANTECEDENTES

Cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*

Respuesta inmune

El mantenimiento del metacéstodo de *Taenia crassiceps* en ratones de laboratorio ha permitido el estudio de la respuesta inmune en la relación hospedero-parásito por muchos grupos de investigación.

En este sentido, se ha reportado que durante las tres primeras semanas se presenta una respuesta Th1 que es restrictiva al crecimiento del parásito, con

## 5. Planteamiento del problema

En la cisticercosis experimental murina se han encontrado claras diferencias de permisividad entre cepas y sexos. Si bien se ha avanzado en el estudio de la respuesta inmune inducida por la infección, poco se ha ahondado en caracterizar la respuesta inmune innata y adaptativa que media las diferencias de restrictividad/permisividad a la instalación y reproducción del parásito entre cepas de distinto fondo genético y entre sexos. Debe considerarse que la respuesta innata que se establezca en el primer contacto entre el hospedero y el parásito es fundamental para determinar el curso de la infección, así como la evolución de la respuesta inmune adaptativa. En este trabajo de tesis se estudiará la participación de la respuesta innata en mediar dichas diferencias de permisividad/restrictividad a la infección. También se evaluará si existe una relación entre la respuesta innata y el perfil hormonal sexual que participe en la restrictividad/permisividad a la infección entre hembras y machos de la misma cepa y de cepas diferentes.

## 6. HIPÓTESIS

La permisividad en el establecimiento y desarrollo de la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* depende de diferencias en la respuesta innata entre las cepas permisivas y no permisivas, así como su interacción con las diferencias dadas por el género, que modifican la respuesta innata.

*mansoni* (Remoue et al., 2002); se sabe que los patógenos lo utilizan para su diferenciación celular, crecimiento y proliferación (Dissous et al., 2006).

Otro miembro de la familia BMPs es el TGF $\beta$ , que es secretado por casi todas las células inmunes, principalmente linfocitos, macrófagos, células endoteliales y plaquetas.

El TGF $\beta$  está involucrado en el control del crecimiento, la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular.

Se ha reportado que inhibe el crecimiento en células epiteliales, mientras que en las células mesenquimatosas su función depende del entorno: es un agente fibrogénico importante, incrementa la expresión de colágeno y puede tener una fuerte acción antiinflamatoria.

#### 4. ANTECEDENTES

Cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*

Respuesta inmune

El mantenimiento del metacéstodo de *Taenia crassiceps* en ratones de laboratorio ha permitido el estudio de la respuesta inmune en la relación hospedero-parásito por muchos grupos de investigación.

En este sentido, se ha reportado que durante las tres primeras semanas se presenta una respuesta Th1 que es restrictiva al crecimiento del parásito, con

altos niveles de IFN $\gamma$  (Toenjes et al., 1999; Terrazas et al., 1999; Villa and Kuhn, 1996), IgG2a específicos y macrófagos activados con actividad proinflamatoria dada por altos niveles de IL-12 y óxido nítrico, vía STAT4 (Rodríguez-Sosa et al., 2002; 2004).

Después de la tercera semana la reacción se polariza hacia una respuesta tipo Th2 (Villa and Kuhn, 1996), caracterizada un incremento en los niveles de IL-4, IL-13 e IL-5, así como IgG1 e IgGE, por macrófagos activados alternativamente (Gordon et al., 2003), produciendo altos niveles de IL-6 y PGE2, dicha respuesta inducida por la vía de señalización STAT6 (Rodríguez-Sosa et al., 2002).

En cuanto a la respuesta humoral, hasta el momento no se ha encontrado que los anticuerpos tengan alguna función en la protección contra esta parasitosis experimental, incluso en estudios de vacunación, en donde si bien se ha logrado aumentar los niveles de anticuerpos específicos éstos no se relacionan con la protección (Cervantes, en proceso).

Desgraciadamente, la investigación sobre la respuesta inmune no ha sido sistemática, ya que si bien todos estos estudios se han realizado con la cepa de cisticercos ORF, las cepas y sublíneas de ratones han sido diferentes.

Factores biológicos relevantes en mediar las diferencias de permisividad a la cisticercosis

En la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* se ha identificado la participación de factores biológicos en mediar las diferencias de

permissividad a la infecci3n; entre 3stos est3n los factores gen3ticos (Fragoso et al., 1996; 2008), sexuales (Larralde et al., 1995; Morales-Montor et al., 1996; 2001; 2003) e inmunol3gicos (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al., 1996; L3pez-Briones et al., 2003).

La acci3n de estos factores en conjunto determina las diferencias en la permissividad/restricci3n a la instalaci3n y reproducci3n del par3sito en el hospedero.

### Factores gen3ticos

En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado la capacidad de reproducci3n del cisticerco de la cepa ORF en diferentes fondos gen3ticos de ratones, cuantificando la carga parasitaria 30 d3as despu3s de infectar con 10 cisticercos de aproximadamente 2 mil3metros de di3metro, inyectando intraperitonealmente a los ratones con agujas 27G. Al pasar por este calibre de aguja el cisticerco se fragmenta, por lo que evaluamos a 30 d3as de infecci3n la capacidad del par3sito para reconstituirse, instalarse y reproducirse.

Hemos encontrado que hay cepas de ratones que resultan permisivas a la instalaci3n y reproducci3n del metac3stodo, dando como resultado un incremento significativo en el total de cisticercos recuperados con respecto a los ratones cuyo fondo gen3tico es restrictivo a la instalaci3n y reproducci3n del par3sito, as3 como un claro dimorfismo sexual en todas las cepas evaluadas; las hembras son m3s permisivas que los machos (Fragoso et al., 2008).

Hasta ahora se han evaluado 17 diferentes cepas singénicas, congénicas y congénicas recombinantes de ratones de ambos sexos, a lo largo de 14 años. Las cepas utilizadas fueron de distintos fondos genéticos: BALB/, C57BL, C3H, DBA y A/J (Fragoso et al., 2008).

Se encontró que los ratones BALB/ son más permisivos que los C57BL/, así como que los ratones A/J son más permisivos que los C3H/. Sin embargo, se ha observado que en ratones congénicos recombinantes BALB/B, cepa restrictiva para la instalación y el crecimiento del parásito hasta el día 30 de infección, algunas células o factores del parásito pueden permanecer en el hospedero y tras un periodo largo (150 días) logran instalarse, reconstituirse y reproducirse tan exitosamente como en BALB/cAnN (Sciutto et al., 1991).

De todas las cepas evaluadas, BALB/c es la más permisiva, y dentro de las sublíneas de ratones BALB/c se encontró que la cepa BALB/cJ es restrictiva a la reproducción del parásito con respecto a BALB/cAnN, lo que motivó el estudio de los factores inmunológicos implicados en estas diferencias de permisividad (Fragoso et al., 1999; López-Briones et al., 2003). Con respecto a las cepas en otros fondos genéticos, se ha encontrado que la cepa C57BL/6J es una de las más restrictivas para el crecimiento del parásito.

Estas claras diferencias de permisividad entre las cepas BALB/cAnN, BALB/cJ y C57BL/6J motivaron el desarrollo del presente trabajo de tesis, ya que nos permitieron evaluar la participación de factores inmunológicos tempranos y sexuales implicados en las diferencias de permisividad al crecimiento y la instalación del parásito.

Entre las sublíneas de la cepa BALB/c, BALB/cAnN y BALB/cJ se han reportado algunas diferencias fenotípicas (Tabla 1).

Entre las diferencias fenotípicas reportadas destacan la expresión de la proteína Qa-2 (Potter, 1985) y las diferencias en la permisividad a la instalación y crecimiento del parásito, ya que se encontró una correlación entre la expresión de esta proteína en ratones BALB/cJ y la restricción al crecimiento del parásito por estudios de ligamiento genético entre BALB/cAnN y BALB/cJ (Fragoso 1996). Estos resultados se confirman con la producción de un ratón transgénico de fondo permisivo que expresó la proteína Qa-2 (Fragoso et al., 1996; 1998). Qa-2 es una molécula no clásica del MHC codificada por cuatro genes (Q6-Q9), localizados en el extremo telomérico al loci H-2D. En BALB/cAnN, la pérdida de los genes Q6-Q7 Y Q8-Q9 ocasionó la pérdida en la expresión de Qa-2 (Mellor et al., 1985).

### Factores sexuales

Con respecto a la participación de los factores sexuales en mediar las diferencias de permisividad o restrictividad al establecimiento y la reproducción del parásito, hemos observado que en todas las cepas evaluadas hasta ahora hay un claro dimorfismo sexual, siendo las hembras más susceptibles que los machos (Fragoso et al., 2008), sin embargo, durante infecciones crónicas (más de cuatro semanas) se ha observado que los machos llegan a ser tan susceptibles como las hembras (Larralde et al., 1995).

Este cambio en la restrictividad de los machos se ha relacionado con un incremento de  $17\beta$ -estradiol y una baja en la concentración de testosterona,

que incluso afecta la conducta sexual de los ratones; este fenómeno se ha denominado “feminización” (Larralde et al., 1995; Morales-Motor, 1996). Claramente se ha demostrado que un ambiente con estradiol (E2) y progesterona (P4) estimula la reproducción e infectividad del cisticerco, mientras que en un ambiente con testosterona (T4) y dihidrotestosterona (DTH) se inhibe tanto su reproducción como su infectividad (Escobedo et al., 2004). El incremento en la expresión de P450 aromatasa por IL-6 es el mecanismo propuesto para este cambio en la concentración hormonal (Morales-Montor et al., 2002). De manera interesante, este efecto de “feminización” inducido por el parásito no se observa en ratones machos de la cepa BALB/cJ (Aldridge et al., 2007), lo que muestra la relevancia de los factores genéticos entre las sublíneas de BALB/c.

#### Factores inmunológicos

En cuanto a los factores inmunológicos, se ha reportado que la parasitosis induce un decremento en las subpoblaciones de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> TCRV $\beta$ 2, así como apoptosis en esplenocitos de ratones BALB/cAnN (López-Briones et al., 2003<sup>a</sup>; López-Briones et al., 2003<sup>b</sup>). También se ha observado que las células CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  se asocian con la resistencia de C57BL/6J (López-Briones et al., 2001) y recientemente se reportó que células presentadoras de antígeno (CPA) derivadas de la médula ósea de ratones de la cepa BALB/cAnN tienen menor capacidad de activarse ante la presencia de antígenos de *T. crassiceps* comparados con CPA derivadas de la médula ósea de ratones de C57BL/6J (Reyes et al., 2009).

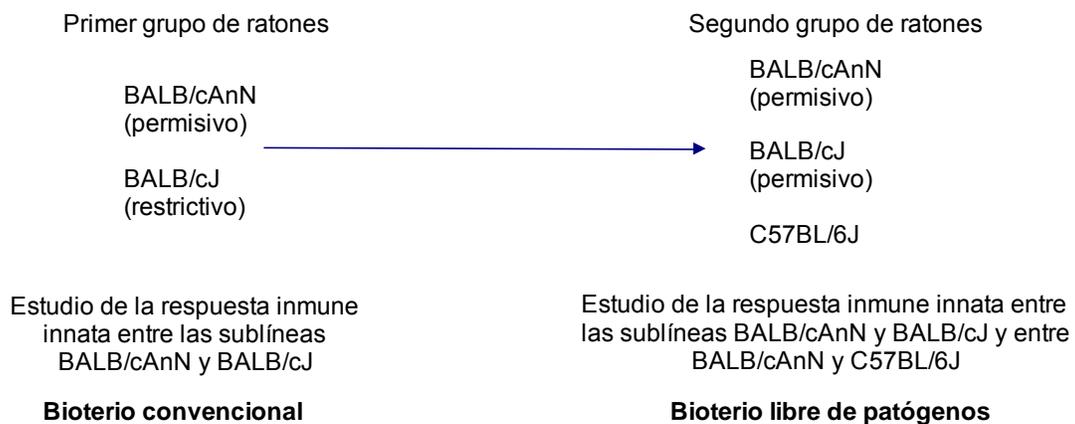
En cuanto a la participación de las CPA y su activación, recientemente se ha reportado que los macrófagos peritoneales son una fuente temprana de IL-6, citocina que es secreta tras el reconocimiento de carbohidratos de *Taenia crassiceps* vía TLRs e iniciadora de la polarización de la respuesta Th2 (Dissanayake et al., 2004); otros reportes señalan que *in vitro* glicanos de *Taenia crassiceps* tienen la capacidad de activar macrófagos alternativamente y esta activación supresora es independiente de TLR4 y citocinas Th2 (Gómez-García 2005); Además se ha reportado que la eliminación temprana de macrófagos peritoneales, conduce a la disminución de macrófagos activados alternativamente, células que participan de manera importante en la permisividad a la cisticercosis, ya que su reclutamiento temprano favorece la sobrevivencia del parásito (Reyes et al., 2010). Las células dendríticas se ha encontrado pueden modular la respuesta inflamatoria y la respuesta Th1 tras la activación con glicoantígenos de *Taenia crassiceps* (Terrazas et al., 2010).

Como se mencionó anteriormente, poco se ha reportado sobre el efecto de los factores genéticos y sexuales en la respuesta temprana local a esta parasitosis y su posible participación en mediar las diferencias de permisividad al establecimiento y la reproducción del parásito. Considerando lo anterior, en el presente trabajo estudiamos la respuesta temprana entre diferentes cepas y sexos de ratones con distinta permisividad a la infección, con el fin de conocer si la respuesta inicial tiene un papel importante en determinar las diferencias de permisividad.

grado de permisividad a la cisticercosis; para ello se utilizaron hembras y machos de las cepas BALB/cAnN (permisiva) y C57BL/6J (restrictiva) mantenidos en condiciones libres de patógenos y procedentes de los laboratorios Harlan.

Todos los ratones utilizados tuvieron de 4 a 6 semanas de edad y recibieron agua y comida *ad libitum* en el bioterio del IIB.

Figura 4. Esquema de los ratones utilizados durante este estudio.



## Infección

La infección de los ratones se realizó con cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF, aislados por Freeman en 1962 y donados por el Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) en 1985; desde entonces se han mantenido por pases seriales entre ratones hembras de la cepa BALB/cAnN en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los pases seriales se realizan en hembras de la cepa BALB/cAnN de 4 a 6 semanas de edad, infectadas intraperitonealmente con 20 cisticercos de 2 mm de diámetro, vesiculares y no gemantes, con solución salina isotónica estéril (SSI), los cuales se introdujeron en la cavidad peritoneal de los ratones a través de una jeringa de insulina con aguja de calibre 27G. Después de 2 a 3 meses de infección se sacrificaron los ratones en una cámara de CO<sub>2</sub> y se recuperaron los cisticercos, los cuales se lavaron varias veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y se seleccionaron para infectar los ratones experimentales.

Para las infecciones experimentales, los ratones se infectaron con 10 cisticercos por ratón en las mismas condiciones en las que se infectaron los ratones stock. El sacrificio de los ratones se realizó mediante una cámara de CO<sub>2</sub>, 3 y 5 días posteriores a la infección.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

### Lavado peritoneal

Para la obtención de células y fluido peritoneal, los ratones se sacrificaron como se mencionó en el apartado anterior y se les inyectó 1 ml de solución salina isotónica (ISS) estéril; se dio un masaje y se recuperó la suspensión peritoneal. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante, el cual se guardó a -20°C para medir citocinas y hormonas. El botón celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador de fosfatos (PBS)

suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (SFB) y 0.2% de  $\text{NaN}_3$  a  $4^\circ\text{C}$  y se mantuvo en hielo.

Viabilidad de los cisticercos recuperados de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J in vitro

Con el fin de conocer si el contacto con los mecanismos de defensa del hospedero durante los primeros días de infección era suficiente para dañar al parásito, decidimos evaluar la viabilidad de los cisticercos recuperados de cada ratón, para lo cual los cisticercos recuperados a los 3 y 5 días posteriores a la infección de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J se colocaron en placas de 16 pozos con 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 1 ml de penicilina estreptomicina SIGMA, a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , durante quince días. El medio se enriqueció dos veces por semana con 750  $\mu\text{l}$  de medio, y al día quince se cuantificó el número de cisticercos y se evaluó el estado de éstos como vesiculares o coloidales.

## CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO

### CÉLULAS PERITONEALES

#### Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E)

Como un primer análisis se realizó una caracterización celular del infiltrado inflamatorio por microscopía óptica. De cada muestra se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se realizaron frotis de la suspensión celular. Los frotis se fijaron con metanol al 70% durante 10 minutos y se tiñeron con H-E.

Se realizó la identificación y cuantificación de las diferentes poblaciones celulares obtenidas de los lavado peritoneales de ratones no infectados (controles) e infectados con *Taenia crassiceps*.

Las preparaciones se sumergieron durante 10 minutos en hematoxilina, se lavaron al chorro de agua, se pasaron por baños de alcohol ácido (1:100), nuevamente se lavaron al chorro de agua y se pasaron por baños de carbonato de litio (0.01 M); se lavaron en agua, se trataron con eosina y se pasaron por alcohol 96%, alcohol absoluto y xilol; después se montaron con cera comercial.

#### Citometría de flujo

Con el fin de evaluar las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los ratones y profundizar en la caracterización del infiltrado inflamatorio, las células se analizaron por citometría de flujo.

Para el marcado de las células con los anticuerpos específicos, se colocaron  $5 \times 10^5$  células (contadas por un hemocitómetro) en 50  $\mu$ l PBS\*, y se bloquearon los receptores Fc para evitar el pegado inespecífico con un anticuerpo monoclonal anti CD16/CD32 purificado (Pharmingen) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron las células y se pusieron a incubar con los distintos anticuerpos. Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 3.

Las reacciones se realizaron en 20  $\mu$ l de PBS\* y se dejaron incubar durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad; las células se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de PBS\* frío, se centrifugaron a 2000 rpm y se decantó el sobrenadante. En el caso de las reacciones con anticuerpos biotinilados, se adicionó estreptoavidina acoplada a un fluorocromo, las células se incubaron durante 30

minutos y se lavaron como se describió anteriormente. Finalmente, las células se fijaron con formaldehído al 1% en SSI y se adquirieron en un citómetro FACScan o FACScalibur (Becton and Dickinson) y se analizaron mediante el programa de Cell Quest (Becton and Dickinson).

Tabla 2. Reacciones para la caracterización celular por citometría de flujo

<b>ESTUDIO</b>	<b>Población celular</b>	<b>Reacción directa</b>		<b>Reacción indirecta</b>
<b>Permisividad entre diferentes cepas</b>	Esplenocitos Qa-2+			Qa-2 biotilado, Estreptoavidina (PE)
<b>Sublíneas de BALB/c BALB/cAnN vs BALB/cJ</b>	Células NK Macrófagos	CD69 (FITC) F4/80-Mac3 (PE)-(FITC)		
<b>BALB/cAnN vs C57BL/6J</b>		<b>BALB/cAnN</b>	<b>C57BL/6J</b>	
	Células NK	CD69	NK1.1	
	Células NKT	CD69/CD3	NK1.1/CD3	
	IKDCs	CD69/CD11c/B220	NK1.1/CD11c/B220	
	DCs	CD11c	CD11c	
	Macrófagos	F4/80	F4/80	

## LAVADO PERITONEAL

### DETERMINACIÓN DE IL-12 e IFN $\gamma$ POR ELISA

Con el fin de conocer si las diferencias de permisividad a la infección entre las cepas estudiadas se asocian con un perfil diferente de citocinas proinflamatorias, se evaluaron dos de las principales citocinas proinflamatorias, IL-12 e IFN $\gamma$ , en los sobrenadantes de los lavados peritoneales de ratones infectados y de los controles.

La concentración de IL-12 e IFN $\gamma$  fue determinada por ELISA, utilizando para IL-12 el anticuerpo de captura anti-ratón IL-12 (p40) BD Pharmingen; el anticuerpo de detección anti-ratón IL-12 (p40) (BD Pharmingen, No. de catálogo 554476) y la IL-12 recombinante [2  $\mu$ g a 40  $\mu$ g] (BD Pharmingen, No. de catálogo 19401W), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para IFN $\gamma$  se utilizaron los anticuerpos de captura anti-ratón IFN $\gamma$  (BD Pharmingen, No. de catálogo 18181D), anticuerpo de detección anti-ratón IFN $\gamma$  (BD Pharmingen, No. de catálogo 18112D) y el IFN recombinante [10  $\mu$ g/500  $\mu$ l, 20  $\mu$ g/ml] de Genzyme, siguiendo las indicaciones del proveedor.

Determinación de los niveles de TGF $\beta$  en lavados peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J

Con el fin de conocer si TGF $\beta$  está siendo secretado por las células peritoneales durante la cisticercosis experimental, y así pueda ejercer una función antiinflamatoria que medie las diferencias de permisividad a la

infección, o bien que pueda ser utilizado por el parásito para lograr su reconstitución o mejorar sus funciones metabólicas, evaluamos los niveles de TGF $\beta$  en los sobrenadante de los lavados peritoneales de ratones infectados y de los controles.

El TGF $\beta$  se evaluó en el líquido peritoneal de todos los grupos experimentales por ELISA, utilizando el KIT comercial TGF $\beta$  (BD Pharmingen, San Diego, CA, ambas citocinas) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, el ensayo se realizó en placas de 96 pozos de microtitulación de fondo plano (Nunc-Immuno mural Maxisorp, Rosekilde, Dinamarca). Las placas fueron recubiertas con el anticuerpo de captura por 18 horas a 4°C (BD Pharmingen, San Diego, CA, ambas citocinas). Después se lavaron con PBS-Tween-20 (0.05%) y se bloquearon por 30 minutos a temperatura ambiente con PBS-BSA 2%; las placas se incubaron durante 18 h con la recombinante y las muestras, respectivamente, a 4°C, se lavaron tres veces y se incubaron con el anticuerpo de detección a temperatura ambiente durante 2 h. los anticuerpos de detección unidos fueron identificados con conjugado diluido estreptoavidina-fosfatasa 1:10,000 (BD Pharmingen) y p-nitrofenilfosfato (Sigma) como sustrato. Se leyó a una densidad óptica (DO) de 405 nm a los 30 y 60 minutos de la incubación. El análisis de sensibilidad para TGF $\beta$  se midió en pg/ml.

## ESTUDIO DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Estudio del espaciador transcrito interno (ITS) entre cisticercos procedentes de diferentes stocks de ratones BALB/cAnN

Durante el cambio de bioterio de convencional a libre de patógenos se renovaron las cepas de ratones, y con los nuevos grupos de ratones perdimos las diferencias en la permisividad entre BALB/cAnN y BALB/cJ. Con el fin de evaluar si este cambio en las cepas de ratones había afectado al parásito, decidimos realizar un estudio de variabilidad genética a través del espaciador transcrito interno (ITS).

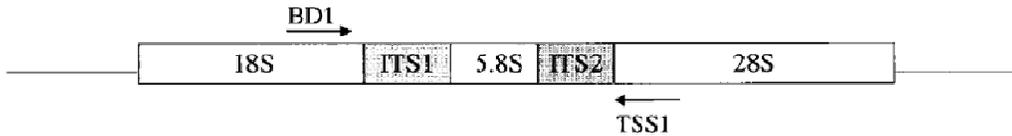
El ITS se ha utilizado para estudios intra e interespecíficos en varios parásitos, incluyendo *Taenia solium* (Mayta et al., 2000; Cuervo et al., 2004).

Para este estudio utilizamos parásitos que provenían del primer grupo de ratones BALB/cAnN que se habían utilizado para otro estudio en el año 2000 y que se encontraban en etanol al 70% a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y parásitos obtenidos del segundo grupo de ratones en el año 2004.

Primero se obtuvo el DNA genómico de los cisticercos con el KIT Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del proveedor. La calidad y cantidad de DNA se cuantificó por espectrofotometría.

La amplificación del ITS por PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos BD1 y TSS1.

### Espaciador transcrito interno (ITS)



Structure of a single rDNA repeat unit showing the primer annealing position for the PCR-REA (~1300pb)

**BD1:** 5' GTCGTAACAAGGTTTCCGTA 3'

**TSS1:** 5' ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATC 3'

Tabla 3. Reacciones de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
DNA 100 ng		100 ng	Depende de concentración inicial
Buffer	10×	1×	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	5 $\mu$ l
Dntp	10 mM	10 mM	1 $\mu$ l
BD1	4.2 ng/ $\mu$ l	Dil. 1:42	1 $\mu$ l
TSS1	4.9 ng/ $\mu$ l	Dil. 1:49	1 $\mu$ l
Taq polimerasa	10 U	1U	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O			Lo que falte para llegar a 50 $\mu$ l

Los ciclos de PCR para amplificación del ITS fueron: un ciclo de 5 minutos a 94°C y 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minutos a 72°C, 7 minutos a 72°C.

El producto del PCR se corrió en un gel de agarosa 1% con TAE y 1 µl de bromuro de etidio a 100 V, adicionando 1 µl de la solución de stop + 5 µl del producto del PCR.

#### Purificación del ITS

La purificación del ITS se llevó a cabo con el kit MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Cat. No 28004).

Las bandas obtenidas del PCR se cortaron y pesaron. Se adicionó el triple del volumen del gel de la solución amortiguadora QG.

Se incubaron durante 10 minutos a 50°C y se adicionó 1 volumen de isopropanol, se transfirió la columna de purificación a tubos de 2 ml y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm.

El sobrenadante se descartó y se adicionaron 500 µl de la solución QG, se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante.

Nuevamente se transfirió la columna de purificación a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de agua. Después de 2 minutos de incubación, se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se guardó a 4°C.

El ITS purificado se corrió en un gel de agarosa 1%, utilizando 2  $\mu$ l del ITS purificado para confirmar su peso molecular, y el resto del ITS se mandó a secuenciar.

#### Análisis estadísticos

Todos los resultados fueron analizados por ANOVA (análisis de varianza) seguidos de una prueba *t* de Student para determinar las diferencias. Para los resultados no paramétricos se realizó la prueba de Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank; se reportan diferencias significativas con  $P < 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

Diferencias en la permisividad de la cisticercosis experimental murina causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps* en dos sublíneas de BALB/c: BALB/cAnN y BALB/cJ

En este trabajo comenzamos evaluando la respuesta inmune en dos sublíneas de BALB/c: BALB/cAnN, reportada como la cepa evaluada más permisiva, y BALB/cJ, considerada una cepa restrictiva a la infección por *Taenia crassiceps* (Fragoso et al., 2008).

Hay pocas diferencias fenotípicas reportadas entre estas dos sublíneas, y entre ellas destaca la expresión de la proteína Qa-2, cuya expresión está relacionada con la restricción en el incremento de la carga parasitaria en la cisticercosis (Fragoso et al., 1996). Se evaluó la participación de la respuesta temprana en la mediación de las diferencias de susceptibilidad.

Durante el tiempo en que se realizó este trabajo, el bioterio de nuestro Instituto cambió de convencional a libre de patógenos, lo que implicó cambios de infraestructura, mantenimiento y alimentación, así como la renovación de los pies de cría de las cepas de ratones mantenidas en el bioterio.

En el inicio del estudio, como se mencionó en la metodología, los ratones BALB/cAnN mantenidos en el bioterio fueron adquiridos de Charles and Rivers en 1982, y los ratones BALB/cJ fueron donados por National Institute for Medical Research en 1992; ambos stocks de ratones fueron mantenidos por

cruzas entre hermanos en el bioterio del Instituto hasta 2004, fecha cuando el bioterio se renovó con condiciones libres de patógenos y ambas cepas fueron renovadas.

Estos cambios en el bioterio repercutieron las diferencias de permisividad a la infección por *Taenia crassiceps*, y ahora BALB/cJ es tan permisiva a la infección como BALB/cAnN. Cabe señalar que los cambios en la permisividad a la infección, si bien son sorprendentes, no son inesperados, considerando que las cepas sufren cambios genéticos a lo largo de su separación. Como se observa en la figura 1, la línea de BALB/c se ha movido a distintos lugares geográficos generando distintas sublíneas, entre las que destacan las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ, cuyas modificaciones genéticas se han traducido en diferencias fenotípicas asociadas con distintos fenómenos biológicos (Tabla 1).

Por esta razón, el estudio de la respuesta temprana realizado en las sublíneas de BALB/c se presenta con ratones del primer grupo mantenidos en el bioterio convencional (antes de 2004, cuando las diferencias de permisividad se mantenían, con BALB/cAnN permisiva y BALB/cJ restrictiva) y con ratones del segundo grupo, mantenidos en el bioterio libre de patógenos (después del 2004, cuando ambas sublíneas de BALB/c son permisivas a la infección).

DIFERENCIAS EN LA PERMISIVIDAD A LA INSTALACIÓN Y REPRODUCCIÓN DE LA CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL CAUSADA POR *Taenia crassiceps*

BALB/cJ pierde su capacidad restrictiva a la instalación y reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps*

La diferencia en la carga parasitaria a treinta días de infección entre las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ se ha reportado desde 1996 por Fragoso y colaboradores; nosotros nos preguntamos si esas diferencias en el número de parásitos se presentaban desde tiempos tempranos (3 y 5 días de infección), por lo que cuantificamos la carga parasitaria en ratones hembras de estas dos sublíneas de BALB/c.

Con el primer grupo de ratones encontramos que desde tiempos tempranos se presentaban diferencias significativas en el número de cisticercos recuperados; en promedio, al día 3 de infección en los ratones BALB/cAnN se recuperaron de 1 a 6.3 cisticercos, y en BALB/cJ de 0.3 a 1.6; al día 5 de infección, en BALB/cAnN se recuperaron de 6.3 a 9.6 cisticercos, y en BALB/cJ de 0.3 a 1.3, y al día 30 de infección en BALB/cAnN se recuperaron de 116 a 203 cisticercos, mientras que en BALB/cJ de 0.3 a 1 cisticerco. BALB/cAnN era claramente más permisiva que BALB/cJ.

Con el segundo grupo de ratones esas diferencias se perdieron: al día 3 de infección se recuperaron de 2 a 3.3 cisticercos en BALB/cAnN y de 2 a 7 en BALB/cJ; al día 5 de infección, en BALB/cAnN se recuperaron de 1.5 a 4.6 cisticercos y de 1 a 7 en BALB/cJ; al día 30 de infección en BALB/cAnN se

recuperaron de 11 a 65 cisticercos, mientras que en BALB/cJ de 34 a 87. BALB/cJ se encontró igual o más permisiva que BALB/cAnN (Tabla 4).

Tabla 4. Carga parasitaria en sublíneas de ratones BALB/c después de la infección intraperitoneal con cisticercos de *Taenia crassiceps*

Días de infección	3			5			30		
# experimento	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Primer stock									
BALB/cAnN	1±1.4 <sup>a</sup>	4.3±1.7 <sup>a</sup>	6.3±1.5 <sup>a</sup>	6.3±1.5 <sup>a</sup>	7±2 <sup>a</sup>	9.6±2 <sup>a</sup>	129±39 <sup>a</sup>	116±52 <sup>a</sup>	203±80 <sup>a</sup>
BALB/cJ	0.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.4 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>b</sup>	1±1.3 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>b</sup>	1.3±1.1 <sup>b</sup>	1±1.7 <sup>b</sup>	0.5±0.7 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>b</sup>
Segundo stock									
BALB/cAnN	26±2.3 <sup>b</sup>	3±2.6 <sup>a</sup>	2.3±2.5 <sup>c</sup>	4.6±0.5 <sup>c</sup>	1.5±1.9 <sup>c</sup>	1.6±0.5 <sup>b</sup>	11.7±10. 7 <sup>c</sup>	65±66 <sup>a</sup>	51.8±98 <sup>c</sup>
BALB/cJ	3.6±2.5 <sup>b</sup>	7±2 <sup>c</sup>	2±1.7 <sup>c</sup>	7±2.6 <sup>c</sup>	1±1.5 <sup>c</sup>	2.3±1.5 <sup>b</sup>	43±40 <sup>c</sup>	87±64 <sup>a</sup>	34±30 <sup>c</sup>

El promedio ± la desviación estándar del número de cisticercos recuperados tras la infección de cinco ratones por grupo con 10 cisticercos por ratón. Las literales indican las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre hembras en los días 3 y 5 de infección, utilizando la prueba *t* de Student.

La expresión de Qa-2 en BALB/cJ y TgB1 ya no está relacionada con la restricción a la instalación y reproducción del parásito

Considerando los resultados presentados en la tabla 4, evaluamos si las diferencias se mantendrían entre otras cepas de ratones previamente evaluadas en su permisividad al crecimiento del parásito. Además se evaluó si la expresión del gene Q9, que codifica a la proteína Qa-2, aún estaba relacionada con la restrictividad a la infección. Por ello cuantificamos la carga parasitaria a treinta días de infección en ratones de la cepa Qa-2 negativa; BALB/cAnN y Qa-2 positivas; BALB/cJ y TgB1 y C57BL/6J. Para este estudio incluimos hembras y machos, con el fin de corroborar también las diferencias entre sexos.

Adicionalmente se correlacionó la carga parasitaria con la expresión de la proteína Qa-2. Los valores de la carga parasitaria del primer grupo de ratones se tomaron de una recopilación de datos durante 14 años (Fragoso et al., 2008); durante todo este tiempo se encontraban diferencias significativas entre las diferentes cepas, lo que muestra la relevancia del fondo genético en el control de esta parasitosis. Las cepas más restrictivas al crecimiento del parásito eran C57BL/6J, BALB/cJ y TgB1. Todas son Qa-2<sup>+</sup>.

Tabla 5.-Diferencia en la permisividad a la infección experimental causada por *Taenia crassiceps* entre diferentes cepas de ratones

Cepa	Primer grupo				Segundo grupo			
	♀		♂		♀		♂	
	N	X±SD	n	X±SD	n	X±SD	n	X±SD
BALB/cAnN	15	115±8 <sup>a</sup>	13	29±3 <sup>b</sup>	7	120±154 <sup>ace</sup>	7	74±75 <sup>c</sup>
C57BL/6J	18	0 <sup>d</sup>	18	0 <sup>d</sup>	7	0 <sup>d</sup>	7	1±1 <sup>e</sup>
BALB/cJ	30	4±0.5 <sup>f</sup>	30	0.2±0.04 <sup>g</sup>	7	340±170 <sup>h</sup>	7	113±36 <sup>ac</sup>
TgB1	14	28±18 <sup>b</sup>	13	3±5 <sup>ef</sup>	7	339±272 <sup>h</sup>	7	43±51 <sup>abe</sup>

Promedio y desviación estándar del número de parásitos recuperados 30 días posteriores a la infección, después de infectar con 10 cisticercos intraperitonealmente ( $n$  = número de ratones estudiados). Los datos del primer grupo de ratones fueron tomados de Fragoso et al., 2008. Las literales indican diferencias significativas entre cepas y sexos del primer y segundo grupo de ratones utilizados ( $P < 0.05$ ).

Como se observa en la tabla 5, con el primer grupo de ratones la cepa BALB/cAnN fue la cepa más permisiva a la infección evaluada, y las diferencias de permisividad entre sexos se mantuvieron en todas las cepas evaluadas una vez que la infección se establecía, siendo las hembras más permisivas que los machos. Tras el cambio del bioterio y con el segundo grupo de ratones encontramos que tanto BALB/cJ como TgB1 son tan permisivas o más que BALB/cAnN, aunque la cepa C57BL76J se mantuvo como la cepa más restrictiva a la infección. Las diferencias de permisividad a la infección se mantuvieron entre los sexos, siendo las hembras en todas las cepas estudiadas más permisivas a la infección que los machos.

Con respecto a la expresión de Qa-2, como se observa en la figura 5, no se encontraron diferencias en el porcentaje de expresión de Qa-2 entre el primer y segundo grupos de ratones de todas las cepas estudiadas.



C57BL/6J continúa siendo restrictiva a la cisticercosis experimental murina, lo que señala la relevancia de otros genes implicados en el control de esta infección

Considerando la pérdida de la restricción de BALB/cJ a la instalación y reproducción del cisticerco tanto a tiempos tempranos como a tiempos tardíos (3, 5 y 30 días de infección), decidimos evaluar si entre la cepa BALB/cAnN (permisiva) y la cepa más restrictiva a la infección, C57BL/6J, pudieran haberse presentado variaciones en tiempos tempranos y tardíos, con el fin de continuar el estudio de la respuesta temprana en cepas permisivas y restrictivas a la cisticercosis.

También se evaluó a tiempos tempranos el porcentaje de cisticercos dañados, el número de ratones totalmente restrictivos a la infección y la viabilidad de los cisticercos recuperados del hospedero después de dos semanas en cultivo, para determinar si tienen la capacidad de recuperarse y reproducirse.

Como se observa en la tabla 6, las diferencias de permisividad entre BALB/cAnN y C57BL/6J fueron evidentes desde los primeros días. Encontramos que la carga parasitaria recuperada durante los días 3 y 5 de infección fue mayor en ratones hembras de la cepa BALB/cAnN que en las hembras de la cepa C57BL/6J. En cuanto a los machos, sólo se encontraron diferencias significativas al día 5 de infección: se recuperaron más parásitos en BALB/cAnN.

Con respecto a las diferencias entre sexos, sólo en BALB/cAnN se encontraron diferencias significativas al día 3 de infección, con un mayor número de cisticercos recuperados en las hembras que en los machos.

Al recuperar los cisticercos de los diferentes hospederos se observaron claras diferencias en el estado del parásito: la mayoría de los cisticercos recuperados de la cepa BALB/cAnN eran vesiculares, mientras que la mayoría de los cisticercos recuperados de C57BL/6J tenían un aspecto coloidal, estaban dañados. En la tabla 7 también puede observarse que hay un mayor porcentaje de cisticercos calcificados en la cepa C57BL/6J de ambos sexos, aunque sólo al día 3 de infección encontramos diferencias significativas para C57BL/6J.

Tabla 6. Diferencias en la permisividad entre BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos

<u>Días de infección</u>		Hembras	Machos
3 días	BALB/cAnN	3±1a†	1.1±0.9b
		12%‡	23%
	C57BL/6J	0.8±1b	1.7±1.9a,b
		42%	37%
5 días	BALB/cAnN	2.5±1.5a	2.5±1.5a
		19%	29%
	C57BL/6J	0.7±0.9b	1±1.5b
		57%	62%

Promedio ± desviación estándar de los cisticercos recuperados durante los días 3 y 5 posinfección. Las literales señalan diferencias entre grupo utilizando la prueba de Mann-Whitney a  $P < 0.05$ . †el porcentaje de ratones sin parásitos viables (ratones resistentes) de un total de 7 a 15 ratones de dos diferentes experimentos. Las diferencias en el porcentaje de ratones restrictivos entre cepas y sexos fueron comparados usando la prueba exacta de Fisher.

Para evaluar si los cisticercos obtenidos de los diferentes hospederos mantenían su viabilidad y capacidad reproductiva, se cultivaron in vitro durante dos semanas. Se determinó la relación del número de cisticercos vesiculares con el número de cisticercos dañados o coloidales. Como se observa en la tabla 7, se encontró un incremento significativo del porcentaje de cisticercos vesiculares recuperados de hembras de la cepa BALB/cAnN durante el tercer y quinto día de infección, tanto recién recuperados como después de estar dos semanas en cultivo, mientras que en los machos la diferencia significativa en el porcentaje de cisticercos vesiculares recuperados sólo se observó durante el día 5 de infección, tanto con los cisticercos recién recuperados como a las 2 semanas de cultivo.

En cuanto al efecto del género en la viabilidad de los parásitos, se encontró al quinto día un mayor porcentaje de cisticercos recién recuperados de las hembras BALB/cAnN con respecto al porcentaje encontrado en los machos, y después de dos semanas en cultivo encontramos un mayor porcentaje en cisticercos recuperados de hembras de la cepa BALB/cAnN al tercer día con respecto a los machos de la misma cepa (Tabla 7).

TABLA 7.- Viabilidad de los cisticercos recuperados de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos

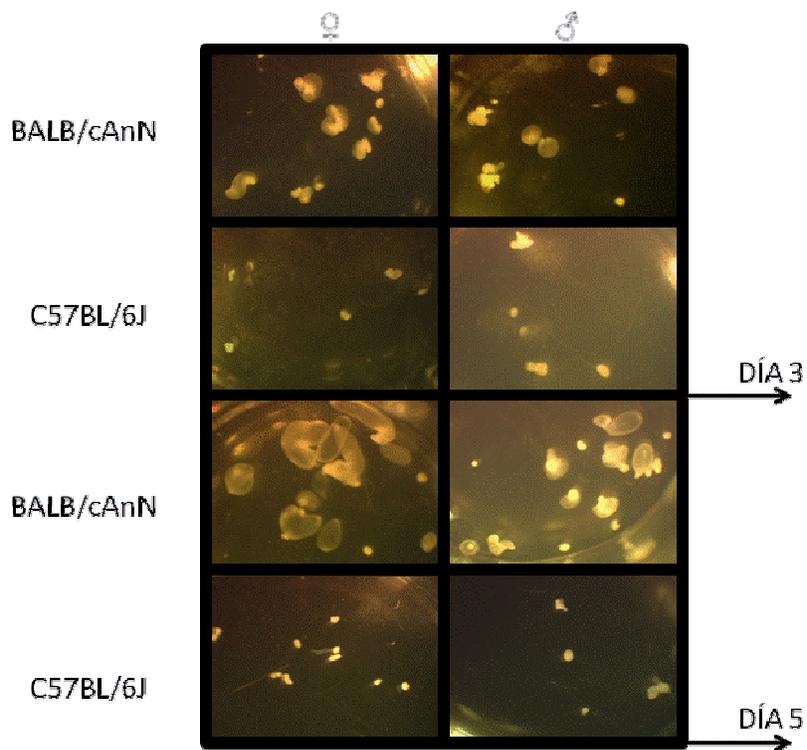
Cisticercos recuperados de:						
	Antes		P3	Después		P4
<b>3 días</b>						
	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>		<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>	
BALB/cAnN	25/21†	15/16		28/30	15/35	
	54%	48%	0.61	48%	30%	0.053
C57BL/6J	3/15	5/13		4/15	3/15	
	16%	27%	0.69	21%	17%	1
P1	<b>0.01</b>	<b>0.23</b>		<b>0.04</b>	0.36	
<b>5 días</b>						
BALB/cAnN	68/33	22/33		49/52	24/44	
	67%	40%	<b>0.001</b>	48%	35%	0.09
C57BL/6J	1/9	2/15		0/10	0/17	
	10%	11%	0.89	0%	0%	1
	<b>0.001</b>	<b>0.04</b>		<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	

†Número de cisticercos macroscópicamente no dañados (vesiculares) / número de cisticercos dañados (coloidales y calcificados). Las diferencias en el porcentaje de cisticercos no dañados versus cisticercos dañados fueron comparadas usando la prueba de Fisher o la prueba de chi cuadrada.  $P < 0.05$ . \*P1: Diferencias entre cepas al tercer día; #P2: Diferencias entre cepas al quinto día; \$P3: Diferencias entre genero antes del cultivo; +P4: Diferencias entre genero después del cultivo.

En la figura 6 se muestra las diferencias del aspecto macroscópico de los cisticercos recuperados de los ratones hembras y machos de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J después de dos semanas en cultivo. Los cisticercos recuperados de C57BL/6J salen del hospedero en su mayoría

casi muertos y no logran recuperarse, mientras que los cisticercos recuperados de BALB/cAnN son vesiculares, y en especial los recuperados de las hembras crecen mejor in vitro y tienen mayor capacidad de gemación (Figura 6).

Figura 6. Viabilidad de los cisticercos recuperados de ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J



Imágenes representativas de los cisticercos recuperados de ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos, recuperados 3 y 5 días después de la infección, tras estar dos semanas en cultivo.

Infiltrado inflamatorio en la cavidad peritoneal de ratones permisivos y restrictivos a la cisticercosis

Con el fin de evaluar diferencias en el infiltrado inflamatorio (basófilos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos) que llegaba a la cavidad peritoneal de los ratones infectados con distinto grado de permisividad a la infección, se realizó una primera caracterización por microscopía óptica.

Un incremento en el porcentaje de macrófagos peritoneales pudiera estar asociado con la restricción dada por BALB/cJ

Como se observa en tabla 8, en ratones del primer grupo no infectados se encontró un mayor porcentaje significativo de eosinófilos (10%) en ratones BALB/cAnN con respecto a BALB/cJ (6%), y de linfocitos en BALB/cJ (46%) con respecto a BALB/cAnN (38%). Al quinto día posterior a la infección con el primer grupo de ratones se encontró un incremento significativo de macrófagos peritoneales (22%) en BALB/cJ con respecto a BALB/cAnN (11%).

Estos datos podrían sugerir que las macrófagos desempeñan un papel importante en la restrictividad a la infección en la cepa BALB/cJ.

Con el segundo grupo de ratones utilizados sólo se encontraron diferencias significativas entre las dos sublíneas de BALB/c en el porcentaje de basófilos: BALB/cAnN presenta un incremento con respecto a BALB/cJ al día 3 (5.6% vs. 3.3%) y 5 (5.3% vs. 3%) tras la infección, respectivamente.

Se encontraron claras diferencias en la composición celular de los ratones controles utilizados del primer y segundo grupos

Comparando los ratones control del primer y segundo grupos, encontramos que en BALB/cAnN los ratones del primer grupo presentaron un incremento de basófilos con respecto a los del segundo (34% vs. 4.6%), mientras que los del segundo tienen un mayor porcentaje de linfocitos con respecto al primer grupo de ratones (47% vs. 38%). En BALB/cJ, los ratones del primer grupo presentan un mayor porcentaje de basófilos (25% vs. 4%) y de eosinófilos (6% vs. 5%) con respecto al segundo grupo, mientras que estos últimos presentan mayor porcentaje de neutrófilos (8% vs. 4%) y de macrófagos peritoneales (29% vs. 14%) (Tabla 8).

El cambio de grupos de ratones, así como del bioterio de convencional a libre de patógenos, se ve reflejado de manera importante en la composición inicial de las células peritoneales, y podrían repercutir en los

cambios observados en el infiltrado inflamatorio durante la respuesta temprana ante la infección.

Hubo diferencias en la composición del infiltrado inflamatorio entre cepas, mientras que entre sexos sólo se encontraron en la cepa C57BL/6J

En el análisis del infiltrado inflamatorio entre ratones hembras BALB/cAnN y C57BL/6, se encontró en los ratones control un incremento de macrófagos en hembras de la cepa BALB/cAnN con respecto a las hembras de C57BL/6J (36% vs. 24%). En cuanto a los machos, se encontró al día 3 un incremento de linfocitos en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J (25% vs. 12%) (Tabla 9).

En cuanto a las diferencias entre sexos, no se encontraron diferencias significativas entre ratones de la cepa BALB/cAnN, mientras que en la cepa C57BL/6J encontramos al día 3 de infección un incremento de linfocitos en las hembras con respecto a los machos (30% vs. 12%) y un incremento de neutrófilos en los machos con respecto a las hembras (28% vs. 16%); sin embargo, estas diferencias no se ven reflejadas en la infección, ya que ambos sexos son igualmente restrictivos a la cisticercosis (Tabla 9)

Tabla 8. Composición del infiltrado inflamatorio de ratones del primer y segundo grupo de las cepas BALB/cAnN y BALB/cJ infectados con *Taenia crassiceps*

Day of infection:	BALB/cAnN						C57BL/6J					
	Female			Male			Female			Male		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
Neutrophils	12±7 <sup>ab</sup>	20±4 <sup>a</sup>	10±2 <sup>b</sup>	14±7 <sup>ab</sup>	19±10 <sup>abc</sup>	8±5 <sup>ab</sup>	13±2.5 <sup>ab</sup>	16±5 <sup>ab</sup>	13±1 <sup>ab</sup>	14±8 <sup>ab</sup>	28±1 <sup>c</sup>	17±3 <sup>a</sup>
Basophils	6±2 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	7±2 <sup>a</sup>	5.7±3 <sup>a</sup>	5±3 <sup>a</sup>	5±1 <sup>a</sup>	8±4 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.7 <sup>a</sup>	4±0.07 <sup>a</sup>	3±1 <sup>a</sup>	4±2 <sup>a</sup>
Eosinophils	3±2 <sup>a</sup>	4±2 <sup>ab</sup>	6±1 <sup>ab</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.5 <sup>ab</sup>	4±3 <sup>a</sup>	5±0.5 <sup>a</sup>	3±1 <sup>b</sup>	2±0.7 <sup>b</sup>	5±0.07 <sup>a</sup>	2±0.5 <sup>b</sup>	3±1 <sup>ab</sup>
Lymphocytes	40±7 <sup>a</sup>	26±5 <sup>b</sup>	35±15 <sup>ab</sup>	38±17 <sup>a</sup>	25±13 <sup>b</sup>	33±16 <sup>ab</sup>	48±8 <sup>a</sup>	30±9 <sup>ab</sup>	43±10 <sup>ab</sup>	54±10 <sup>a</sup>	12±3 <sup>c</sup>	36±12 <sup>ab</sup>
Macrophages	36±5 <sup>a</sup>	43±7 <sup>ac</sup>	39±13 <sup>ac</sup>	36±12 <sup>abc</sup>	47±0.5 <sup>ac</sup>	48±10 <sup>ac</sup>	24±7 <sup>b</sup>	45±6 <sup>ac</sup>	38±11 <sup>abc</sup>	22±2 <sup>b</sup>	53±3 <sup>c</sup>	38±16 <sup>abc</sup>

† Promedio ± desviación estándar del porcentaje de las células peritoneales recuperadas durante los días 0, 3 y 5 de infección, infectando intraperitonealmente con 10 cisticercos por ratón. Las literales indican las diferencias significativas entre cepas utilizando el primer y segundo stock de ratones usando la prueba *t* no paramétrica.

Tabla 9. Composición del infiltrado inflamatorio de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos infectados con *Taenia crassiceps*

Días de infección:	BALB/cAnN						C57BL/6J					
	Hembras			Machos			Hembras			Machos		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
Neutrófilos	12±7 <sup>ab</sup>	20±4 <sup>a</sup>	10±2 <sup>b</sup>	14±7 <sup>ab</sup>	19±10 <sup>abc</sup>	8±5 <sup>ab</sup>	13±2.5 <sup>ab</sup>	16±5 <sup>ab</sup>	13±1 <sup>ab</sup>	14±8 <sup>ab</sup>	28±1 <sup>c</sup>	17±3 <sup>a</sup>
Basófilos	6±2 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	7±2 <sup>a</sup>	5.7±3 <sup>a</sup>	5±3 <sup>a</sup>	5±1 <sup>a</sup>	8±4 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.7 <sup>a</sup>	4±0.07 <sup>a</sup>	3±1 <sup>a</sup>	4±2 <sup>a</sup>
Eosinófilos	3±2 <sup>a</sup>	4±2 <sup>ab</sup>	6±1 <sup>ab</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.5 <sup>ab</sup>	4±3 <sup>a</sup>	5±0.5 <sup>a</sup>	3±1 <sup>b</sup>	2±0.7 <sup>b</sup>	5±0.07 <sup>a</sup>	2±0.5 <sup>b</sup>	3±1 <sup>ab</sup>
Linfocitos	40±7 <sup>a</sup>	26±5 <sup>b</sup>	35±15 <sup>ab</sup>	38±17 <sup>a</sup>	25±13 <sup>b</sup>	33±16 <sup>ab</sup>	48±8 <sup>a</sup>	30±9 <sup>ab</sup>	43±10 <sup>ab</sup>	54±10 <sup>a</sup>	12±3 <sup>c</sup>	36±12 <sup>ab</sup>
Macrófagos	36±5 <sup>a</sup>	43±7 <sup>ac</sup>	39±13 <sup>ac</sup>	36±12 <sup>abc</sup>	47±0.5 <sup>ac</sup>	48±10 <sup>ac</sup>	24±7 <sup>b</sup>	45±6 <sup>ac</sup>	38±11 <sup>abc</sup>	22±2 <sup>b</sup>	53±3 <sup>c</sup>	38±16 <sup>abc</sup>

Promedio ± desviación estándar del porcentaje de células peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos durante los días 0, 3 y 5 de infección. Las literales indican las diferencias significativas entre el promedio de cada tipo celular usando la prueba Mann-Whitney con  $P < 0.05$ . Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados con  $n = 3$  ratones por variable.

Un incremento de células NK y macrófagos peritoneales están presentes en la cepa BALB/cJ (restrictiva)

Como se observa en la tabla 10, se encontró en el primer grupo de ratones un incremento significativo de células NK al día cinco de infección en la cepa BALB/cJ (restrictiva) con respecto a BALB/cAnN (12% vs 3%) (Figura 7) y desde el día tres un incremento de células Mac-3+ peritoneales en BALB/cJ con respecto a BALB/cAnN de (10% vs 2%) y al día 5 de infección de (16% vs 3%) (Figura 8) (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización del infiltrado inflamatorio de ratones BALB/cAnN y BALB/cJ del primer y segundo grupos de ratones infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps*

	Pan-NK+ (%)		Mac-3+ (%)	
	1 <sup>er</sup>	2 <sup>o</sup>	1 <sup>er</sup>	2 <sup>o</sup>
Control				
BALB/cAnN	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.4 ± 2 <sup>a</sup>	30.6 ± 11.4 <sup>a</sup>
BALB/cJ	2.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 1.5 <sup>a</sup>
Día 3				
BALB/cAnN	4.7 ± 1.8 <sup>b</sup>	10.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.1 ± 6.3 <sup>a</sup>
BALB/cJ	4 ± 1 <sup>b</sup>	5.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	10.8 ± 1 <sup>b</sup>	24.5 ± 1.5 <sup>a</sup>
Día 5				
BALB/cAnN	3.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	13.9 ± 2.7 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.02 <sup>a</sup>	24.4 ± 5.2 <sup>a</sup>
BALB/cJ	12.4 ± 2 <sup>c</sup>	14.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	16.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	18.3 ± 3.4 <sup>a</sup>

Porcentaje de células Pan-NK+ y Mac-3+ peritoneales recuperadas de ratones infectados después de 3 y 5 días de infección, con  $n = 3$  a 5 ratones por grupo. Las literales indican las diferencias significativas entre columnas usando una prueba  $t$  no paramétrica ( $P < 0.05$ ). Estos datos son representativos de tres experimentos independientes.

FIGURA 7. Incremento de células NK peritoneales en ratones del primer grupo BALB/cJ (restrictivos) infectados con *Taenia crassiceps*

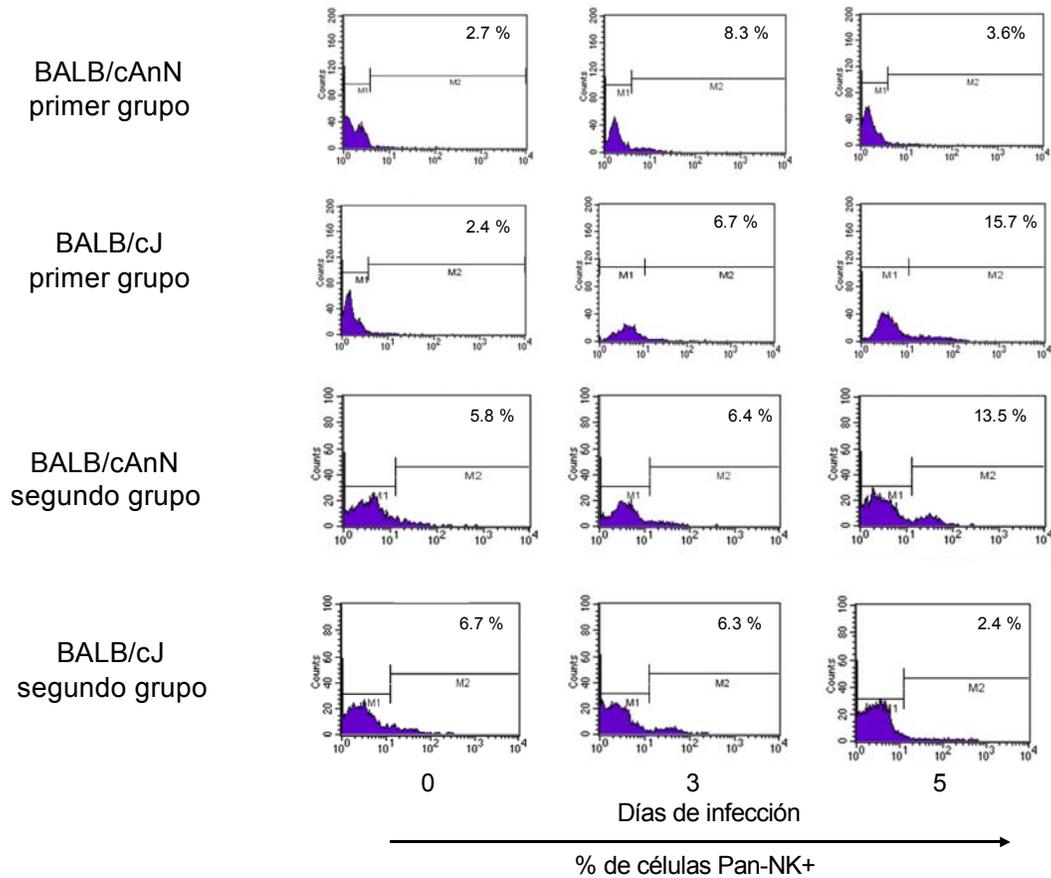


Figura 7. Histogramas representativos del porcentaje de células peritoneales Pan-NK+, de ratones hembras BALB/cAnN y BALB/cJ del primer y segundo grupos, de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos después de 3 y 5 días de infección. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes con  $n = 3$ .

Figura 8. Incremento de células Mac-3+ peritoneales en ratones del primer grupo BALB/cJ infectados con *Taenia crassiceps*

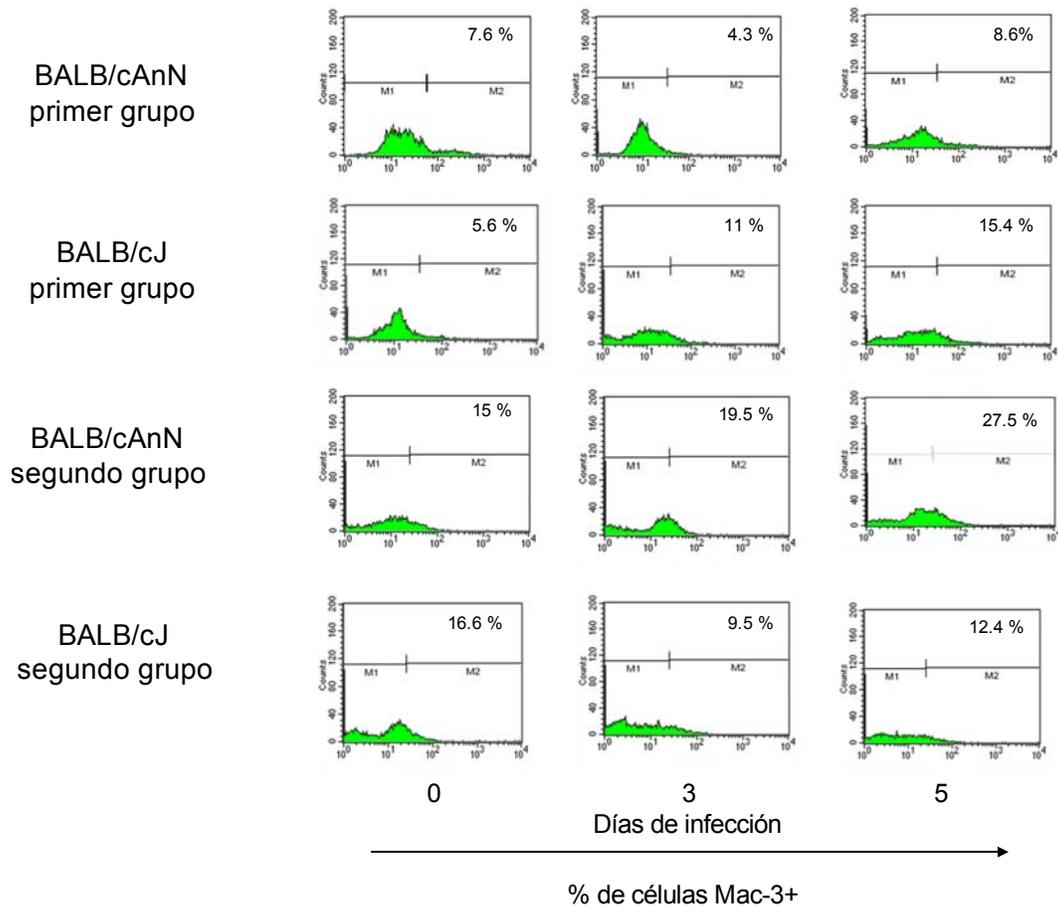


Figura 8. Histogramas representativos del porcentaje de células peritoneales Mac-3+ de ratones hembras BALB/cAnN y BALB/cJ del primer y segundo grupos, de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos después de 3 y 5 días de infección. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes con  $n = 3$ .

En el segundo grupo de ratones, no se encontraron diferencias significativas entre las dos sublíneas de BALB/c durante el tiempo estudiado; sin embargo, es notorio que desde el inicio ambas cepas tienen un mayor porcentaje de células NK, el cual se mantiene durante los tiempos de infección evaluados (Tabla 10).

Se encontró un mayor porcentaje de células en la cepa permisiva BALB/cAnN

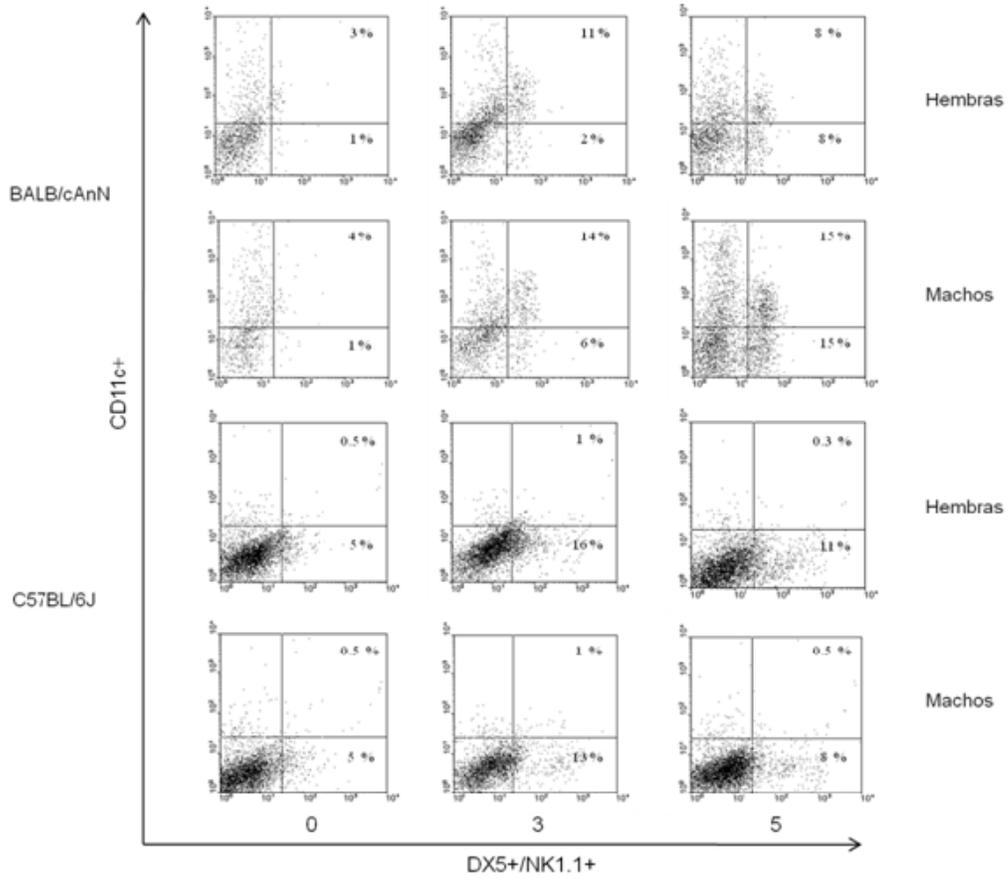
En cuanto a las diferencias encontradas entre hembras de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J, se halló en los ratones de la cepa BALB/cAnN controles un mayor porcentaje de células IKDCs (4% vs. 0.5%) (Figura 9), células dendríticas (4% vs. 1%) y macrófagos peritoneales (91% vs. 62%); al día 3 de infección hay un incremento significativo de células NKT, de 3% vs. 0.1% a favor de C57BL/6J (Tabla 11) y un incremento de IKDCs (16% vs. 0.3%) a favor de BALB/cAnN durante el quinto día de infección. El incremento de IKDCs en BALB/cAnN se mantiene (11% vs. 0.1%), y esto se ve reflejado en el porcentaje de células NK totales, siendo mayor en BALB/cAnN (21% vs. 8%) (Figura 10).

Mientras tanto, en este día se observó un decremento en BALB/cAnN en el porcentaje de linfocitos B con respecto a C57BL/6J (39% vs. 63%) (Tabla 11).

Con respecto a las diferencias de cepa entre machos, encontramos, al igual que en las hembras, que en los ratones controles hay un incremento de IKDCs a favor de BALB/cAnN (5% vs. 0.4%), células dendríticas (5% vs. 0.6%) y

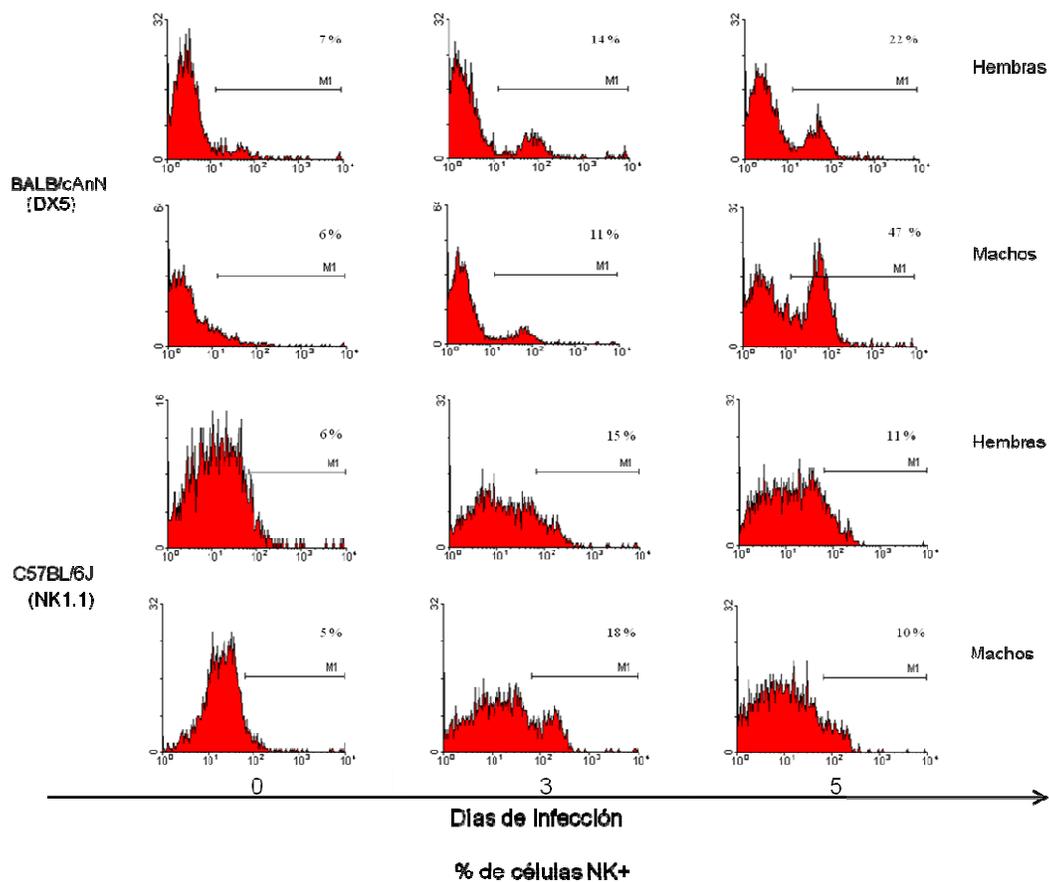
macrófagos peritoneales (90% vs. 76%); al día tres de infección se mantuvo la diferencia en el incremento del porcentaje de IKCDs en BALB/cAnN (16% vs. 0.6%), al igual que al quinto día (13% vs. 0.3%), además de un incremento del porcentaje de células NK totales en BALB/cAnN (46% vs. 9%); encontramos también un mayor porcentaje de células dendríticas en BALB/cAnN (4% vs. 2%).

Figura 9. Células IKDCs peritoneales en ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos infectados con *Taenia crassiceps*



Porcentaje de células doble positivas CD11c+/Nk1.1 (C57BL/6J) o DX5 (BALB/cAnN) presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos a los 3 y 5 días de infección. Las figuras son representativas de uno de tres experimentos independientes con  $n = 3$  a 5 ratones.

Figura 10. Células NK peritoneales en ratones BALB/cAnN y C57BL/6J infectados con *Taenia crassiceps*



Porcentaje de células doble positivas Nk1.1 (C57BL/6J) o DX5 (BALB/cAnN), presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos a los 3 y 5 días de infección. Las figuras son representativas de uno de tres experimentos independientes con  $n = 3$  a 5 ratones.

En cuanto a las diferencias entre sexos, en BALB/cAnN hay un incremento significativo del porcentaje de células NK totales a favor de los machos (46% vs. 21%) al día 5 de infección, mientras que en la cepa C57BL/6J encontramos al día 3 un incremento de células NKT, también a favor de los machos (7% vs. 3%) (Tabla 11).

Como puede observarse, las diferencias entre cepas están dadas desde el inicio por el incremento del porcentaje en BALB/cAnN de la población de células IKDCs; hay también mayor porcentaje de células dendríticas y macrófagos peritoneales. Durante la infección encontramos en BALB/cAnN mayor porcentaje de células IKDCs, y al día 5 una reducción de linfocitos B, así como un incremento en la población de células NK totales, mientras que en C57BL/6J hay diferencias en la población de células NKT en las hembras en el día 3. Por ello, la participación de las células NKs, en especial IKDCs, así como de las células dendríticas en BALB/cAnN no parece presentar una acción eficiente contra la instalación del cisticerco. La función de las células NKTs en la restricción a la instalación por C57BL/6J podría estar dada por la producción de citocinas.

Efectos de citotoxicidad celular a células del parásito, sin embargo no se descarta la acción de otras células en tiempos anteriores al tercer día, nuestro primer tiempo de infección evaluado.

Tabla 11. Porcentaje de células peritoneales NK, NKT, IKDCs, LB, células dendríticas y macrófagos en ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos infectados con *Taenia crassiceps*

	NK		NKT		IKDCs		LB		DCs		Macrófagos	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Control BALB/cAnN	7±2 <sup>a</sup>	5.3±3 <sup>a</sup>	2±1 <sup>a</sup>	1±1 <sup>a</sup>	4±0.9 <sup>a</sup>	5±0.01 <sup>a</sup>	50±1 0 <sup>a</sup>	45±10 <sup>a</sup>	4.8±3.5 <sup>a</sup>	5±4.7 <sup>ab</sup>	91±1 <sup>a</sup>	90±2 <sup>a</sup>
C57BL/6J	6±2.7 <sup>a</sup>	3.7±1. 5 <sup>a</sup>	1±0.6 <sup>a</sup>	1±0.8 <sup>a</sup>	0.5±0. 4 <sup>b</sup>	0.4±0.2 <sup>b</sup>	50±2 0 <sup>a</sup>	57±10 <sup>a</sup>	1±0.4 <sup>bc</sup>	0.6±0.4 c	62±8 <sup>b</sup>	76±1 2 <sup>b</sup>
Día 3 de infección												
BALB/cAnN	15±2 <sup>b</sup>	12±6 <sup>b</sup>	0.1±0. 5 <sup>b</sup>	0.7±0. 6 <sup>ab</sup>	16±6 <sup>c</sup>	16±2 <sup>c</sup>	53±1 0 <sup>a</sup>	45±5 <sup>a</sup>	4.3±3.9 ab	3.8±3.7 abc	75±2 1 <sup>b</sup>	77±2 <sup>b</sup>
C57BL/6J	17±1.4 b	14.7±7 b	3.2±1. 5 <sup>c</sup>	7.4±2. 8 <sup>d</sup>	0.3±0. 1 <sup>b</sup>	0.6±0.0 8 <sup>b</sup>	43±6 <sup>a</sup>	50±8 <sup>a</sup>	0.9±0.1 bc	0.7±0.1 c	48±1 0 <sup>b</sup>	49±1 0 <sup>b</sup>
Días 5 de infección												
BALB/cAnN	21±5 <sup>b</sup>	46±7 <sup>c</sup>	0.3±0. 1 <sup>b</sup>	0.1±0. 1 <sup>ab</sup>	11±2 <sup>c</sup>	13±2 <sup>c</sup>	39±2 <sup>b</sup>	30±3 <sup>b</sup>	4.5±4 <sup>ab</sup>	4.4±1 <sup>a</sup>	64±4 <sup>b</sup>	79±9 <sup>b</sup>
C57BL/6J	8.3±5. 7 <sup>a</sup>	9±0.01 a	1±0.2 <sup>a</sup>	3±2.3 ac	0.1±0. 1 <sup>b</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	63±1 3 <sup>a</sup>	42±1 <sup>a</sup>	2.9±4.4 abc	2.7±0.2 b	61±1 <sup>b</sup>	62±1 <sup>b</sup>

Promedio ± desviación estándar del porcentaje de las diferentes poblaciones celulares obtenidas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J controles e infectados con 10 cisticercos intraperitonealmente. Las literales muestran las diferencias significativas entre el promedio de cada fenotipo usando la prueba Mann-Whitney,  $P < 0.05$ . Los datos son representativos de tres experimentos independientes con  $n = 3$  a 6 ratones.

## Moléculas efectoras

El primer grupo de ratones de la cepa BALB/cJ tienen un mayor nivel de IFN $\gamma$  en el lavado peritoneal que BALB/cAnN

En el estudio entre sublíneas de BALB/cAnN evaluamos sólo la expresión de IFN $\gamma$  en lavados peritoneales de los ratones infectados del primer y segundo grupos.

En el primer grupo de ratones, encontramos un incremento en los niveles de IFN $\gamma$ , de 202 pg/ml en los ratones control de la cepa BALB/cJ con respecto a 54 pg/ml en los BALB/cAnN; durante la infección no se encontraron diferencias significativas en los niveles de IFN entre ambas cepas.

En el segundo grupo de ratones no se encontraron diferencias significativas entre ratones no infectados e infectados (Tabla 12).

Hay diferencias en la concentración de citocinas entre BALB/cAnN y C57BL/6J; estas diferencias varían con respecto al sexo

En el análisis de la respuesta temprana entre las cepas de BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos medimos IL-12 e IFN $\gamma$ , por ser dos de las principales citocinas proinflamatorias.

Entre cepas encontramos un incremento significativo de IFN $\gamma$  al día 5 en BALB/cAnN (215 pg/ml) con respecto a C57BL/6J (8 pg/ml), y entre machos se

observó al día 5 un incremento en C57BL/6J de IL-12 (615 pg/ml) con respecto a BALB/cAnN (216 pg/ml) (Tabla 13).

Entre sexos en la cepa BALB/cAnN encontramos un incremento significativo de IL-12 en las hembras (604 pg/ml) con respecto a los machos (381 pg/ml) al día 3 de infección, y al quinto día de infección hay un incremento de IFN $\gamma$  en las hembras (215 pg/ml) con respecto a los machos (35 pg/ml), y un incremento de IL-12 en los machos (216 pg/ml) con respecto a las hembras (108 pg/ml).

En la cepa C57BL/6J encontramos al día 3 un incremento en las hembras con respecto a los machos de IL-12 (612 pg/ml vs. 393 pg/ml), y al día 5 de infección un incremento de IFN $\gamma$  en los machos (615 pg/ml) en comparación con las hembras (197 pg/ml), así como de IL-12 de los machos (45 pg/ml) en comparación con las hembras (8 pg/ml).

Tabla 12. Niveles de IFN $\gamma$  en ratones BALB/cAnN y BALB/cJ infectados con *Taenia crassiceps*

IFN $\gamma$ (pg/ml) <sup>†</sup>		
Ratones control	Primer grupo	Segundo grupo
BALB/cAnN	54 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	375 $\pm$ 32 <sup>a</sup>
BALB/cJ	202 $\pm$ 44 <sup>b</sup>	362 $\pm$ 61 <sup>a</sup>
Día 3 de infección		
BALB/cAnN	174 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	447 $\pm$ 82 <sup>a</sup>
BALB/cJ	389 $\pm$ 262 <sup>b</sup>	316 $\pm$ 51 <sup>a</sup>
Día 5 de infección		
BALB/cAnN	200 $\pm$ 54 <sup>b</sup>	761 $\pm$ 191 <sup>a</sup>
BALB/cJ	267 $\pm$ 37 <sup>b</sup>	493 $\pm$ 224 <sup>a</sup>

Promedio + DS de los niveles de IFN-gamma (pg/ml) antes y después de tres y cinco días de infección en grupos de tres ratones. Las literales indican las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre columnas usando la prueba  $t$  no paramétrica. Estos datos son representativos de tres experimentos independientes.

Tabla 13. Niveles de IFN $\gamma$  e IL-12 en ratones BALB/cAnN y C57BL/6J infectados con *Taenia crassiceps*

	BALB/cAnN						C57BL/6J					
	Hembras			Machos			Hembras			Machos		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
IL-12 (pg/ml)	98 $\pm$ 78 <sup>a</sup>	604 $\pm$ 88 <sup>b</sup>	108 $\pm$ 90 <sup>a</sup>	133 $\pm$ 50 <sup>a</sup>	381 $\pm$ 54 <sup>c</sup>	216 $\pm$ 45 <sup>d</sup>	92 $\pm$ 40 <sup>a</sup>	612 $\pm$ 114 <sup>b</sup>	197 $\pm$ 139 <sup>acd</sup>	94 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	393 $\pm$ 43 <sup>c</sup>	615 $\pm$ 126 <sup>b</sup>
IFN $\gamma$ (pg/ml)	3 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	96 $\pm$ 56 <sup>b</sup>	215 $\pm$ 29 <sup>c</sup>	5 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 39 <sup>ab</sup>	35 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	9 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	145 $\pm$ 71 <sup>b</sup>	45 $\pm$ 5 <sup>b</sup>

†Promedio + DS de los niveles de IFN $\gamma$  e IL-12 de lavados peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos después de tres y cinco días de infección. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes usando ELISA. Las literales indican las diferencias significativas entre columnas,  $P < 0.05$ .

Resumen de la respuesta temprana evaluada entre BALB/cAnN y C57BL/6J

Al día cero se observa un incremento del porcentaje de macrófagos peritoneales, células dendríticas e IKCDs en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J. No se encontraron diferencias significativas entre sexos en ninguna de las dos cepas en los ratones controles.

Al día tres se observa un incremento de células IKCDs en BALB/cAnN en ambos sexos con respecto a C57BL/6J. Además, en las hembras de BALB/cAnN hay un número consistentemente mayor de cisticercos recuperados tras el sacrificio, así como un mayor número de cisticercos después de dos semanas en cultivo con respecto a C57BL/6J. Con respecto a la cepa C57BL/6J se observa un incremento de células NKTs, así como un mayor número de cisticercos dañados con respecto a BALB/cAnN. Entre los machos encontramos un incremento en el porcentaje de linfocitos totales en BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J.

En las diferencias entre sexos, en BALB/cAnN encontramos un incremento de IL-12, así como un mayor número de cisticercos recuperados al sacrificio y tras dos semanas después en cultivo, en las hembras con respecto a los machos. En C57BL/6J, se observa en las hembras un incremento de linfocitos totales e IL-12, y en los machos un incremento de neutrófilos.

Al día 5 de infección se encontró en las hembras BALB/cAnN un mayor número de cisticercos recuperados al tiempo de sacrificio y después de dos semanas en cultivo con respecto a las hembras de C57BL/6J.

Hay además en BALB/cAnN un incremento en el porcentaje de células IKCDs, células NK totales e IFN $\gamma$ , así como una disminución en el porcentaje de linfocitos B con respecto a C57BL/6J.

Entre machos encontramos un incremento en el porcentaje de linfocitos totales y de IKCDs en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J.

En las diferencias entre sexos de BALB/cAnN, se encontró en las hembras un mayor número de cisticercos recuperados y mayores niveles de IFN $\gamma$  que los machos, mientras que en los machos hay mayor porcentaje de células NK totales y mayores títulos de IL-12. En C57BL/6J se observa un incremento en machos de células NKTs, IL-12 e IFN $\gamma$  con respecto a las hembras.

La respuesta de BALB/cAnN podría beneficiar al parásito en vez de perjudicarlo. Considerando los resultados anteriormente presentados, en donde se observa que la cepa permisiva BALB/cAnN tiene un perfil inflamatorio incrementado con respecto a la cepa C57BL/6J (restrictiva), esto podría implicar que dicha respuesta facilita la instalación del cisticerco. A menudo los parásitos utilizan algunas de las moléculas de la respuesta inflamatoria, mismas que pueden favorecer su crecimiento y diferenciación; tal es el caso de *C. elegans* y *Schistosoma mansoni* con el factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) (Patterson et al., 2000; Braeckman et al., 2001; Davies et al., 1998; Knobloch et al., 2004).

En virtud de lo anterior, se evaluaron las concentraciones de TGF $\beta$  en los lavados de la cavidad peritoneal de los ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos durante los días 3 y 5 de infección, y no se encontraron diferencias significativas entre cepas ni entre sexos (Tabla 14); esto llama la atención, ya que las principales células que producen esta molécula son linfocitos y macrófagos, y ambas poblaciones celulares están incrementadas en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J. Ello podría sugerir que si en BALB/cAnN se secreta más TGF $\beta$ , el parásito puede estar utilizando ese factor, por lo que no se encontrarían diferencias con C57BL/6J.

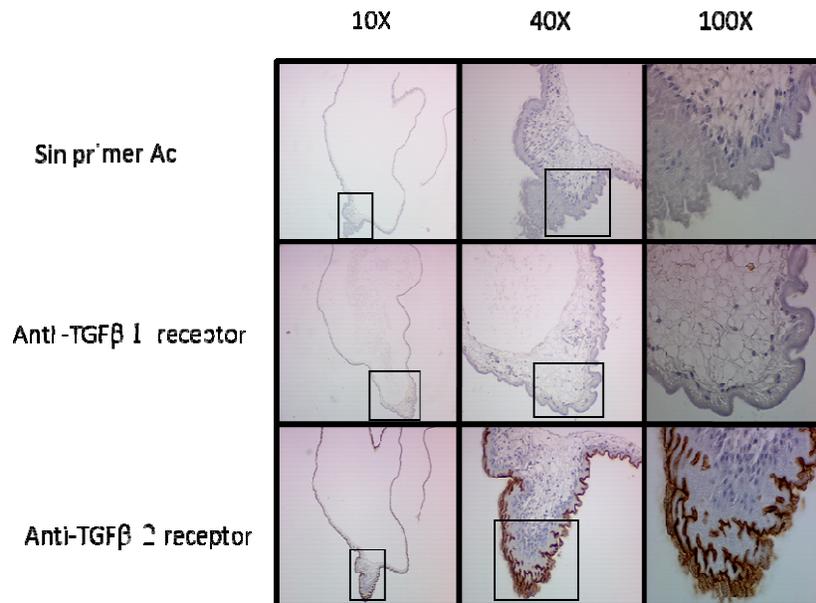
En estudios adicionales realizados en el laboratorio se evaluó la expresión del receptor TGF $\beta$ -1 y TGF $\beta$ -2 en el cisticerco. Se encontró expresión del receptor TGF $\beta$ -2 en el tegumento de los cisticercos, y ésta es mayor en la zona de gemación (Figura 11).

Tabla 14. Niveles de TGF $\beta$  en lavados peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos

	BALB/cAnN			C57BL/6J		
	0	3	5	0	3	5
Hembras	193 $\pm$ 156 <sup>a</sup>	153 $\pm$ 126 <sub>a</sub>	118 $\pm$ 66 <sub>a</sub>	153 $\pm$ 67	164 $\pm$ 105 <sub>c</sub>	213 $\pm$ 165 <sub>c</sub>
Machos	150 $\pm$ 106 <sup>a</sup>	236 $\pm$ 105 <sub>b</sub>	119 $\pm$ 84 <sub>a</sub>	185 $\pm$ 167	165 $\pm$ 91 <sup>d</sup>	143 $\pm$ 71 <sup>d</sup>

Promedio  $\pm$  desviación estándar de los niveles de TGF $\beta$  en lavados peritoneales con SSI de ratones infectados con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* a los 3 y 5 días de infección.  $n = 3$  a 5 ratones.

Figura 11. Localización de los receptores TGF $\beta$  I y II en el tegumento del cisticerco de *Taenia crassiceps*



Inmunolocalización de los receptores para TGF $\beta$  I y II en el tegumento de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

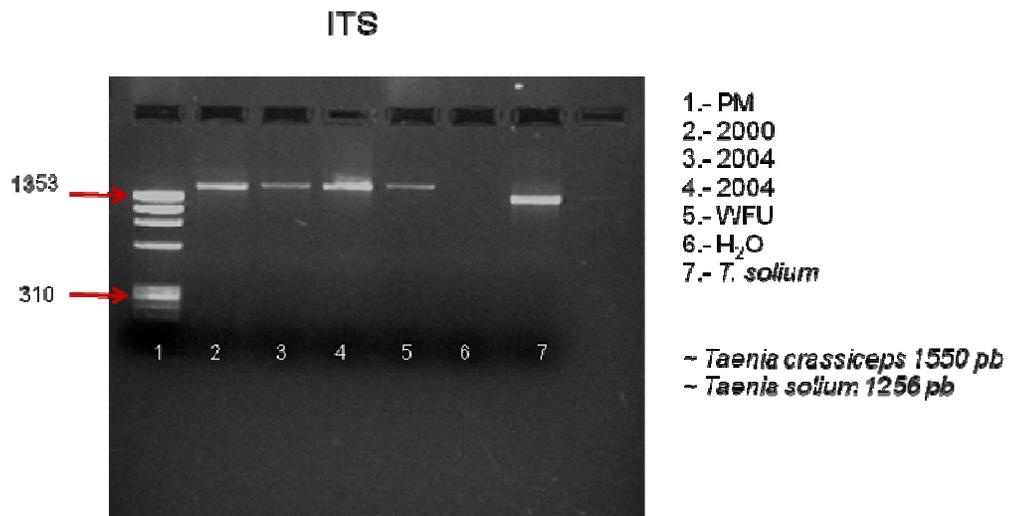
No encontramos modificaciones en el parásito tras la renovación de la cepa del hospedero a través del análisis del espaciador transcrito interno (ITS)

Adicionalmente se evaluaron posibles modificaciones genéticas en el parásito que podrían estar relacionadas con los cambios de permisividad/restrictividad a la infección observada entre las sublíneas de BALB/cAnN y BALB/cJ. Para ello se estudiaron cambios en la secuencia del ITS, la cual se ha utilizado ampliamente para evaluar cambios inter e intraespecíficos en diferentes parásitos, incluyendo tenias.

Se analizó la secuencia del ITS1 e ITS2, amplificado de DNA de cisticercos utilizados durante la infección del primer grupo de ratones, que corresponden a cisticercos colectados en el año 2000 y guardados en etanol 70% a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y de los cisticercos utilizados durante la infección del segundo grupo de ratones. Además se evaluó la variabilidad del ITS en tres cisticercos de *T. crassiceps*, obtenidos de un mismo ratón, así como cuatro de ratones diferentes.

Como se observa en la figura 12, se encontró que el ITS de *Taenia crassiceps* tiene un tamaño aproximado de 1550 pares de bases, mientras que en *Taenia solium* tiene un tamaño de 1256, como se había reportado previamente (Mayta et al., 2000).

Figura 12. Expresión del ITS en cisticercos de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*.



En el análisis de las secuencias de los amplificadores se encontró que entre los cisticercos utilizados para infectar el primer y segundo stocks de ratones no hay diferencias en la secuencia del ITS1 (Tabla 15). Sin embargo, en los cisticercos obtenidos de diferentes ratones, una guanina es remplazada por una timina en la posición 427, mientras que en los cisticercos utilizados para infectar el primer y segundo grupos de ratones hay una guanina en vez de una timina en las posiciones 449 y 457 (Tabla 15).

En cuanto al ITS2, encontramos en la posición 302 el remplazo de una citosina por una guanina, y encontramos once diferencias comparando la secuencia de nuestros cisticercos con la secuencia de ITS2 reportada obtenida del estado adulto de *Taenia crassiceps* (GenBank Accession No. QD099564) (Tabla 16).

Tabla 15. Polimorfismo de ITS1 en cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	Posición del carácter variable para ITS1		
	427	449	457
2000	T	N	T
2004	T	T	T
1	G	G	G
2	T	G	G
3	T	G	G
4	G	G	G
5	G	G	G
6	T	G	G
7	T	G	G

Análisis de las secuencias de los amplificadores de la región ITS1. Se encontraron diferencias en la posición de tres bases. Se utilizaron cisticercos que infectaron a los ratones del primer grupo y recuperados en el año 2000, cisticercos que infectaron al segundo grupo y recuperados en el año 2004. Los cisticercos del 1 al 3 fueron recuperados de un mismo ratón, y del 4 al 7 fueron recuperados de cuatro ratones distintos.

Tabla 16. Polimorfismo de ITS2 en cisticercos de *Taenia crassiceps*

	Posición de la base variable para ITS2												
	302	322	278	279	280	281	283	285	286	287	660	661	662
2000	C	C	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
2004	C	G	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
1	G	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
2	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
3	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
4	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
5	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
6	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
7	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
ITS2	C	G	C	T	T	G	A	G	A	T	G	A	G
QD09956													
4													

Análisis de las secuencias de los amplificadores de la región ITS2. Se observa el remplazo de una guanina por una citosina en la posición 302 en la secuencia del ITS2 de cisticercos recuperados en los años 2000 y 2004. Secuencia del ITS2 de cisticercos recuperados de un mismo ratón de 1 al 3, y cada uno de diferente ratón del 4 al 7.

## 10. DISCUSIÓN

En la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* se ha encontrado relevante la participación genética (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al., 1998), sexual (Larralde et al., 1995; Morales-Montor et al., 1996; 2003) e inmunológica (López-Briones et al., 2003<sup>a</sup>; 2003<sup>b</sup>) del hospedero en mediar las diferencias de permisividad a la instalación y reproducción del cisticerco.

En las diferentes cepas evaluadas hasta el momento se ha encontrado que los ratones de la cepa BALB/c son más permisivos a la cisticercosis experimental que las cepas de la línea C57BL, y dentro de la línea BALB/c se han identificado diferencias entre dos sublíneas, siendo BALB/cAnN permisiva y BALB/cJ restrictiva. Esta diferencia en la permisividad entre BALB/cAnN y BALB/cJ se encontró asociada con la expresión de la proteína Qa-2 en BALB/cJ (Fragoso et al., 1998), así como con un incremento en la respuesta proliferativa de esplenocitos, altos niveles de IL-2 inducidos por antígeno de cisticerco de BALB/cJ y un decremento en la población de esplenocitos CD4+ y CD8+ TCR V $\beta$ 2 en ratones BALB/cAnN (López-Briones et al., 2003). Estos estudios se realizaron en condiciones en las que el parásito se encontraba establecido en el hospedero. Es concebible entonces que los eventos tempranos son determinantes en el destino de la parasitosis. Considerando este supuesto, el presente trabajo se diseñó con el propósito de explorar la respuesta inmune temprana, hacia la identificación de los eventos inmunológicos involucrados en mediar las diferencias de permisividad entre ambas sublíneas.

En el estudio de la respuesta temprana entre ratones de una misma cepa con diferente grado de permisividad: BALB/cAnN (permisiva) y BALB/cJ (restrictiva). Los resultados obtenidos muestran que en tiempos tempranos de la infección BALB/cJ presenta un mayor porcentaje de macrófagos peritoneales y células NK que BALB/cAnN. El incremento de estas poblaciones celulares podría ser favorecido por el aumento de IFN $\gamma$  que presentan estos ratones desde antes de la infección; se sabe que esta citocina puede acelerar el proceso de activación y acción de las células NK y los macrófagos hacia una respuesta proinflamatoria, misma que podría participar en la eliminación del parásito.

La participación directa de estos tipos celulares sobre el parásito resulta factible, considerando que éste entra fragmentado al hospedero, y está más expuesto a posibles acciones de células y moléculas del hospedero que podrían mediar un daño de mayor extensión en los mismos. De hecho, se ha observado que las diferencias en la permisividad a la infección entre sublíneas de BALB/c sólo se presentan cuando la infección se realiza con agujas de menor calibre (27G), que reducen el tamaño de los fragmentos parasitarios inyectados en la cavidad peritoneal. En contraste, cuando la infección se realiza con agujas de mayor calibre (20G), el parásito ingresa al hospedero prácticamente intacto y las diferencias de permisividad a la infección desaparecen. Estas observaciones explican en parte que algunos grupos de investigación reporten a la cepa BALB/cJ como permisiva, considerando que la infección en estos estudios se ha realizado con el parásito íntegro (Mooney et al., 2000).

Los cambios en las instalaciones del bioterio del Instituto en el año 2002, de convencional a libre de patógenos, aunados a los cambios en los parentales de las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ, se asociaron con la desaparición de las diferencias en la permisividad de las sublíneas de BALB/c, así como el perfil celular diferencial encontrado. Es factible que las nuevas cepas adquiridas presenten diferencias con las originalmente disponibles en el bioterio, que se habían mantenido durante más de diez años. Se ha reportado extensamente la posibilidad de que durante el cruzamiento de cepas endogámicas ocurran modificaciones genéticas, y de que se acumulen aumentando el número de cruces. Por ejemplo, la separación de la cepa BALB/c ocurrida desde 1947 ha generado diferentes sublíneas con diferencias tanto fenotípicas como genotípicas, como BALB/cAnN y BALB/cJ (Ciaranello et al., 1974; Potter and Wax, 1981; Pollarf et al., 1982; Mellor et al., 1985; Shi et al., 1989; Fragoso et al., 1998; Larralde et al., 1995; Aldridge et al., 2007; Kumar et al., 2009).

Adicionalmente, es factible que en el cambio de permisividad en la capacidad de desarrollo de la cisticercosis en las sublíneas de BALB/c pudieran participar las modificaciones en la exposición a otros patógenos

presentes en un bioterio convencional en comparación con un bioterio libre de patógenos. En este sentido, se ha reportado que infecciones concomitantes pueden modificar la capacidad de crecimiento en la cisticercosis experimental (Rodríguez et al., 1999), y se han reportado claras diferencias en ratones mantenidos en condiciones libres de patógenos y ratones mantenidos en casa en cuanto a las características morfológicas en placas de Peyer, así como un aumento en la proporción de las células M; ambas características se ven favorecidas en ratones mantenidos en casa y claramente pueden influir en su respuesta a antígenos (Smith et al., 1987).

Con el cambio en las cepas de ratones y tras las diferencias encontradas en BALB/cAnN y BALB/cJ, nos preguntamos si otras cepas, como C57/BL6J (adquirida en laboratorios Harlan) y TgB1 (ratones que fueron incorporados por cesárea al bioterio libre de patógenos), aún mantenían su característica restrictiva a la instalación y reproducción del parásito (Fragoso et al., 1996; 1998). Los resultados señalan que, al igual de BALB/cJ, los ratones TgB1 son ahora tan permisivos como BALB/cAnN. En este caso podríamos pensar que la diferencia en el mantenimiento de los animales fue suficiente para los cambios

encontrados hacia la cisticercosis experimental murina; sin embargo, los ratones TgB1 no se han monitoreado desde el año 2002 para seleccionar a los parentales de cada cruce, por lo que aunque expresan la proteína Qa-2 no tenemos la certeza de que conservan el transgén, tomando en cuenta que el fondo del transgénico es C57BL/6J (Fragoso et al., 1998). La cepa C57BL/6J conservó su capacidad restrictiva a la instalación y reproducción del parásito, lo que pone de manifiesto la condición multifactorial para la restricción de esta parasitosis. La literatura reporta la expresión de la proteína Qa-2 en los esplenocitos (Fragoso et al., 1996; 1998) en las cuatro cepas evaluadas.

Estos resultados señalan que, en el caso de BALB/cJ y TgB1, se ha perdido la expresión de la proteína Qa-2, así como su posible relevancia en mediar los procesos de restricción en la cisticercosis causada por *T. crassiceps* en estas condiciones ha perdido.

En el intento de identificar si estos cambios podrían haber determinado modificaciones en el genoma del parásito que se reflejaran en su capacidad de crecimiento, se estudió la variabilidad genética del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Los cisticercos utilizados en este trabajo son de la cepa ORF. Estos cisticercos fueron aislados por primera vez de una cepa de infección natural por Freeman en 1962, y desde esa fecha se han mantenido por pases intraperitoneales en ratones BALB/c. La cepa fue donada a nuestro grupo de investigación en 1986, y también se ha mantenido también por pases intraperitoneales de ratón a ratón cada dos meses. Esta forma de mantenimiento se logra gracias a la capacidad de los cisticercos de esta cepa de reproducirse de manera asexual por gemación (Smith et al., 1972). Considerando su reproducción por gemación, es factible que ocurrieran mutaciones en los parásitos capaces de actuar en el cambio de la permisividad de las sublíneas. Para evaluar posibles variaciones entre los parásitos, se realizó un estudio de variabilidad genética, utilizando del DNA ribosomal la región del “espaciador transcrito interno” (ITS), que se ha utilizado para la identificación inter e intraespecífica de distintas especies de tenia, así como para diagnóstico (Luton et al., 1992; Wachira et al., 1993; Bowles and McManus, 1994; Mayta et al., 2000; Cuervo et al., 2004). En el análisis de la secuencia del ITS no se encontraron diferencias entre el DNA de cisticercos obtenidos del primer y segundo stocks de ratones BALB/cAnN. Este resultado no invalida la posibilidad de que variaciones genéticas en otras regiones del parásito se hayan presentado como consecuencia de su constante reproducción por gemación, y que se asocien con una mejor adaptación de crecimiento en la cepa restrictiva BALB/cJ.

De hecho, al evaluar los polimorfismos de esta secuencia entre muestras de cisticercos obtenidas del primer y segundo grupos de ratones, así como de distintos cisticercos procedentes de un mismo ratón BALB/cAnN, se

encontraron en el ITS1 cambios en la posición 427 (guanina por timina), 449 (timina por guanina) y 457 (timina por guanina) (Tabla 16). De manera similar, para la secuencia ITS2 se encontró un cambio en la posición 302 de guanina por citosina, y con respecto al reportado en el banco de genes (QD099564) se encontraron 12 cambios (Tabla 17). Para explicar esto hay que observar que la secuencia se obtuvo de una tenia, el estado adulto del parásito, y considerando que los cisticercos de ORF presentan mutaciones (Kuhn, 1971), las diferencias encontradas con las secuencias amplificadas de los cisticercos ORF son de esperarse.

Para continuar con el estudio de la participación de la respuesta temprana en mediar las diferencias de permisividad, y debido a que BALB/cJ es tan permisiva como BALB/cAnN, decidimos evaluar la respuesta temprana entre BALB/cAnN y C57BL/6J, la cepa más restrictiva a la instalación y el crecimiento del parásito (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al 2008).

En la respuesta inmune hacia la cisticercosis experimental murina se ha reportado que en la cepa BALB/c hay una respuesta polarizada tipo Th1 durante las tres primeras semanas de infección, con altos niveles de IFN $\gamma$  (Toenjes et al, 1999; Terrazas et al, 1999), IgG2a específicos y macrófagos activados que producen una fuerte respuesta proinflamatoria (Rodríguez-Sosa et al., 2002); esta respuesta se ha considerado restrictiva a la reproducción del parásito, debido a que durante este tiempo el número de parásitos es bajo comparado con tiempo tardíos, cuando la carga parasitaria se incrementa notablemente (Toenjes et al, 1999; Terrazas et al, 1999). Con estos

antecedentes, al evaluar la respuesta temprana en BALB/cAnN y C57BL/6J se esperaba un claro incremento en la respuesta de ratones restrictivos C57BL/6J; sin embargo, durante los días 3 y 5 de infección se encontró que la mayor respuesta inflamatoria se presentó en la cepa más permisiva BALB/cAnN, en la cual hay un mayor porcentaje de células peritoneales NK totales, IKDCs, así como mayores niveles de IFN $\gamma$ , además de un mayor número de cisticercos vesiculares recuperados en comparación con los ratones de la cepa restrictiva C57BL/6J.

En la cepa C57BL/6J se encontró un mayor porcentaje de células NKT y los ratones presentaron casi todos los cisticercos dañados o coloidales.

Estos resultados sugieren que la respuesta de los ratones BALB/cAnN no resulta protectora, sino más bien podría facilitar la restructuración e instalación del parásito, ya que los parásitos recuperados de estos animales, después de dos semanas en cultivo, logran crecer y gemar; en cambio, los cisticercos recuperados de ratones C57BL/6J casi todos son coloidales, y después de dos semanas in vitro no aumentan su tamaño ni geman; por el contrario, casi todos se calcifican.

Algunos parásitos, como *Echinococcus multilocularis* (Schussler et al., 1997), *C. elegans* (Zavala-Gongora et al., 2003; Freitas et al., 2005) y *Schistosoma mansoni* (Davies et al., 1998; Kinobloch et al., 2004), utilizan moléculas producidas por el hospedero como el TGF $\beta$  o el EGF para promover su reproducción y diferenciación a través de receptores, en los cuales se ha encontrado una homología estructural y funcional con el hospedero.

Entre estas moléculas, el TGF $\beta$ , además de regular funciones reproductivas y de diferenciación (Brehm, 2003), es capaz de modular la respuesta inmune inflamatoria del hospedero (Dissous et al., 2006). Considerando que las principales células productoras de factores de crecimiento como el TGF $\beta$  son los linfocitos y macrófagos, que se presentaron en mayor cantidad en la cepa permisiva, se decidió evaluar los niveles de TGF $\beta$  en el lavado peritoneal de los ratones de ambas cepas permisivas y restrictivas a la infección. No se encontraron diferencias en los niveles de TGF $\beta$  en el líquido peritoneal de los ratones infectados de ambas cepas. Esto podría deberse a que los cisticercos en BALB/cAnN pudieran utilizar el factor para su reestructuración y reproducción, mientras que los cisticercos en C57BL/6J no utilizan, los productos de secreción de las células peritoneales, ya que en su mayoría están muy dañados y posteriormente morirán.

Simultáneamente se evaluó la expresión del receptor TGF $\beta$  1 y 2 en los cisticercos, y se encontró que *Taenia crassiceps* expresa el receptor para TGF $\beta$  2 en mayor concentración hacia la zona de gemación. Se ha comenzado a evaluar la producción de TGF $\beta$  durante la respuesta temprana en ratones permisivos a la cisticercosis, así como su posible utilización por el cisticerco para su reestructuración y exitosa instalación.

Se han identificado cinco diferentes tipos de receptores para TGF $\beta$ : los receptores funcionales, como el tipo I (T $\beta$ RI, de 53 a 65 kDa) y el tipo II (T $\beta$ RII, de 83 a 110 kDa), y los receptores no funcionales, que incluyen el tipo III (T $\beta$ RIII, de 250 a 310 kDa), tipo IV (T $\beta$ RIV, de 60 kDa) y el tipo V (T $\beta$ RV, de

400 kDa) (Massague, 1992). Hasta ahora se sabe que el TGF $\beta$  se\u00f1aliza por la uni\u00f3n a los receptores serina-treonina cinasa T $\beta$ RI y T $\beta$ RII; sin embargo, los efectos biol\u00f3gicos son mediados principalmente por T $\beta$ RI (Ohtsuki, 1992). La expresi\u00f3n constitutiva de receptores produce la activaci\u00f3n del receptor T $\beta$ RII de TGF $\beta$ , el cual puede homodimerizarse de manera independiente del ligando, a trav\u00e9s de las regiones extracelular-transmembranal. Sin embargo, la homodimerizaci\u00f3n del receptor II de TGF $\beta$  no es capaz de transducir una se\u00f1al funcional (Feng y Derynck, 1997). La expresi\u00f3n s\u00f3lo de T $\beta$ RII en *Taenia crassiceps* y su transducci\u00f3n de se\u00f1al de TGF $\beta$  tendr\u00e1n que evaluarse, considerando la posibilidad de que el T $\beta$ RI en *T. crassiceps* no sea hom\u00f3logo al que se utiliz\u00f3 para su identificaci\u00f3n.

En general, los resultados presentados en este trabajo de investigaci\u00f3n se\u00f1alan a la posibilidad de que una respuesta efectora montada antes del tiempo evaluado en el estudio y el incremento del porcentaje de c\u00e9lulas NKTs a los d\u00edas 3 y 5 en los ratones C57BL/6J resulte en un da\u00f1o del par\u00e1sito y que \u00e9ste se encuentre sin posibilidades de instalarse ni reproducirse. Mientras tanto, el incremento de c\u00e9lulas (NK, IKDCs) compatibles con una mayor respuesta inflamatoria promueve el establecimiento y crecimiento del par\u00e1sito en los ratones BALB/cAnN.

En tiempos tempranos llama la atenci\u00f3n que la acci\u00f3n de las c\u00e9lulas NK e IKDCs no parece ser efectiva para el control de la cisticercosis; entre las principales funciones de las c\u00e9lulas NK est\u00e1 la producci\u00f3n de citocinas y quimiocinas proinflamatorias; nosotros evaluamos los niveles de IFN $\gamma$  como un

primer acercamiento al estudio de la respuesta temprana, puesto que es una citocina clave en la activación clásica de macrófagos y de las mismas células NK, induciendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria.

En este caso, a pesar del gran incremento en el porcentaje de esta población celular en BALB/cAnN, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de esta citocina entre BALB/cAnN y C57BL/6J, lo que podría implicar que todas estas células la utilizan, y por esa razón no se detecta en los lavados peritoneales; es muy importante considerar la evaluación de otras citocinas producidas por las células NK y que podrían actuar en esta respuesta, como  $TNF_{\alpha}$ , IL-3, GM-CSF y M-CSF, así como ciertas quimiocinas, MIP-1, MIP-1 $\beta$  y RANTES, de gran importancia en los fenómenos inflamatorios.

Otra función importante de las células NK es la eliminación de células blanco por procesos de citotoxicidad celular; conociendo que las células NK pueden reconocer células blanco a través de receptores CD16 y considerando que los cisticercos pueden tener anticuerpos unidos a ellos, éstos podrían ser reconocidos por su extremo Fc. Ninguno de los mecanismos de acción de las células NK parece ser eficientes en el control de la instalación del cisticerco.

En el caso de las células IKDCs, una población recientemente descrita de células NK (NK+CD11c+B220+) tiene la cualidad de funcionar en un principio como células NK, incrementando los marcadores de estas células (producen  $IFN_{\gamma}$  y son capaces de eliminar células blanco por citotoxicidad celular) y en tiempos más avanzados como células dendríticas, capaces de procesar antígenos y presentar en órganos linfoides secundarios (Shortman K. y

Villadangos. 2006; Chaput et al., 2006), aunque en esta función no son tan eficientes como las células dendríticas convencionales. Consideramos que la función principal de estas poblaciones celulares en tiempos tempranos de la infección consiste en la producción de citocinas, que estarían promoviendo una mayor activación de la respuesta proinflamatoria. En cuanto a la función de citotoxicidad, no podemos descartar que las dos poblaciones de células NK reconozcan al cisticerco de *T. crassiceps* y que éstas puedan tener efectos citotóxicos sobre células del parásito; sin embargo, esto es algo que deberá evaluarse.

La posibilidad de que en la cepa restrictiva C57BL/6J las células NKT, o una respuesta en tiempos anteriores a los evaluados en este estudio, medien directa o indirectamente el daño al parásito se fortalece considerando las observaciones de Reyes y colaboradores en 2009. En este trabajo, los autores demuestran que células presentadoras de antígeno derivadas de la médula ósea de ratones C57BL/6J estimulados con antígeno de *T. crassiceps* se activan de manera más eficiente que las provenientes de ratones BALB/cAnN. Es factible que una activación tardía o ineficiente de la respuesta temprana en los ratones BALB/cAnN, aunada a la liberación de moléculas como TGF $\beta$ , podría participar en la reconstitución e instalación del parásito, dando como resultado la permisividad a la instalación y reproducción del mismo.

Otro factor biológico relevante en mediar las diferencias de permisividad es el sexo. Desde que comenzó a utilizarse la cisticercosis murina como modelo experimental de cisticercosis se observó que las hembras son más permisivas

a la infección que los machos (Larralde et al., 1995; Morales-Motor, 1996). Por otro lado, se ha observado que durante infecciones crónicas el parásito es capaz de cambiar el ambiente hormonal del hospedero, y una vez “feminizado” logra reproducirse de manera que en los machos la carga parasitaria se iguala con las hembras después de varios meses de infección (Larralde et al., 1995).

Se estudió la participación de los factores sexuales en mediar las diferencias de permisividad al crecimiento del parásito, y se ha determinado que un ambiente con estradiol (E2) y progesterona (P4) estimula la reproducción e infectividad del cisticerco, mientras que un ambiente con testosterona (T4) y dihidrotestosterona (DTH) inhibe tanto la reproducción como la infectividad (Escobedo et al., 2004).

Con el fin de evaluar si la respuesta temprana es más eficiente en el sexo más restrictivo, en este trabajo comparamos la composición celular peritoneal en hembras y machos de ratones permisivos BALB/cAnN y restrictivos C57BL/6J para el crecimiento del parásito. Observamos en los machos de la cepa BALB/cAnN un mayor porcentaje de células NK totales, mientras que en las hembras hay un incremento significativo del número de cisticercos vesiculares recuperados, así como un incremento en los niveles de IFN $\gamma$ . Esto sugiere que la acción de las células NK podría retrasar la reproducción del parásito, dado que los cisticercos obtenidos en estos tiempos de infección logran crecer después de permanecer dos semanas en cultivo, pero no reproducirse, a diferencia de los recuperados de las hembras de la misma cepa; este posible

efecto de las células NK en el retraso de la reproducción en los cisticercos, así como sus mecanismos de acción, deberán evaluarse.

El incremento de IFN $\gamma$  en las hembras pudiera reflejar que, a pesar de la existencia de moléculas activadoras de la respuesta proinflamatoria, ésta no es suficiente para controlar la instalación y reproducción del parásito. De hecho, en la relación hospedero-parásito se establecen asociaciones muy complejas, en las que difícilmente una sola molécula podría controlar un parásito.

Otro resultado de interés es la observación de que dependiendo del ambiente inmunoendocrinológico al que se enfrentó el parásito, éste queda sensibilizado a cierto destino. Los parásitos recuperados luego de tres días en el peritoneo de machos BALB/cAnN, tras permanecer dos semanas en cultivo, no fueron capaces de crecer ni gemar. Mientras tanto, parásitos obtenidos en condiciones equivalentes de hembras de la misma cepa crecen y geman tras dos semanas en cultivo. En experimentos similares realizados con parásitos provenientes de ratones C7BL/6J de ambos sexos no se observaron diferencias entre la capacidad de crecimiento de los parásitos recuperados. Ni los parásitos provenientes de hembras ni los recuperados de machos crecieron, y casi todos murieron después de dos semanas. Esta observación nos permite concluir que el ambiente de C57BL/6J implica un daño irreversible al parásito, de una magnitud que no permite observar diferencias entre factores relacionados con el sexo.

En resumen, en este trabajo de tesis se estudiaron los eventos inmunológicos y endócrinos tempranos ocurridos durante la infección en hospederos con diferente permisividad al crecimiento del parásito, determinada por el sexo y por la cepa de ratones. Los resultados obtenidos señalan la complejidad de la relación hospedero-parásito, en donde la respuesta inmune pudiera no ser benéfica para el hospedero, y sugieren algunos de los componentes que podrían mediar restricción o permisividad a la reproducción del parásito.

## 11. CONCLUSIONES

La restictividad en los ratones BALB/cJ, está relacionada con un incremento al día 5, en el porcentaje de células NK y macrófagos peritoneales, así como un incremento de IFN $\gamma$  en la cavidad peritoneal de los ratones antes de la infección.

El cambio del bioterio de convencional a libre de patógenos, ocasionó la perdida en las diferencias de permisividad entre las sublíneas de BALB-cJ y BALB/cAnN, anulando también las diferencias de la repuesta inmune encontrada.

La correlación en la expresión de la proteína Qa-2 y la restrictividad a la instalación y reproducción del cisticerco dejo que existir en las cepas BALB/cJ y TgB1 en estas nuevas condiciones de mantenimiento.

No se encontraron cambios asociados al ITS entre los cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizados durante el estudio que pudieran estar relacionados con el cambio en la restrictividad a la cisticercosis en BALB/cJ.

La cepa C57BL/6J continua siendo restrictiva a la instalación y reproducción del parásito, lo que pone de manifiesto la participación multifactorial en el control de la cisticercosis.

En el estudio de la respuesta temprana entre BALB/cAnN y C57BL/6J, se encontró un incremento de la respuesta inmune en la cepa permisiva

BALB/cAnN, dada por células NK, IKDCs e IFN $\gamma$  sugiere que esta respuesta podría resultar facilitadora a la instalación del parásito.

La expresión del receptor TGF $\beta$ 2 en *Taenia crassiceps*, señala que la producción de estas moléculas por las células inmunes, podrían ser utilizadas a favor del parásito para lograr su instalación y reproducción en el hospedero.

En la cepa restrictiva C57BL/6J una respuesta dada antes del tiempo estudiado así como el incremento de IL-12 al día 3 de infección son determinantes en el control a la instalación del cisticerco, dañándolo y ocasionando su muerte.

La participación de los factores sexuales en la cepa permisiva esta dado por un incremento de células NK en los machos. La participación de estas células podría estar en el retraso de la reproducción del cisticerco, ya que este logra instalarse exitosamente y los mecanismo bajo los cuales actúan deben ser evaluados.

En la cepa restrictiva C57BL/6J, no se detectaron cambios en la restrictividad a la infección entre sexos, ya que en ambos los cisticercos no logran instalarse y mueren.

## 12. PERSPECTIVAS

Evaluar la participación de TGF $\beta$  en la estructuración y reproducción del cisticerco.

Estudiar el efecto de las células NK en el retraso de la reproducción del cisticerco en los machos de la cepa permisiva BALB/cAnN.

Evaluar la función de las células IKDCs en la cepa BALB/cAnN y su función como CPA.

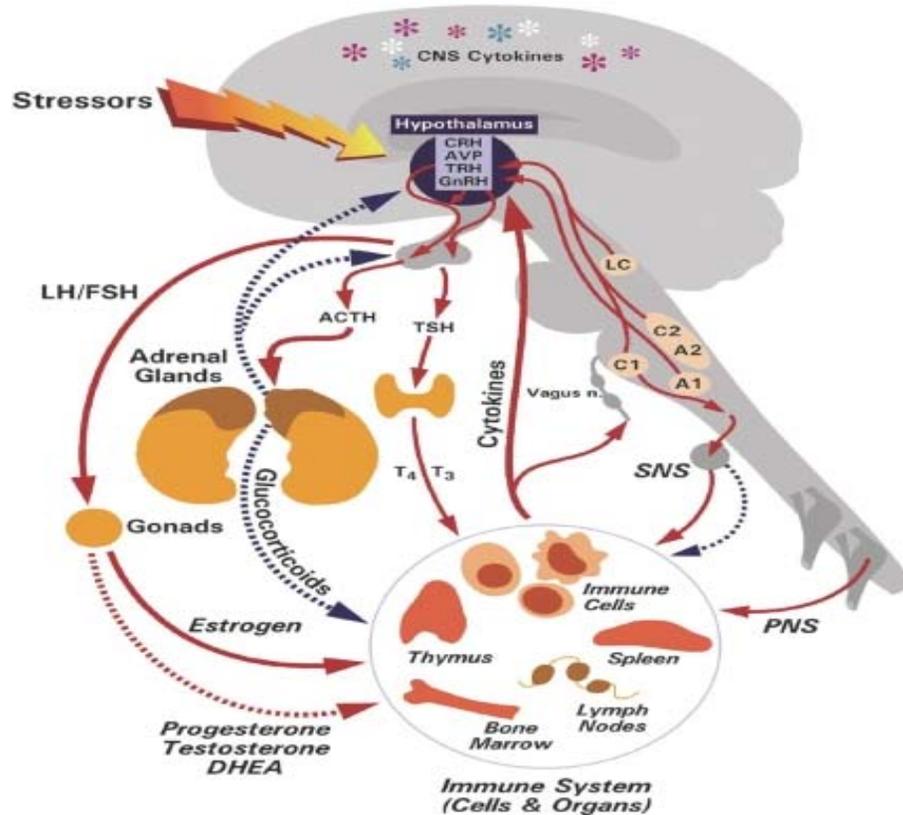
Estudiar la respuesta temprana antes de los tiempos estudiados durante este trabajo en la cepa C57BL/6J, así como la función de las células NKT en el control de la cisticercosis.

### 13. APÉNDICE I. Respuesta neuroinmunoendócrina

La comunicación entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune ocurre por vías bidireccionales (Nagy y Berczi, 1978; Besedovsky et al., 1981; Berczi et al., 1998), a través de moléculas tales como las citocinas, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos (Sternberg, 2006; Mocchegiani et al., 2006; Kelley et al., 2007; Elenkov, 2008).

En la interfase de estos sistemas existe un balance entre las hormonas [Hormona de Crecimiento (GH), Prolactina (PRL), Glucocorticoides (GCs), catecolaminas e insulina] y las citocinas proinflamatorias [IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  (factor de necrosis tumoral)], implicando órganos blancos nerviosos, endócrinos e inmunológicos (Borghetti et al., 2009).

Figura 13. Diagrama de las rutas de comunicación entre el cerebro y el sistema inmune, incluyendo el eje HPA, el sistema nervioso simpático y la retroalimentación de las citocinas al cerebro.



(Webster et al., 2002)

Vías de comunicación entre el sistema inmune y el sistema nervioso central (CNS): estos sistemas se comunican y regulan uno al otro.

Las citocinas producidas en la periferia dan la señal al CNS por diferentes rutas, incluyendo, la barrera hematoencefálica y el nervio vago. Las citocinas periféricas afectan muchos aspectos de la función del CNS, incluyendo la activación de la respuesta neuroendócrina al estrés, o al eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA).

Cuando se activa el hipotálamo ocurre la liberación de la hormona corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP), que estimulan a la hipófisis para liberar la gran adrenocorticotropina (ACTH); esto estimula a la corteza adrenal a liberar glucocorticoides.

Estas hormonas suprimen la inmunidad a nivel molecular, celular y de órganos. Otras rutas por las cuales el CNS regula la inmunidad son a través del sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema nervioso periférico (PNS). El estrés activa ambos ejes el SNS y el eje HPA a liberar estas hormonas inmunosupresivas.

El eje HPA y el SNS se comunican a través de rutas en el tronco cerebral que implican núcleos noradrenérgicos, incluido el locus coeruleus, C1, C2 y A2. Las citocinas son también expresadas dentro del CNS, y en este compartimento tienen un papel importante en la muerte y

Este balance puede influir en la respuesta inmune, y por tanto en el curso de la infección y la severidad de la misma.

Así, una sobrerregulación del sistema inmune da como resultado una respuesta inmune ineficiente, así como el incremento a la susceptibilidad a las infecciones, mientras que una baja en la regulación de dicho sistema resulta en el desarrollo de enfermedades inflamatorias/autoinmunes (Webster et al., 2004).

Diferentes estímulos pueden contribuir a la regulación de estos sistemas a través de los ejes hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG) e hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT).

En algunas infecciones virales y bacterianas se ha reportado la activación del eje HPA, incrementando la secreción de glucocorticoides; algunos de estos agentes o sus productos se mencionan en la tabla 17.

Tabla 17. Bacterias y virus que activan el eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA)

Bacteria	Virus
Lipopolisacárido	Citomegalovirus murino
Endotoxina	Virus linfocitoide de coriomeningitis
Mycoplasma fermentans	Poly(I:C)
Toxina A de Clostridium diffecile	HIV
Toxina 2 de Shiga	Virus tipo 1 de <i>Herpes simplex</i>
Toxina de tétanos	Virus Sindbis
Endotoxina A estafilocócica	Enfermedad viral de Newcastle
Endotoxina B estafilocócica	Virus de Influenza

Tomado de *Fundamental Immunology* (Sixth Edition)

#### 14. REFERENCIAS

Aldridge, J.R., Jennette, M.A., Kuhn, R.E., 2007. BALB/cJ male mice do not feminize after infection with larval *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology* 93, 190-191.

Berczi, I., Chow, D.A., Sabbadini, E.R., 1998. Neuroimmunomodulation and natural immunity. *Domest. Anim. Endocrinol.* 15, 273–281.

Besedovsky, H.O., del Rey, A., Sorkin, E., 1981. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. *J. Immunol.* 126 (January(1), 385–387.

Borghetti P, Saleri R, Mocchegiani E, Corradi A, Martelli P. 2009. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130 (2009) 141–162.

Braeckman, B.P., Houthoofd, K. and Vanfleteren, J.R. 2001. Insulin-like signaling, metabolism, stress resistance and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing. Dev.* 122, 673–693.

Brehm K, Spiliotis M. The influence of host hormones and cytokines on *Echinococcus multilocularis* signaling and development. *Parasite.* 2008 Sep;15(3):286-90.

Brehm, K., Wolf, M., Beland, H., Kroner, A. and Frosch, M. (2003) Analysis of differential gene expression in *Echinococcus multilocularis* larval stages by means of spliced leader differential display. *Int. J. Parasitol.* 33, 1145–1159.

Ciaranello, R.D., Hoffman, H.J., Shire J.G.M., Axwirod, J., 1974. Genetic regulation of the catecholamine biosynthetic enzymes II. Inheritance of tyrosine

hydroxylase, dopamine-hydroxylase and phenylethanolamine N-methyl transferase. The Journal of Biological Chemistry 249, 4528-4536.

Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. 2004. Leishmania (Viannia): genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. Exp Parasitol. Sep-Oct;108(1-2):59-66.

Davies, S.J., Shoemaker, C.B. and Pearce, E.J. 1998. A divergent member of the transforming growth factor b receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. J. Biol. Chem. 273 (18), 11234–11240.

Davies, S.J., Shoemaker, C.B. and Pearce, E.J. (1998) A divergent member of the transforming growth factor b receptor family from *Schistosoma mansoni* is expressed on the parasite surface membrane. J. Biol. Chem. 273 (18), 11234–11240.

Dissous C, Khayath N, Vicogne J, Capron M. 2006. Growth factor receptors in helminth parasites: signalling and host-parasite relationships. FEBS Lett May 22; 580(12):2968-75.

Dorias, FJ and Esch, GW. 1969. Grow rate of two *Taenia crassiceps* strain. Exp. Parasit. 25: 395-398.

E.G. Escobedo, M.A. Cerbón, C. Larralde, J. Morales-Montor. 2004. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. J. Parasitol. 90: 1235–1244.

Elenkov, I.J., 2008. Neurohormonal–cytokine interaction; implication for inflammation, common human diseases and well-being. Neurochem. Int. 52, 40–51.

Emoto M, Emoto Y. 2009. Intracellular bacterial infection and invariant NKT cells. *Yonsei Med J.* Feb 28;50(1):12-21. Epub 2009 Feb 24. Review.

Everhart, M. E., Kuhn, R. E. and Zelmer, D. A. (2004). Infrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB /cJ mice. *Journal of Parasitology* 90, 79–84.

Feng XH, Derynck R. 1997. Ligand-independent activation of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 receptors. *J Biol Chem* 1996;271: 13123-13129.

34.Heldin HC, Miyazomo K, Dijke TP. TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*; 390: 465-471.

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, et al. 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev*;201:139–155.

Fox LL, Kuhn RE, Esch GW. *Taenia crassiceps*: antigenic comparison of two larval strains. *Exp Parasitol.* 1971 Apr;29(2):194-6.

Fragoso, G., Lamoyi, E., Mello,r A., Lomeli, C., Govezensky, T., Sciutto, E., 1996. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* 112, 119-124.

Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomelí, C., Hernández, M., Sciutto, E., 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66, 760-764.

Freeman S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology.* Volume 40: 969 998.

Freeman, R.S., 1962. Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40, 969–990.

Freitas, T.C. and Arasu, P. (2005) Cloning and characterization of genes encoding two transforming growth factor- $\beta$ -like ligands from the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Int. J. Parasitol.* 35, 1477–1487.

Fux, B., Rodrigues, C.V., Portela, R.W., Silva, N.M., Su, C., Sibley, D., Vitor, R.W., Gazzinelli, R.T., 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 71, 6392-6401.

Genetic characterization of the Asian Taenia, a newly described taeniid cestode of humans. 1994. Bowles J, McManus DP. *Am J Trop Med Hyg.* Jan;50(1):33-44.

Ghee Chong Koo<sup>1</sup> and Yunn-Hwen Gan. 2006. The innate interferon gamma response of BALB/c and C57BL/6 mice to *in vitro* *Burkholderia pseudomallei* infection. *BMC Immunology* 2006, 7:19

Goodridge HS, Marshall FA, Else KJ, Houston KM, Egan C, Al-Riyami L, et al. 2005. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *J Immunol*; 174:284–293.

Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* Jan;3(1):23-35. Review.

Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, Alexopoulou L, Flavell RA, Han J, Beutler B. 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol.* Dec;4(12):1223-9. Epub 2003 Nov 16.

J. Morales-Montor, C. Hallal-Calleros, M. Romano, R.T. Damian. 2002. Inhibition of P-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 32: 1379–1387.

J. Morales-Montor, C. Larralde, M. Arteaga, T. Govezensky, M.C. Romano, G. Morali. 1996. Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82: 689–693.

J. Morales-Montor, S. Baig, R. Mitchell, K. Deway, C. Hallal-Calleros, R.T. Damian. 2001. Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6, *J. Immunol.* 167) 4527–4533.

Janeway CA Jr., Medzhitov R. 1998. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol.* Oct;10(5):349-50.

Janeway CA. Jr. 1989. Approaching the symptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54:1.

Janeway CA. Jr. 1992, The immune system evolved to discriminate infections nonself from noninfections self. *Immunol Today* 13:11.

Kane CM, Cervi L, Sun J, McKee AS, Masek KS, Shapira S, et al. 2004. Helminth antigens modulate TLRinitiated dendritic cell activation. *J Immunol*; 173:7454–7461.

Kelley, K.W., Weigent, D.A., Kooijmann, R., 2007. Protein hormones and immunity. *Brain Behav. Immun.* 21, 384–392.

Knobloch, J., Rossi, A., Osman, A., Loverde, T.P., Klinkert, M.- Q. and Grevelding, C.G. 2004. Cytological and biochemical evidence for a gonad-

preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbR1 in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 138, 227–236.

Knobloch, J., Rossi, A., Osman, A., Loverde, T.P., Klinkert, M.- Q. and Grevelding, C.G. (2004) Cytological and biochemical evidence for a gonad-preferential interplay of SmFKBP12 and SmTbR1 in *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 138, 227–236.

Kumar, K.A., Baxter, P., Tarun, A.S., Kappe, S.H.I., Nussenzweig, V., 2009. Conserved protective mechanisms in radiation and genetically attenuated *uis3(-)* and *uis4(-)* *Plasmodium* sporozoites. Plos One 4, 1-5.

Le Goff, L., Lamb, T.J., Graham, A.L., Harcus, Y., Allen, J.E., 2002. IL-4 is required to prevent filarial nematode development in resistant but not susceptible strains of mice. Int J Parasitol 32, 1277-1284.

López-Briones S, Sciutto E, Ventura JL, Zentella A, Fragoso G. 2003. CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. Parasitol Res. Jun;90(2):157-63.

López-Briones, S., Lamoyi, E., Fragoso, G., Soloski, M.J., Sciutto, E. 2003. *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. Parasitology Research 90, 236-242.

Luton K, Walker D, Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). 1992. Mol Biochem Parasitol. Dec;56(2):323-7.

MacDonald AS, Maizels RM. 2008. Alarming dendritic cells for Th2 induction. J Exp Med; 205:13–17.

Marshall VM, Silva A, Foley M, Cranmer S, Wang L, McColl DJ, Kemp DJ, Coppel RL. 1997 .A second merozoite surface protein (MSP-4) of *Plasmodium falciparum* that contains an epidermal growth factor-like domain. *Infect Immun.* Nov;65(11):4460-7.

Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casillas F, Ohtsuki M, Wrana JL. 1992. TGF-beta receptors. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun; 32(2):99-104. Review.

Mayta, H., Talley, A., Gilman, R.H., Jimenez, J., Verastegui, M., Ruiz, M., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., 2000. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin-eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 33-137.

Medzhitov R, Janeway C Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000 Feb;173:89-97. Review.

Mellor, A.L., Antoniou, J., Robinson, P.J., 1985. Structure and expression of genes encoding murine Qa-2 class I antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5920-5924.

Mocchegiani, E., Santarelli, L., Costarelli, L., Cipriano, C., Muti, E., Giacconi, R., Malavolta, M., 2006. Plasticity of neuroendocrine–thymus interactions during ontogeny and ageing: role of zinc and arginine. *Ageing Res. Rev.* 5, 281–309.

Nagy, E., Berczi, I., 1978. Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 89 (November(3)), 530–537.

Ohtsuki M, Massagué J. 1992. Evidences for the involvement of protein kinase activity in transforming growth factor-beta signal transduction. *Mol Cell Biol*;12: 261-265.

- Patterson, G.I. and Padgett, R.W. 2000. TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. Trends Genet. 16, 27–33.
- Patterson, G.I. and Padgett, R.W. (2000). TGF beta-related pathways. Roles in *Caenorhabditis elegans* development. Trends Genet. 16, 27–33.
- Pollard, D. R., Woodward, B., Gupta, K., 1982. Strain and sex differences in serum –fetoprotein levels in *Mus musculus*. Canadian journal of Genetics and Cytology 24, 343-346.
- Potter, M., 1985. History of the BALB/c family. Current topics in microbiology and immunology 22, 1-18.
- Potter, M., Wax, J., 1981. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAnN: Reduced susceptibility in BALB/cJ with a brief description of pristane induced arthritis. The Journal of Immunology 127, 1591-1595.
- Remoué F, Mani JC, Pugnière M, Schacht AM, Capron A, Riveau G. 2002. Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-kilodalton glutathione S-transferase. Infect Immun. Feb;70(2):601-5.
- Reyes, J. L., Terrazas, C. A., Vera-Arias L., Terrazas, L. I. 2009. Differential response of Antigen Presenting Cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infection, Genetics and Evolution*. Dec;9(6):1115-27.
- Rodríguez M, Terrazas LI, Márquez R, Bojalil R. 1999. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. Parasite Immunol. Apr;21(4):177-85.

Rodríguez-Sosa, M., Rosas, L.E., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I., 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity* 71, 1247-1254.

Rodriguez-Sosa, M., Satoskar, A.R., Calderon, R., Gomez-Garcia, L., Saavedra, R., Bojalil, R., Terrazas, L.I., 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun* 70, 3656-3664.

Roggero E, Perez A, Tamae-Kakazu M, Piazzon I, Nepomnaschy I, Wietzerbin J, Serra E, Revelli S, Bottasso O. 2002. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. *Clin Exp Immunol*. Jun;128(3):421-8.

Roggero E, Pérez AR, Bottasso OA, Besedovsky HO, Del Rey A. 2009. Neuroendocrine-immunology of experimental Chagas' disease. *Ann N Y Acad Sci*. Feb; 1153:264-71. Review.

Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2, 845-858.

Schussler, P., Grevelding, C.C. and Kunz, W. (1997). Identification of Ras, MAP kinases and a GAP protein in *Schistosoma mansoni* by immunoblotting and their putative involvement in male-female interaction. *Parasitology* 115, 629–634.

Schuurs AH, Verheul HA. 1990. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J Steroid Biochem.* Feb;35(2):157-72. Review

Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C., 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77, 243-246.

Shi, Y., Rodriguez, M., Shahan, K., Derman, E., 1989. Subfamily of submaxillary gland-specific Mup genes: chromosomal linkage and sequence comparison with liver-specific Mup genes. *Nucleic Acids Research* 17, 6191-6203

Smith JK, Esch GW, Kuhn RE. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *Int J Parasitol.* Jun;2(2):261-3.

Smith, J.K., Esch, G.W., Kuhn, R.E., 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology* 2, 261-263.

Sternberg, E.M., 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated non-specific host response to pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 318–328.

Studer, M. and Baer, JG. 1949. Une larva de cestode bourgeonnante. *Bull. Soc. neuchatel. Sci. Nat.* 72: 255.

Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective Th1- type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 84, 74-81.

Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F., Larralde, C., 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research* 85, 135-141.

Chavatte JM, Chiron F, Chabaud A, Landau I. (2007) Probable speciations by "host-vector 'fidelisation'": 14 species of Plasmodium from Magpies. *Parasite* 14(1):21-37

Toenjes, S.A., Kuhn, R.E., 2003 The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. *Parasitology Research* 89, 407-413.

Villa, O.F., Kuhn, R.E., 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112, 561-570.

Wachira TM, Sattran M, Zeyhle E, Njenga MK. Intestinal helminths of public health importance in dogs in Nairobi. 1993. *East Afr Med J.* Oct;70(10):617-9.

Webster, J.I., Sternberg, E.M., 2004. Role of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis, glucocorticoids and glucocorticoid receptors in the toxic sequelae of exposure to bacterial and viral products. *J. Endocrinol.* 181, 207–221.

Webster, J.I., Tonelli, L., Sternberg, E.M., 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 125–163.

Willms K, Zurabian R. 2010. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology.* Mar;137 (3):335-46. Epub 2009 Oct 19.

Zavala-Gongora, R., Kroner, A., Wittek, B., Knaus, P. and Brehm, K. (2003) Identification and characterization of two distinct Smad proteins from the fox-tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 1665–1677.

Shortman K, Villadangos. 2006. Is it a DC, is it an NK? No, it's an IKDC. Nat. Med. Feb;12(2):167-8.

Chaput N, Taieb J, Zitvogel L. 2006. Innate defence against tumor cells: the killer cell IKDC. Bull Cancer . May 1;93(5):449-51

## 15. ARTÍCULO PUBLICADO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Meneses G, Berzunza M, Becker I, Bobes RJ, Rosas G, Sciutto E, Fragoso G. 2009. *Taenia crassiceps* cysticercosis: variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in BALB/c substrains. *Exp Parasitol*. Dec;123(4):362-8. Epub 2009 Sep 6

## ARTICULO DE COLABORACIÓN

Fragoso G, Meneses G, Sciutto E, Fleury A, Larralde C.J. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *Parasitol*. 2008 Apr;94(2):551-3. Erratum in: *J Parasitol*. 2008 Dec;94(6):1442



## *Taenia crassiceps* cysticercosis: Variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in BALB/c substrains

Gabriela Meneses<sup>a</sup>, Miriam Berzunza<sup>b</sup>, Ingeborg Becker<sup>b</sup>, Raúl J. Bobes<sup>a</sup>, Gabriela Rosas<sup>c</sup>, Edda Sciutto<sup>a</sup>, Gladis Fragoso<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Mexico City C.P. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 April 2009

Received in revised form 7 August 2009

Accepted 2 September 2009

Available online 6 September 2009

#### Keywords:

*Taenia crassiceps*

BALB/c substrains

Changes in parasite growth permissiveness

Immune features

### ABSTRACT

This study describes the first days of *Taenia crassiceps* infection in BALB/c substrains, BALB/cAnN and BALB/cJ, using two stocks of the same strains which were kept in different animal facilities, conventional and pathogen-free conditions, respectively. This study shows that parasite growth restriction shown by conventional BALB/cJ mice changed to parasite growth permissiveness when pathogen-free BALB/cJ mice were used. In addition, the higher number of macrophages, NK cells and intraperitoneal level of IFN- $\gamma$  found in the conventional restrictive BALB/cJ substrain vanished when the permissiveness to the parasite growth increased. No differences were found in DNA sequences of parasites collected before and after the change in the permissiveness to parasite growth which favors the possibility that the observed modifications could be due to changes in the murine strains and/or their maintenance conditions.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Host susceptibility and intensity of *Taenia crassiceps* infection have been observed to depend on a combination of genetic (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al., 1996, 1998), hormonal/sexual (Culbreth et al., 1972; Huerta et al., 1992; Larralde et al., 1995) and immunological factors of the host (Sciutto et al., 1990; Villa and Kuhn, 1996; Terrazas et al., 1998; Toenjes et al., 1999), among other features.

The relevance of immunity in restricting parasite growth has been documented. When *T. crassiceps* cysticerci are implanted in the peritoneal cavity of mice, a high percentage of mature macrophages appear secreting NO and conducting T cells towards a Th1 response which restricts parasite reproduction (Terrazas et al., 1998). In addition, myeloid suppressor cells impair T cell proliferation by secreting NO (Brys et al., 2005). As the course of infection progresses, IL-4 and IL-13 gradually emerge in the peritoneal cavity. The presence of these cytokines contributes to increase the expansion of myeloid suppressor cells and to their antiproliferative activity (Sciutto et al., 1995; Villa and Kuhn, 1996; Toenjes et al., 1999; Brys et al., 2005), thus mounting a more permissive Th2 immune response (Terrazas et al., 1998, 1999). The role of macrophages in early parasite growth restriction has also been well documented using KO BALB/c mice for the macrophage inhibiting

factor (Rodríguez-Sosa et al., 2003). The early macrophage recruitment could be promoted by a recently reported *T. crassiceps* glycan (Gómez-García et al., 2005, 2006).

Regarding the relevance of the mouse genetic makeup in controlling parasite growth, clear differences between some mouse strains have been found (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al., 1996). Such differences have also been reported in the BALB/cAnN and BALB/cJ substrains when infection is induced by disrupted cysticerci (Fragoso et al., 1998; López-Briones et al., 2003). Data obtained in past studies beginning in 1995 indicated that the BALB/cJ strain exhibits more restrictive parasite growth than BALB/cAnN. These two substrains are genetically quite similar but differ in few phenotypic features, including the expression of the Qa-2 antigen. Qa-2 is a non-classical class I major histocompatibility complex (MHC) molecule encoded by four genes (Q6–Q9). In the BALB/cJ strain (Qa-2 low), the only active genes are Q6 and Q7, because Q8 and Q9 have fused resulting in an inactive Q8/Q9d gene (Mellor et al., 1985). In BALB/cAnN mice, an additional deletion has occurred between the Q6 and Q7 genes, leading to inactivation of these genes, which accounts for the Qa-2 null expression (Mellor et al., 1985). In previous studies we demonstrated that differences in the control to parasite growth to *T. crassiceps* observed between BALB/cJ (restrictive) and BALB/cAnN (permissive) mice were linked to Qa-2 antigen expression (Fragoso et al., 1998). Interestingly, only a few immunological features of acquired immunity were found to differ between these two BALB/c substrains: an increased proliferative response and higher IL-2 levels were induced by

\* Corresponding author. Fax: +52 55 56223369.

E-mail address: [gladis@servidor.unam.mx](mailto:gladis@servidor.unam.mx) (G. Fragoso).

cysticercal antigens only in splenocytes from BALB/cj mice, and a decrease in the TCR Vbeta 2 of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> splenocytes was exhibited only by the BALB/cAnN mice (López-Briones et al., 2003). The initial aim of this study was to evaluate the relevance of the early immune response in differences in the permissiveness to parasite growth between these two substrains. However, in 2002, the first mice stocks were removed and our animals' facilities were converted to pathogen-free conditions. These changes coincided with an unexpected increase in parasite growth in BALB/cj strain. Considering the relevance of early events in the peritoneal cavity for infection outcome, in this study we thoroughly examined immunological features occurring in the peritoneum of the two BALB/c mouse substrains from the two different stocks before and after the conversion to pathogen-free raising conditions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Mice

The origin of BALB/cAnN and BALB/cj sublins is shown in Fig. 1. The strain was derived in 1913 by J.J. Bagg, inbred in 1923 by McDowell who inbred the mice at Cold Spring Harbor in 1927 and to Snell in 1932. At that moment the strain was purchased by different researches (To Andervont in 1937, to NIH in 1951 and to Charles an River in 1974 who started to sell as BALB/cAnN, while Snell in 1932 moved the strain to Jackson Laboratory in 1947 who has been breeding this BALB/cj subline until now) (Potter, 1985).

In this study, female mice of BALB/cAnN (Qa-2<sup>-</sup>, and BALB/cj (Qa-2<sup>+</sup>) from two different stocks were employed. The first stock of BALB/cAnN was purchased from Charles and River in 1982 and the first stock of BALB/cj was kindly supplied by Dr. Andrew Mellor in 1992 from the National Institute for Medical Research. For several years these mice were bred and reproduced in our animal facilities by brother–sister mating. They were fed with standard granulated food and water *ad libitum* in a conventional animal facility. In 2002, the Institute's animal facilities were upgraded to pathogen-free conditions and the first mouse stocks were eliminated. A second stock of the same two strains was purchased; the BALB/cAnN strain from Harlan Laboratories (México City, México) and the BALB/cj strain from Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine). The progeny of the new BALB/cj and BALB/cAnN stocks was systematically tested for expression of the Qa-2 protein in lymphocytes to examine the genetic purity of these stocks (Fig. 2).

This study reports experiments performed at different times (before and after 2002) using the first and the seconds stocks of mice purchased by our Institute.

All experiments were done in accordance with the guidelines established by the Committee on the Care and Use of Experimental

Animals of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia at the Universidad Nacional Autónoma de México.

### 2.2. Parasites and infection

The ORF strain of *T. crassiceps*, isolated by Freeman (1962) and supplied to C. Larralde (IIBM, UNAM) by B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) was maintained by serial intraperitoneal passage in female BALB/cAnN mice since 1985 at the Instituto de Investigaciones Biomédicas. Parasites for infection were harvested from the peritoneal cavity of mice, 1–2 months after inoculation of 20 cysticerci per mouse with a 27-gauge needle (stock mice). For experiments, fifteen 6-week-old female BALB/cAnN and BALB/cj mice derived from the first and the second stocks were injected intraperitoneally with 10 small (2 mm in diameter), non-budding *T. crassiceps* larvae, suspended in sterile isotonic saline (SSI); five mice were sacrificed on day 3, five on day 5 and five on day 30 post-infection and the number of parasites inside their peritoneal cavity was counted using a stereoscopic microscope (Sciutto et al., 1995) to determine the parasite growth permissiveness (PGP) of each substrain. Organs inside the abdominal cavity of each mouse were removed and carefully inspected to detect any remaining *T. crassiceps* larvae.

For polymorphism studies of the *T. crassiceps* internal transcribed spacer (ITS) sequence, seven parasites were used: three of them were obtained from the same infected mouse and the other four were isolated each from a different mouse, all after 30 days of infection.

### 2.3. Characterization of peritoneal cells

Three 6-week-old female mice of each strain from the first and the second stock were infected per day of experimentation using the procedure described above. Parasite count of both stocks was performed before and after 3 and 5 days of infection. The peritoneal cells were recovered after mice were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber removing the peritoneal content in 1 ml of isotonic saline solution. The lavage obtained was centrifuged and the cell pellets were separated from the supernatant (peritoneal fluid). The cells were characterized after hematoxylin–eosin staining, as described (Aluja et al., 1998), and by flow cytometry.

### 2.4. Flow cytometry

Peritoneal cells were collected from individual animals before and 3 and 5 days after infections and counted using a hemocytometer. Cell concentrations were adjusted to 10<sup>7</sup>/ml in staining buffer (PBS, added with 5% of BSA, and 0.2% NaN<sub>3</sub>). The cells were

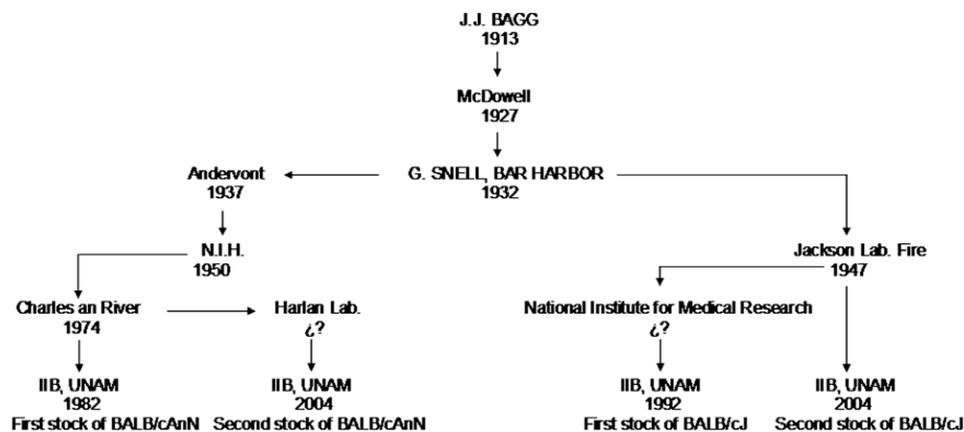
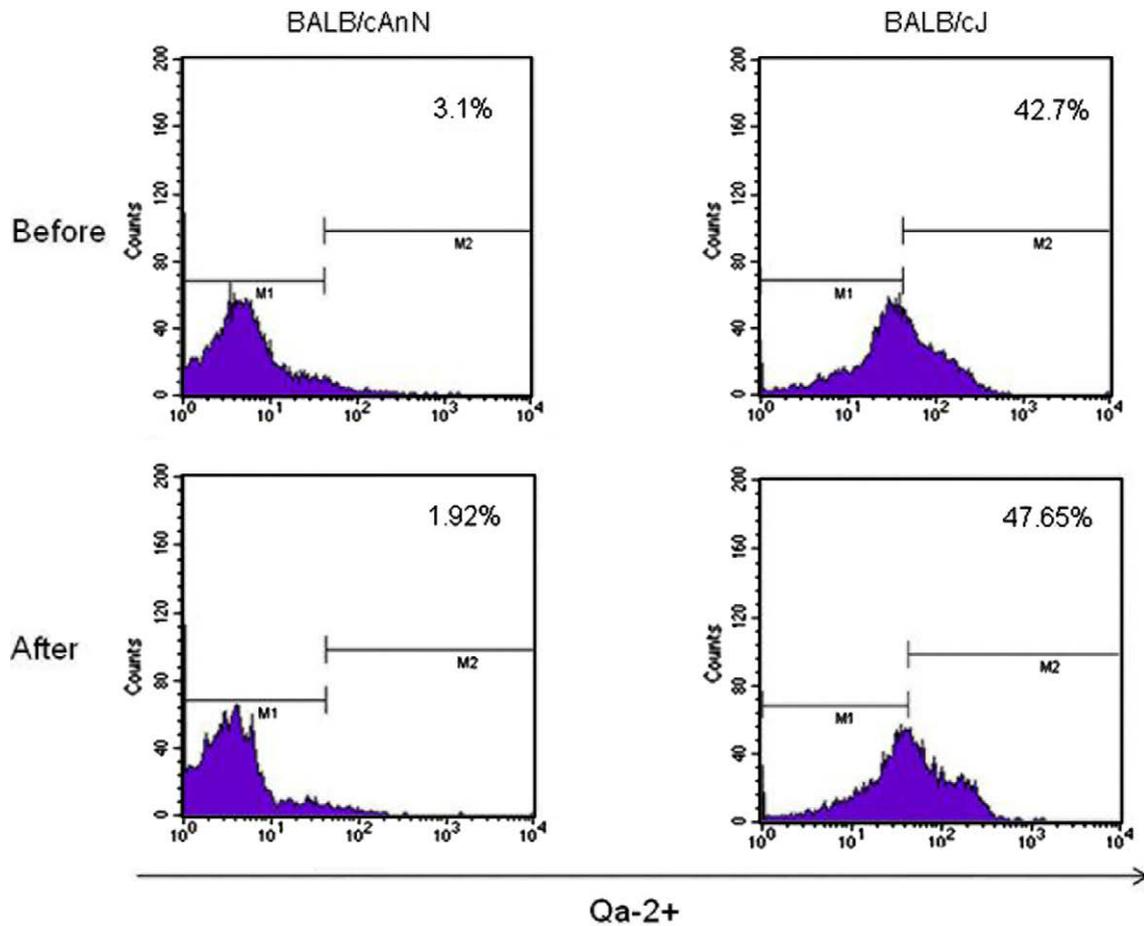


Fig. 1. Schematic chart showing the origin of BALB/cAnN and BALB/cj sublins. This chart is an adaptation from the original described by Bailey (1978) of the Jackson Laboratory.



**Fig. 2.** Percentage of CD3<sup>+</sup> lymphocytes expressing Qa-2<sup>+</sup> in BALB/cAnN and BALB/cJ mice. Data are representative of different experiments performed during the period of 1992–2008 using cells from six mice of each strain per experiment.

analyzed for Mac-3, Qa-2 and Pan-NK expression by flow cytometry in their respective gate (macrophages/lymphocytes). Cells were suspended in cold PBS containing 5% FBS and 0.02% NaN<sub>3</sub> and left to react for 30 min at 4 °C with the corresponding mAbs: FITC-Mac-3 (M3/84 clone), FITC-Qa-2 (1-1-2 clone) and Pan-NK-PE (DX5 clone) antibodies (all from Pharmingen, San Diego, CA). Parallel cell samples were stained with the corresponding isotype control to identify non-specific staining. Non-specific binding of antibodies by Fc receptors was blocked with Fc Block CD16-CD32 (Pharmingen). Stained macrophages and lymphocytes were fixed with paraformaldehyde and 10,000 cells were by light scatter in a FACScan (Becton–Dickinson, Palo Alto, CA). Results are expressed as percentage of positive cells.

### 2.5. Cytokine titration by ELISA

IFN- $\gamma$  was measured in peritoneal fluid of all experimental groups by ELISA, as previously reported (Mooney et al., 2000). Briefly, sandwich ELISAs were performed in 96-well, flat-bottom microtiter plates (Nunc-Immuno Plate Maxisorp, Rosekilde, Denmark). Microplates were coated with the capture antibody for 18 h at 4 °C (BD Pharmingen, San Diego, CA, for IFN- $\gamma$  R&D Duo-Set). After washing with PBS-Tween-20 (0.05%) and blocking for 30 min at room temperature with 2% PBS-BSA, plates were incubated for a further 18 h, at 4 °C with antibody standards and peritoneal fluid, washed three times, and incubated for 2 h with the detection antibody at room temperature. Bound detection antibodies were identified using 1:10,000 diluted streptavidin-phosphatase conjugate (BD Pharmingen) and *p*-nitrophenylphosphate (Sigma) as substrate. Optical density was read at 405 nm, after 30 and 60 min of incubation. Assay sensitivity for IFN- $\gamma$  was measured in pg/ml.

tase conjugate (BD Pharmingen) and *p*-nitrophenylphosphate (Sigma) as substrate. Optical density was read at 405 nm, after 30 and 60 min of incubation. Assay sensitivity for IFN- $\gamma$  was measured in pg/ml.

### 2.6. Amplification and sequencing of *IST*

In order to determine if changes in parasite growth permissiveness (PGP) were related to variations in cysticercus DNA, the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) regions were analyzed. These ribosomal sequences have been widely used to differentiate between cestode strains (Mayta et al., 2000; Meri et al., 2000; Gasser and Chilton, 1995). For this purpose, DNA from cysticerci collected before and after the change in PGP was extracted using the Dneasy Blood & Tissue Handbook and following the manufacturer's protocol (Qiagen).

For ITS1 and ITS2 amplifications the following primers were used: BD1 (5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3') and TSS1 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGTAATC-3') as previously reported (Mayta et al., 2000). The PCR was performed on an Applied Biosystems. Thermal Cycler 2720, in a total volume of 50  $\mu$ l, by using 100 ng of total DNA. Amplification was performed in a buffer containing 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM (each) dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 0.5 mM of each primer, and 1 U of *Taq* polymerase (Perkin-Elmer Cetus). We used the PCR cycles as reported elsewhere (Mayta et al., 2000). Briefly, cycles consisted of 5 min at 94 °C followed by 30 cycles consisting of 94 °C for 1 min (denaturation), 56 °C for 1 min (annealing), and 72 °C for 2 min (elongation). Fifty microliters of the PCR product

were separated by electrophoresis on a 1.0% agarose gel containing 0.5 µg of ethidium bromide/ml. The expected amplification product was excised from the gel, purified with the QIAquick Gel Extraction Kit (Cat. No. 28704) and sequenced by standard methods. Sequences were analyzed using the Chromas 2 software and the two cysticercus collections were compared.

### 2.7. Statistical analysis

Individual parasite intensities and immunological features were compared between groups by the unpaired *t*-test with Welch correction because data from individual experiments passed the Kolmogorov and Smirnov normality test and showed different standard deviations. Data were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. BALB/cAnN and BALB/cj parasite growth permissiveness (PGP)

In three independent experiments performed with the first mouse stocks, BALB/cAnN consistently exhibited a significantly higher number of cysticerci than BALB/cj mice. This higher PGP was observed as early as 3 days after infection and became more evident after 5 and 30 days. Table 1 also shows that in the second mouse stocks, PGP increased in BALB/cj mice and decreased in BALB/cAnN mice; however, the difference in PGP between both substrains was not significant.

The relevance of parasite disruption regarding the differences in PGP originally observed between BALB/cAnN and BALB/cj mice is clearly shown in Table 2. Both strains had equal PGP when parasites were inoculated using a 20-gauge needle. In contrast, no parasites were recovered from BALB/cj mice after been infected with the 27-gauge needle.

### 3.2. Peritoneal cell characterization in BALB/cAnN and BALB/cj mice before and after the change in PGP

Microscopic analysis revealed the presence of neutrophils, eosinophils, basophils and lymphocytes in the peritoneal cavity 3 and 5 days after infection (Table 3) before and after the change in PGP. A significant increase in lymphocytes in naïve cells and macrophages at day 5 of infection was found to be related to parasite growth restriction (PGR) in BALB/cj mice. Basophils numbers increased in both BALB/c substrains at 3 and 5 days post-infection after the change in PGP but did not relate to differences in the host's PGP.

### 3.3. Increased peritoneal NK, Mac-3<sup>+</sup> cells and IFN-γ levels when BALB/cj was PGR

Regarding the peritoneal cell composition measured using FACs cytometry, a significant increase in percentage of Pan-NK, Mac-3<sup>+</sup>

**Table 2**

Differences in susceptibility between BALB/cAnN and BALB/cj tested before the change in susceptibility.

	20-gauge needle	27-gauge needle
BALB/cAnN	754 ± 247 <sup>a,*</sup>	925 ± 124 <sup>a</sup>
BALB/cj	732 ± 133 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>

\* Mean ± SD of the number of cysticerci in seven mice per group recovered 70 days after challenge with 10 cysticerci per mouse using two different needle gauge sizes. <sup>a,b</sup> Different literals in each column indicate significantly different values ( $P < 0.05$ ).

cells and IFN-γ levels was observed when conventional BALB/cj mice were PGR (Table 4). These differences vanished when mice were tested after the change in PGP. Moreover, the studied profiles found in infected BALB/cj mice of the second stock more closely resemble those obtained in the PGP BALB/cAnN mice of the first stocks (Tables 1 and 4).

### 3.4. Exploring possible differences in *T. crassiceps* cysticercus DNA before and after the change in PGP

To explore if changes in PGP were due to genetic differences between the parasites from the first and the second mouse stocks, we analyzed the ITS1 and ITS2 sequences amplified from cysticercus DNA collected before and after the change in PGP. ITS1 and ITS2 were chosen considering their high degree of reported polymorphism (Woodgyer, 2004).

For this, we first estimated the polymorphism of cysticerci collected in the year 2000 from female BALB/cAnN mice which had been fixed in 70% ethanol at -70 °C. The respective ITS1 and ITS2 sequences were determined in 3 individual cysticerci isolated from one infected mouse and four individual cysticerci isolated from a different mouse, both mice stemming from the first stock of BALB/cAnN mice. After sequencing and alignment, the following differences were identified: in ITS1, a guanine was found replacing a thymine residue at position 427 (Table 5) and, in ITS2, a guanine was identified in place of a cytosine residue at position 302 (Table 6).

Comparison of the respective sequences with those obtained from DNA of freshly processed cysticerci obtained from the second stock of BALB/cAnN mice revealed no differences in ITS1. In ITS2, a cytosine was found replacing a guanine residue at position 476. In addition, our ITS2 results showed 11 further differences with respect to the reported ITS2 sequence obtained from adult *T. crassiceps* (GenBank Accession No. QD099564).

## 4. Discussion

This work provides clear evidence of changes in the hosts' PGP to *T. crassiceps* ORF cysticercosis in BALB/cAnN and BALB/cj mice, with respect to our previous observations (Fragoso et al., 1998; López-Briones et al., 2003) as well as changes in the immunological

**Table 1**

Parasite load of BALB/c mouse substrains after intraperitoneal infection with *Taenia crassiceps* cysticerci.

Day of infection	3			5			30		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>Old mice stocks</i>									
BALB/cAnN	1 ± 1.4 <sup>a,*</sup>	4.3 ± 1.7 <sup>a</sup>	6.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	6.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	7 ± 2 <sup>a</sup>	9.6 ± 2 <sup>a</sup>	129.3 ± 39 <sup>a</sup>	116.5 ± 52 <sup>a</sup>	203.6 ± 80 <sup>a</sup>
BALB/cj	0.6 ± 0.8 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	1 ± 1.3 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.5 <sup>b</sup>	1.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	1 ± 1.7 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.5 <sup>b</sup>
<i>New mice stocks</i>									
BALB/cAnN	2.6 ± 2.3 <sup>b</sup>	3 ± 2.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 2.5 <sup>c</sup>	4.6 ± 0.5 <sup>c</sup>	1.5 ± 1.9 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	11.7 ± 10.7 <sup>c</sup>	65.8 ± 66 <sup>a</sup>	51.8 ± 98 <sup>c</sup>
BALB/cj	3.6 ± 2.5 <sup>b</sup>	7 ± 2 <sup>c</sup>	2 ± 1.7 <sup>c</sup>	7 ± 2.6 <sup>c</sup>	1 ± 1.5 <sup>c</sup>	2.3 ± 1.5 <sup>b</sup>	43 ± 40 <sup>c</sup>	87 ± 64 <sup>a</sup>	34.2 ± 30 <sup>c</sup>

\* Mean ± SD of the number of cysticerci recovered after challenging five mice per group with 10 cysticerci per mouse.

<sup>a-c</sup> Different literals in each column indicate significantly different values ( $P < 0.05$ ) between females, on the indicated day after infection, in each experiment, using the unpaired *t*-test with Welch correction.

**Table 3**  
Cellular composition in the peritoneal cavity of *Taenia crassiceps*-infected BALB/cAnN and BALB/cj mice.

	Neutrophils		Basophils		Eosinophils		Lymphocytes		Macrophages	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After
<i>Naïve mice</i>										
BALB/cAnN	4 ± 1 <sup>a,*</sup>	10.6 ± 4 <sup>a,b</sup>	34 ± 5.6 <sup>a</sup>	4.6 ± 1.1 <sup>b</sup>	10.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	9 ± 1.7 <sup>a</sup>	38 ± 2.8 <sup>a</sup>	47.6 ± 1 <sup>b</sup>	15.5 ± 10.6 <sup>a</sup>	28 ± 12.1 <sup>a,b</sup>
BALB/cj	4 ± 1.4 <sup>a</sup>	8.7 ± 0.9 <sup>b</sup>	25 ± 2.3 <sup>a</sup>	4.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	6 ± 0.1 <sup>b</sup>	5 ± 1.8 <sup>a</sup>	46.5 ± 3.5 <sup>b</sup>	52 ± 7.7 <sup>b</sup>	14.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	29 ± 5.7 <sup>b</sup>
<i>Day 3 of infection</i>										
BALB/cAnN	6 ± 1.1 <sup>a</sup>	14 ± 7.1 <sup>a</sup>	11.5 ± 7.7 <sup>a</sup>	5.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	25 ± 0.2 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	46.6 ± 2.2 <sup>a</sup>	36.6 ± 7.5 <sup>a</sup>	26 ± 5.1 <sup>a</sup>	38.5 ± 3.5 <sup>a</sup>
BALB/cj	7 ± 4.2 <sup>a</sup>	14.6 ± 6.7 <sup>a</sup>	10.5 ± 2.3 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	22.5 ± 0.7 <sup>a</sup>	8 ± 4.3 <sup>b</sup>	35 ± 7 <sup>a</sup>	52.6 ± 8.9 <sup>a</sup>	32.5 ± 3.5 <sup>a</sup>	21.3 ± 10.7 <sup>a</sup>
<i>Day 5 of infection</i>										
BALB/cAnN	15.5 ± 3.5 <sup>a</sup>	15.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	14.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	5.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	22.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.4 ± 1.5 <sup>a</sup>	38.5 ± 2.1 <sup>a</sup>	50.9 ± 4.3 <sup>a</sup>	11 ± 2.8 <sup>a</sup>	23 ± 4.3 <sup>b</sup>
BALB/cj	10 ± 2.8 <sup>a</sup>	20 ± 6.1 <sup>a</sup>	11 ± 5.6 <sup>a</sup>	3 ± 0.1 <sup>b</sup>	24 ± 4.9 <sup>a</sup>	8 ± 2 <sup>a</sup>	42.5 ± 3.5 <sup>a</sup>	53 ± 10.3 <sup>a</sup>	22 ± 2.3 <sup>b</sup>	16 ± 4.3 <sup>a,b</sup>

\* Mean ± SD of the percentage of different cells recovered at 0, 3 and 5 days after challenge with 10 cysticerci per mouse. No significant differences were found between the two mouse strains on different days after challenge, before and after the change in susceptibility, using the non-parametric unpaired *t*-test.

<sup>a-c</sup> Different literals in each column indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ).

**Table 4**  
Changes in immunological features in the peritoneum of non-infected and *Taenia crassiceps*-infected BALB/cAnN and BALB/cj mice before and after the change in susceptibility.

	Pan-NK <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>		Mac-3 <sup>+</sup> (%) <sup>*</sup>		IFN- $\gamma$ (pg/ml) <sup>†</sup>	
	Before	After	Before	After	Before	After
<i>Naïve mice</i>						
BALB/cAnN	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.4 ± 2 <sup>a</sup>	30.6 ± 11.4 <sup>a</sup>	54 ± 23 <sup>a</sup>	375 ± 32 <sup>a</sup>
BALB/cj	2.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	202 ± 44 <sup>b</sup>	362 ± 61 <sup>a</sup>
<i>Day 3 of infection</i>						
BALB/cAnN	4.7 ± 1.8 <sup>b</sup>	10.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.1 ± 6.3 <sup>a</sup>	174 ± 27 <sup>b</sup>	447 ± 82 <sup>a</sup>
BALB/cj	4 ± 1 <sup>b</sup>	5.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	10.8 ± 1 <sup>b</sup>	24.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	389 ± 262 <sup>b</sup>	316 ± 51 <sup>a</sup>
<i>Day 5 of infection</i>						
BALB/cAnN	3.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	13.9 ± 2.7 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.02 <sup>a</sup>	24.4 ± 5.2 <sup>a</sup>	200 ± 54 <sup>b</sup>	761 ± 191 <sup>a</sup>
BALB/cj	12.4 ± 2 <sup>c</sup>	14.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	16.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	18.3 ± 3.4 <sup>a</sup>	267 ± 37 <sup>b</sup>	493 ± 224 <sup>a</sup>

<sup>\*</sup> Percent of Pan-NK and Mac-3<sup>+</sup> cells and <sup>†</sup> level of IFN- $\gamma$  (pg/ml) before and after 3 and 5 days of infection in groups of 3–5 mice each.

<sup>a-c</sup> Different literals in each column indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) between columns using the non-parametric unpaired *t*-test. These data are representative of three independent experiments.

**Table 5**  
ITS1 polymorphism in *Taenia crassiceps* cysticerci.

	Position of variable characters for ITS1		
	427	449	457
Before	T	N	T
After	T	T	T
1	G	G	G
2	T	G	G
3	T	G	G
4	G	G	G
5	G	G	G
6	T	G	G
7	T	G	G

Differences in the position of three amino acids were identified in cysticerci recovered before and after the change in susceptibility, and between individual cysticerci: numbers 1–3 from one mouse and numbers 4–7 from another infected mouse.

**Table 6**  
ITS2 polymorphism in *Taenia crassiceps* cysticerci.

	Position of variable characters for ITS2													
	302	322	278	279	280	281	283	285	286	287	660	661	662	663
Before	C	C	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
After	C	G	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
1	G	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
2	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
3	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
4	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
5	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
6	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
7	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T	G
ITS2 QD099564	C	G	C	T	T	G	A	G	A	T	G	A	G	A

Differences in the position of three amino acids were identified in cysticerci recovered before and after the change in susceptibility, and between individual cysticerci: numbers 1–3 from one mouse and numbers 4–7 from another infected mouse.

response to infection, when measured in peritoneal cavity (Tables 1 and 4).

These changes indicate that the BALB/cAnN strain became more PGR and the BALB/cj strain more PGP. In terms of the parasite load found in the peritoneal cavity, the increase in PGP of the latter strain moved from almost zero cysticerci at 30 days of infection to dozens of parasites per infected mouse. In this context, it is worth to mention that previous studies reported by Kuhn's group, consistently showed the BALB/cj strain as highly PGP (Toenjes et al., 1999). The differences in PGP in the BALB/cj strain between our results (before the change) and those reported by Kuhn's group may be attributed to the technical procedure used for infection. Indeed, cysticerci they used were less fragmented since they inoculated cysticerci with a 20-gauge needle (Mooney et al., 2000). In contrast, in our previous reports (Fragoso et al., 1996, 1998; López-Briones et al., 2003) and in this study, cysticerci were

inoculated with a 27-gauge needle. This procedure fragments cysts, and in a few days these fragments can develop into complete cysticerci in vivo and in vitro (Padilla et al., 2001; Sciuotto and co-workers, 1997). As a result of this fragmentation more reproductive parasite units are inoculated than with a 20-gauge needle, which does not fragment cysticerci. The effect of different needle gauges on the outcome of infection was found to be extremely importantly for infectivity as shown in Table 2. In fact, the BALB/cj strain can turn out to be as PGP as the BALB/cAnN strain when higher caliber gauges are used for infection (Table 2). However, the changes in PGP observed in this study are not dependent on the kind of needle gauge employed as both substrains were infected with the smaller needle gauge (27G). Other modifications in our study, such as the change of the first mice stocks could account for this variation in PGP. The first stocks of BALB/cAnN mice and BALB/cj mice were kept at our Institute's animal house since 1982 and 1992, respectively, and were then replaced by new commercial stocks in 2002. Thus, the change of mouse stocks, and the modifications in raising conditions, may account for the mentioned PGP changes. This is particularly feasible since mouse strains which are inbred for such a prolonged time, may undergo genetic changes. This is not completely unexpected since some genetic and phenotypic differences have been found between these sublines from the time when they were separated, 77 years ago (Fig. 1), i.e. changes in the level of enzymes of the catecholamines biosynthetic pathway (Ciaranello et al., 1974); the higher susceptibility of BALB/cAnN to develop plasmacytomas (Potter and Wax, 1981); the higher levels of alpha fetoprotein in BALB/cj (Pollard et al., 1982); the loss of Q6–Q7 and Q8–Q9 genes leading to the loss of the Qa-2 phenotype in BALB/cAnN mice (Mellor et al., 1985); a reduction in the number of copies of the Mup-1.5 gene in BALB/cj (Shi et al., 1989); the higher resistance to *T. crassiceps* cysticercosis in BALB/cj (Fragoso et al., 1998); variances in the feminization induced by *T. crassiceps* cysticercosis infection of male (Larralde et al., 1995; Aldridge et al., 2007) and differences in the innate susceptibility against *Plasmodium yoelii* infection (Kumar et al., 2009). Also, the notion that reduced exposure to infections during early life increases the risk of developing allergic conditions has been recently reviewed by Bremner et al. (2008). Thus, the change from conventional to pathogen-free conditions in our animal facilities may have had repercussions in the response of mice to infection.

Another possible cause of the change observed in PGP of BALB/cj mice could be that the parasite underwent modifications. In this respect, since 1986, parasites have been maintained by serial passages in BALB/cAnN females, every 2 months, to produce enough cysticerci for experimentation. Considering that cysticerci divide by budding, the parasite could have accumulated mutations that could eventually affect its growth. This possibility seemed feasible in view of important modifications in the parasite's characteristics, including the loss in capacity to reproduce by sexual division of the *T. crassiceps* ORF strain, originally obtained by Freeman in 1962, due to maintenance conditions (Smith et al., 1972). In spite of these considerations we found no evidence to support this possibility, since two parasite sequences, extensively employed to determine polymorphisms in cestodes, were analyzed and found insignificant (Tables 5 and 6). Although the evidence is not conclusive, it weakens the possibility that changes in the parasite account for differences in the host's PGP.

On the other hand, the modifications found in some of the immunological features, which usually parallel with the changes in PGP, point to their relevance in parasite growth control and merit a further comment. Pan-NK<sup>+</sup> and Mac-3<sup>+</sup> cells as well as IFN- $\gamma$  were found to relate to genetic PGR to infection (in BALB/cj mice), before the change in PGP. Nevertheless, the differences between the BALB/cAnN and BALB/cj strains regarding these immune features vanished along with the differences in PGP (Tables 1 and

4). Thus, the response elicited by Pan-NK<sup>+</sup> and Mac-3<sup>+</sup> cells could have affected the few parasites installed early after infection, inhibiting their reproductive capacity. In this respect, cysticerci may be affected by NK cells in a way that resembles their cytotoxic effects extensively reported on viruses, bacteria and even parasites (Lieke et al., 2004; Spörri et al., 2006). NK cells can also affect installed parasites by IFN- $\gamma$  production, which increase the effectors' activities of macrophages (Couper et al., 2007) and which were herein found to be increased in PGR mice. Indeed, macrophages can damage early cysticerci by induction of iNOS in the PGR STAT6<sup>-/-</sup> BALB/c mice, according to recently published results (Alonso-Trujillo et al., 2007).

Another finding which merits comments is the higher level of Pan-NK<sup>+</sup> and Mac-3<sup>+</sup> cells and IFN- $\gamma$  in the peritoneal cavity of naïve mice from the second stocks of both strains maintained under pathogen-free conditions, compared with mice of the first stocks, maintained under conventional conditions. Although it is difficult to discern the relative relevance of genetic differences from that of maintenance conditions, both could clearly affect the measured parameters.

In summary, we favor that modifications in BALB/cj PGP are probably due to genetic differences between mouse strains (the first stock vs the second stock) and/or heightened by differences in mouse maintenance conditions, via differences in immunological features of the strains, which are related to restriction of parasite growth.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Carlos Larralde for the critical revision of this manuscript; Gerardo Arrellín, Georgina Díaz, Mercedes Baca, Maribel Nieto Miranda and Adriana Ruiz Remigio for technical support. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This study was supported by the Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN-221905 and IN-226707), CONACYT (46953-M and 104915-M), and the Howard Hughes Medical Institute (55000643).

## References

- Aldridge, J.R., Jennette, M.A., Kuhn, R.E., 2007. BALB/cj male mice do not feminize after infection with larval *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology* 93, 190–191.
- Alonso-Trujillo, J., Rivera-Montoy, I., Rodríguez-Sosa, M., Terrazas, L.L., 2007. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology Research* 100, 1341–1350.
- Aluja, A.S., Martínez, M.J.J., Villalobos, A.N., 1998. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. *Veterinary Parasitology* 76, 71–79.
- Bailey, D.W., 1978. Sources of subline divergence and their relative importance for sublines of six major inbred strains of mice. In: Morse, H.C., III (Ed.), *Origin of Inbred Mice*. Academic Press, New York, pp. 197–215.
- Bremner, S.A., Carey, I.M., DeWilde, S., Richards, N., Maier, W.C., Hilton, S.R., Strachan, D.P., Cook, D.G., 2008. Infections presenting for clinical care in early life and later risk of hay fever in two UK birth cohorts. *Allergy* 63, 274–283.
- Brys, L., Beschin, A., Raes, G., Ghassabeh, G.H., Noël, W., Brandt, J., Brombacher, F., De Baetselier, P., 2005. Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *Journal of Immunology* 174, 6095–6104.
- Ciaranello, R.D., Hoffman, H.J., Shire, J.G.M., Axwirod, J., 1974. Genetic regulation of the catecholamine biosynthetic enzymes: II. Inheritance of tyrosine hydroxylase, dopamine  $\beta$ -hydroxylase and phenylethanolamine N-methyl transferase. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 4528–4536.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Hafalla, J.C., Van Rooijen, N., de Souza, J.B., Riley, E.M., 2007. Macrophage-mediated but gamma interferon-independent innate immune responses control the primary wave of *Plasmodium yoelii* parasitemia. *Infection and Immunity* 75, 5806–5818.
- Culbreth, K.L., Esch, G.W., Kuhn, R.E., 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda): 3. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of 14 C-leucine. *Experimental Parasitology* 32, 272–281.
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Govezensky, T., Sciuotto, E., 1996. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* 112, 119–124.

- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Hernández, M., Scitutto, E., 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66, 760–764.
- Freeman, R.S., 1962. Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40, 969–990.
- Gasser, R.B., Chilton, N.B., 1995. Characterization of taeniid cestode species by PCR-RFLP of ITS2 ribosomal DNA. *Acta Tropica* 59, 31–40.
- Gómez-García, L., López-Marín, L.M., Saavedra, R., Reyes, J.L., Rodríguez-Sosa, M., Terrazas, L.I., 2005. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunology* 27, 395–405.
- Gómez-García, L., Rivera-Montoya, I., Rodríguez-Sosa, M., Terrazas, L.I., 2006. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitology Research* 99, 440–448.
- Huerta, L., Terrazas, L.I., Scitutto, E., Larralde, C., 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Parasitology* 78, 471–476.
- Kumar, K.A., Baxter, P., Tarun, A.S., Kappe, S.H.L., Nussenzweig, V., 2009. Conserved protective mechanisms in radiation and genetically attenuated *uis3(-)* and *uis4(-)* *Plasmodium* sporozoites. *PLoS ONE* 4, 1–5.
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, L., Govezensky, T., Romano, M.C., 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 52, 575–580.
- Lieke, T., Graefe, S.E., Klauenberg, U., Fleischer, B., Jacobs, T., 2004. NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. *Infection and Immunity* 72, 6817–6825.
- López-Briones, S., Lamoyi, E., Fragoso, G., Soloski, M.J., Scitutto, E., 2003. *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. *Parasitology Research* 90, 236–242.
- Mayta, H., Talley, A., Gilman, R.H., Jimenez, J., Verastegui, M., Ruiz, M., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., 2000. Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin–eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 33–137.
- Mellor, A.L., Antoniou, J., Robinson, P.J., 1985. Structure and expression of genes encoding murine Qa-2 class I antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 5920–5924.
- Meri, T., Jokiranta, T.S., Suhonen, L., Meri, S., 2000. Resistance of *Trichomona vaginalis* to metronidazole: report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 763–767.
- Mooney, K.A., Spolski, R.J., See, E.J., Kuhn, R.E., 2000. Immune destruction of larval *Taenia crassiceps* in mice. *Infection and Immunity* 68, 2393–2401.
- Padilla, A., Govezensky, T., Scitutto, E., Jimenez-García, L.F., Consebatt, M.E., Ramirez, P., Larralde, C., 2001. Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology* 87, 591–599.
- Pollard, D.R., Woodward, B., Gupta, K., 1982. Strain and sex differences in serum  $\alpha$ -fetoprotein levels in *Mus musculus*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 24, 343–346.
- Potter, M., 1985. History of the BALB/cAnN family. *Current topics in microbiology and immunology* 22, 1–18.
- Potter, M., Wax, J., 1981. Genetics of susceptibility to pristane-induced plasmacytomas in BALB/cAnN: reduced susceptibility in BALB/cj with a brief description of pristane-induced arthritis. *The Journal of Immunology* 127, 1591–1595.
- Rodríguez-Sosa, M., Rosas, L.E., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I., 2003. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infection and Immunity* 71, 1247–1254.
- Scitutto, E., Fragoso, G., Baca, M., De la Cruz, V., Lemus, L., Lamoyi, E., 1995. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infection and Immunity* 63, 2277–2281.
- Scitutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C., Larralde, C., 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77, 243–246.
- Scitutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G., Larralde, C., 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* 12, 687–696.
- Shi, Y., Rodriguez, M., Shahan, K., Derman, E., 1989. Subfamily of submaxillary gland-specific Mup genes: chromosomal linkage and sequence comparison with liver-specific Mup genes. *Nucleic Acids Research* 17, 6191–6203.
- Smith, J.K., Esch, G.W., Kuhn, R.E., 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda): I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology* 2, 261–263.
- Spörri, R., Joller, N., Albers, U., Hilbi, H., Oxenius, A., 2006. MyD88-dependent IFN- $\gamma$  production by NK cells is key for control of *Legionella pneumophila* infection. *Journal of Immunology* 15, 6162–6171.
- Toledo, A., Cruz, C., Fragoso, G., Lacllette, J.P., Merchant, M.T., Hernández, M., Scitutto, E., 1997. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *Journal of Parasitology* 83, 189–193.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 84, 74–81.
- Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F., Larralde, C., 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research* 85, 135–141.
- Toenjes, S.A., Spolski, R.J., Mooney, K.A., Kuhn, R.E., 1999. Gamma delta T cells do not play a major role in controlling infection in experimental cysticercosis. *Parasitology* 119, 413–418.
- Villa, O.F., Kuhn, R.E., 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant energy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112, 561–570.
- Woodgyer, A., 2004. The curious adventures of *Trichophyton equinum* in the realm of molecular biology: a modern fairy tale. *Medical Mycology* 42, 397–403.

- CHANDLER, A. C. 1954. New strigeids from Minnesota birds and mammals. *American Midland Naturalist* **52**: 133–141.
- CLARK, G. M. 1964. One new and one previously unreported nasal mite (Acarina, Speleognathinae) from North American birds, with observations on speleognathid taxonomy. *Journal of Parasitology* **50**: 158–162.
- DABERT, J. 1992. Three new genera related to the genus *Syringobia* Trouessart & Neumann, 1888 (Astigmata: Pterolichoidea: Syringobiidae). *Genus (Wroclaw)* **3**: 211–231.
- . 1997. *Pilochaeta rafalskii*, a new species of the feather mite subfamily Magimeliinae Gaud, 1972 (Pterolichoidea: Pterolichoidea). *Genus (Wroclaw)* **8**: 27–38.
- DEBLOCK, S., AND C. VAUCHER. 1995. Les hymenolepidides de Charadriiformes. 5e note *Echinocotyle flavipedis* n. sp. (Cestoda), parasite de *Tringa flavipes* au Paraguay. *Parasite* **32**: 125–131.
- EUZEY, J., AND M. GRABER. 1975. Deuxieme enquete parasitologique en Guadeloupe. Note 1: Les trematodes des oiseaux aquatiques. *Bulletin-de-la-Societe-des-Sciences-Veterinaires-et-de-Medecine-Comparee-de-Lyon* **77**: 317–320.
- EVELEIGH, E. S., AND H. AMANO. 1977. A numerical taxonomic study of the mallophagan genera *Cummingsiella* (= *Quadriceps*), *Saemundssonina* (*Ischnocerca*: Philopteridae), and *Austromenopon* (*Amblycera*: Menoponidae) from alcids (Aves: Charadriiformes) of the northwest Atlantic with references to host–parasite relationships. *Canadian Journal of Zoology* **55**: 1788–1801.
- FERNANDES, B. M. M. 1976. Sobre as espécies Brasileiras da familia Cyclocoelidae Kossack 1911 (Trematoda, Cyclocoelidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **74**: 289–294.
- GRABER, M., AND J. EUZEY. 1976a. Deuxieme enquete parasitologique en Guadeloupe. Note 2: Les cestodes des oiseaux aquatiques. *Bulletin-de-la-Societe-des-Sciences-Veterinaires-et-de-Medecine-Comparee-de-Lyon* **78**: 153–171.
- , AND ———. 1976b. *Trichocephaloides beauporti* n. sp., cestode nouveau des Charadriiformes et de certains Passeriformes de la Guadeloupe. *Annales de Parasitologie* **51**: 189–198.
- GRABER, W. J. III, T. C. MAXWELL, F. WILLIAMS, AND K. A. ARNOLD. 1977. Towards a library on Texas birds. *Bulletin of the Texas Ornithological Society* **10**: 2–7.
- LUMSDEN, R. D. 1962. Four echinostome trematodes from Louisiana birds including a description of a new species. *Tulane Studies in Zoology* **9**: 301–308.
- PENCE, D. E. 1972. The nasal mites of birds from Louisiana. I. Dermanyssids (Rhinonyssinae) from shore and marsh birds. *Journal of Parasitology* **58**: 153–156.
- SECORD, M. L., AND A. G. CANARIS. 1993. The metazoan parasite community of migrating greater yellowlegs, *Tringa melanoleuca*, from the Rio Grande Valley, Texas and New Mexico. *Journal of Parasitology* **79**: 690–694.
- SELF, J. T., AND J. JANOVY, JR. 1965. *Kowalewskiella totani* n. sp. (Cestoda: Dilepididae) from *Totanus flavipes*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* **32**: 169–171.
- TAFT, S. J. 1975. Aspects of the life history of *Cyclocoelum brasilianum* Stossich 1902 (Trematoda: Cyclocoelidae). *Journal of Parasitology* **61**: 1041–1043.
- TIBBITTS, T. L., AND W. MOSKOFF. 1999. Lesser yellowlegs (*Tringa flavipes*). In *The birds of North America*, No. 427, A. Poole and F. Gill (eds.). *The Birds of North America, Inc.*, Philadelphia, Pennsylvania, Sections 1, 3, 5–7, and 11.

*J. Parasitol.*, 94(2), 2008, pp. 551–553  
© American Society of Parasitologists 2008

## Preferential Growth of *Taenia crassiceps* Cysticerci in Female Mice Holds Across Several Laboratory Mice Strains and Parasite Lines

G. Fragoso, G. Meneses, E. Scitutto, A. Fleury\*, and C. Larralde†, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, México, D.F., C.P. 04510, México; \*Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, C.P. México, D.F., México; †To whom correspondence should be addressed. e-mail: larralde@servidor.unam.mx

**ABSTRACT:** A retrospective study of our 14-yr records on experimental *Taenia crassiceps* (ORF<sub>fast</sub> line) cysticercosis (n = 1,198) shows that in 16 of 17 different mice strains, female mice are more frequently infected and carry larger individual parasite loads than males. However, sexual differences in parasite loads significantly varies between strains in relation to their different genetic backgrounds (BALB > C57Bl = OTHERS > C3H). The coefficient of variation in all female mice is significantly smaller than that of all males, an indication of males' more potent, but erratically effective, restraint of cysticercus growth. Similar positive growth bias for female mice is shown by other lines of cysticerci, i.e., HYG<sub>slow</sub> and WFU<sub>slow</sub>. These results contravene the usual expectation of female hosts being more resistant than males to parasite infections, and they point to the multiple factors that combined determine sex related differences of mice to experimental cysticercosis infection.

It is generally held that female vertebrates are more resistant than males to parasite infections, despite the many shortcomings of such a "female supremacy paradigm" (Addis, 1946; Zuk and McKean, 1996; Brei and Fish, 2002; Owens, 2002; Morales-Montor et al., 2004). A very conspicuous exception is that BALB/cAnN female mice are more frequently experimentally infected with *Taenia crassiceps* cysticerci (ORF<sub>fast</sub>) and carry greater individual parasite loads (PLs) than male mice (Larralde et al., 1989; Scitutto et al., 1991). Curious in assessing the general validity for mice of this one exception to the female supremacy paradigm, and in search of the biological factors involved, we examined our 14-yr records in experimental murine cysticercosis in

search of sexual differences to infection among several laboratory strains of mice.

In total, 1,198 mice (604 females and 594 males), from 17 different inbred strains of 4 different genetic backgrounds (Table I), were included in the retrospective analysis of records dating from 1990 to 2004. The strains studied are known to vary in terms of their immunology, endocrinology, and pathology, which could collectively influence the host's response to infection (Spinedi et al., 1992, 1997; Frederic et al., 1993; Mucci et al., 2005). The mice included had all been used as "untreated controls," and they had been similarly infected as the experimental mice in studies originally designed to test other questions related to infection, immunity, and genetics (Scitutto et al., 1990, 1991; Fragoso et al., 1996, 1998). The cysticerci used came from 3 different lines, which differ in their rate of reproduction and capacity to develop into adult tapeworms: HYG<sub>slow</sub> and WFU<sub>slow</sub> lines are capable of full development, whereas ORF<sub>fast</sub> is incapable (Freeman, 1962; Smith et al., 1972; Chau and Freeman, 1976; Everhart et al., 2004). Because of its fast reproduction, cysticerci from the ORF<sub>fast</sub> line were mostly used in experiments, but all lines were kept in the Institute's animal facility by serial passage in donor BALB/cAnN female mice, as described previously (Scitutto et al., 1990, 1991). Parasites for infection were harvested from the peritoneal cavities of the BALB/cAnN female donors, 1 to 3 mo after infection. To evaluate the intensity (I) in each individual mouse from all the mouse strains, 10 mice from each sex were injected intraperitoneally with 10 small (2-mm-diameter) nonbudding cysticerci, suspended in phosphate-buffered saline. Thirty days after infection, mice were killed following the principles set forth in the Guide for the

TABLE I. Effects of the host's sex and genetic background upon individual *I* and proportion of totally resistant mice ( $R = n_0/n$ ) after 30 days of infection with the ORF<sub>fast</sub> strain of *T. crassiceps*. All the 17 strains tested are shown ordered by genetic background families (BALB, C57BL, C3H, and Others) and strain denomination (cAnN, B, K, and so on), along with the corresponding means.

Family and strain	Females			Males			Probability of equalities between sexes in	
	n*	PL ( $\bar{x} \pm SD$ )	n <sub>0</sub> †	n	PL ( $\bar{x} \pm SD$ )	n <sub>0</sub>	R	I
<b>BALB/</b>								
cAnN	145	115 ± 8	0	133	29 ± 3	0	—	<0.0001
B	58	23 ± 4	3	60	41 ± 0.4	26	<0.0001	<0.0001
K	35	36 ± 11	5	35	0.4 ± 0.9	30	<0.0001	<0.0001
cByJ	20	31 ± 5	4	20	4 ± 1.8	6	0.46	<0.0001
cJ	30	4 ± 0.5	7	30	0.2 ± 0.04	20	0.001	<0.0001
Totals	288	209 ± 28	19	278	34 ± 6	82	<0.0001	<0.0001
<b>C57BL/</b>								
6J	48	7 ± 3	15	40	0.4 ± 0.2	30	<0.0001	<0.0001
B6.K1	18	0	18	18	0	18	—	—
10J	20	23 ± 6	0	20	0	20	<0.0001	—
B10.D2	20	16 ± 3	0	20	0	20	<0.0001	—
B10.D2(R103)	20	18 ± 3	15	20	0.7 ± 0.5	16	1	<0.0001
B10.D2(R107)	20	22 ± 4	0	20	0.4 ± 0.4	14	<0.0001	<0.0001
B10.A2R	20	18 ± 5	0	20	0	20	<0.0001	—
Totals	166	104 ± 24	48	158	2 ± 1	138	<0.0001	<0.0001
<b>C3H/</b>								
HeJ	15	22 ± 5	3	15	4 ± 26	10	0.01	0.019
HeB/FeJ	10	6 ± 2	4	21	3 ± 1	6	0.68	0.0009
Totals	25	28 ± 7	7	36	7 ± 27	16	0.19	<0.0001
<b>Others</b>								
Tg1	14	28 ± 18	0	13	3 ± 5	7	0.002	0.0002
Tg2	19	16 ± 15	1	17	0.1 ± 0.4	10	<0.0001	0.0002
A/J	92	111 ± 5	0	92	23 ± 2	9	0.003	<0.0001
Totals	125	155 ± 38	1	122	26.1 ± 7.4	26	<0.0001	<0.0001
Totals	604	496 ± 97	75	594	69 ± 42	262	<0.0001	<0.0001

\* n, number of mice.

† n<sub>0</sub>, number of resistant mice.

Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC), and their individual intraperitoneal *I*s were counted macroscopically, as described previously (Sciutto et al., 1991).

Table I shows the effects of sex and genetic background of mice upon the *I*s of the individual mice and upon the proportion ( $R = n_0/n$ ) of totally resistant mice (n<sub>0</sub> being the number of mice with zero parasites) in each group of n mice, 30 days after infection, expressed as the means, standard deviations in all the 17 mouse strains studied.

In 16 of the 17 mouse strains infected with ORF<sub>fast</sub> cysticerci, female mice had significantly higher *I* values and lower *R* values than those of males, the only exception being B6.K1, in which the parasite did not grow in either host sex. Significant differences in *I* and *R* were also found within each sex in all strains, between strains sharing the same genetic background, and within sex in many of the strains. BALB strains were the most permissive of parasite growth and C57BL strains the most restrictive. The major histocompatibility (MHC) haplotypes and the nonclassical MHC Qa-2 protein were also involved in sexual dimorphism to infection, but in a complex manner (Qa-2 only relates with resistance in [BALB/cAnN × C57BL/6J] F1 Qa-2 transgenic male mice). Sexual differences within each strain do not relate to the magnitude of the strain's total ( $I_{\text{males}} + I_{\text{females}}$ ) PL. The contribution of males to the total variances (the sum of all strains' and both sexes' variances) in *I* and *R* is larger than that of females, meaning that the between-strain differences come mostly from differences between males. It would then seem that many other genes, besides the MHC complex, contribute or regulate the degree of sexual dimorphism of mice to cys-

ticercosis, some significant genes apparently located in the Y chromosome.

Notwithstanding the general validity of a positive biased growth of *T. crassiceps* in female mice, the significant variation in the magnitude of sexual differences among the different mouse strains presages other profiles of the sex-related differences may be found in different experimental conditions, i.e., different times after infection, or in other organic compartments, or when measured in ways other than intensity, i.e., prevalence, severity, or mortality. Strain variation in sexual differences could underlie in the discrepancy found between the changes in endocrinological profiles reported for the infected male BALB/cAnN mice, which become estrogenized and deandrogenized in late infections (Escobedo et al., 2005; Morales-Montor and Larralde, 2005; Aldridge et al., 2007), and those apparently stable endocrinological profiles of the more resistant BALB/cJ mice, found at earlier times after infection (Aldridge et al., 2007). These findings confirm that female mice are more permissive to the intraperitoneal growth of *T. crassiceps* than male mice in a variety of laboratory mice through the mediation of complex mechanisms involving the genetic background of the host.

How the role of hosts' sex in each parasite infection operates in cellular and molecular detail is fascinating and largely unexplored in many different parasite infections (Zuk and McKean, 1996). In experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis, at least, the host-parasite relationship involves a complex network that includes the endocrine, immune, and nervous systems of the host, in association with the reproductive system of the parasite (Morales-Montor et al., 2004). These systems regulate cellular differentiation, reproduction, and apoptosis

through genes, hormones, cytokines, antigens, receptors, antibodies, and metabolic pathways of both the host and the parasite (Morales-Montor and Larralde, 2005); thus, they modulate the outcome of infection. As a consequence of such complexity, the sexually dimorphic profile in a given parasite infection may also vary in its form of expression (i.e., prevalence, intensity, severity, or mortality), and with the time and anatomical location of the infection, the developmental stage of the infecting parasite, the effectiveness of the host immune response, and environmental factors (e.g., stress, concomitant infections, nutrient availability, or predators) acting upon both host and parasite in laboratory or natural conditions (Klein, 2004; Morales-Montor and Larralde, 2005).

We are confident that other host-parasite interactions are governed by similar factors and in different ways, but with comparable complexity. If so, claims of an inflexibly biased sexual dimorphism affecting all host-parasite interactions should be narrowed to the particular infection under consideration.

#### LITERATURE CITED

- ADDIS, C. J. 1946. Experiments on the relation between sex hormones and the growth of tapeworms (*Hymenolepis diminuta*) in rats. *Journal of Parasitology* **32**: 574–580.
- ALDRIDGE, J. R., JR., M. A. JENNETTE, AND R. E. KUHN. 2007. BALB/cJ male mice do not feminize after infection with larval *Taenia crassiceps*. *Journal of Parasitology* **93**: 190–191.
- BREI, B., AND D. FISH. 2002. Comment on “Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals.” *Science* **297**: 2015–2018.
- CHAU, C. Y., AND R. S. FREEMAN. 1976. Intraperitoneal passage of *Taenia crassiceps* in rats. *Journal of Parasitology* **62**: 837–839.
- ESCOBEDO, G., C. W. ROBERTS, J. C. CARRERO, AND J. MORALES-MONTOR. 2005. Parasite regulation by host hormones: An old mechanism of host exploitation? *Trends in Parasitology* **21**: 588–593.
- EVERHART, M. E., R. E. KUHN, AND D. A. ZELMER. 2004. Intrapopulation dynamics of a wild strain of *Taenia crassiceps* (WFU) (Cestoda: Taeniidae) in BALB/cJ mice. *Journal of Parasitology* **90**: 79–84.
- FRAGOSO, G., E. LAMOYI, A. MELLOR, C. LOMELI, T. GOVEZENSKY, AND E. SCIUTTO. 1996. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* **112**: 119–124.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, M. HERNANDEZ, AND E. SCIUTTO. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* **66**: 760–764.
- FREDERIC, F., C. OLIVER, E. WOLLMAN, N. DELHAYE-BOUCHAUD, AND J. MARIANI. 1993. L-1 and LPS induce a sexually dimorphic response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in several mouse strains. *European Cytokine Network* **4**: 321–329.
- FREEMAN, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* **40**: 969–990.
- KLEIN, S. L. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology* **26**: 247–264.
- LARRALDE, C., E. SCIUTTO, L. HUERTA, I. TERRAZAS, G. FRAGOSO, L. TRUEBA, D. LEMUS, C. LOMELI, G. TAPIA, R. M. MONTOYA, T. GOVEZENSKY, AND C. LARRALDE. 1989. Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia* **57**: 131–134.
- MORALES-MONTOR, J. A. CHAVARRIA, M. A. DE LEON, L. I. DEL CASTILLO, E. G. ESCOBEDO, E. N. SANCHEZ, J. A. VARGAS, M. HERNANDEZ-FLORES, T. ROMO-GONZALEZ, AND C. LARRALDE. 2004. Host gender in parasitic infections of mammals: An evaluation of the female host supremacy paradigm. *Journal of Parasitology* **90**: 531–546.
- \_\_\_\_\_, AND C. LARRALDE. 2005. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: The case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* **131**: 287–294.
- MUCCI, J., E. MOCETTI, M. A. LEGUIZAMON, AND O. CAMPETELLA. 2005. A sexual dimorphism in intrathymic sialylation survey is revealed by the trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* **174**: 4545–4550.
- OWENS, I. P. 2002. Ecology and evolution: Sex differences in mortality rate. *Science* **297**: 2008–2009.
- SCIUTTO, E., G. FRAGOSO, L. TRUEBA, D. LEMUS, R. M. MONTOYA, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, G. TAPIA, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* **12**: 687–696.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, M. L. DIAZ, F. VALDEZ, R. M. MONTOYA, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, AND C. LARRALDE. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* **77**: 243–246.
- SMITH, J. K., G. W. ESCH, AND R. E. KUHN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology* **2**: 261–263.
- SPINEDI, E., A. CHISARI, F. PRALONG, AND R. C. GAILLARD. 1997. Sexual dimorphism in the mouse hypothalamic-pituitary-adrenal axis function after endotoxin and insulin stresses during development. *Neuroimmunomodulation* **4**: 77–83.
- \_\_\_\_\_, M. O. SUESCUN, R. HADID, T. DANEVA, AND R. C. GAILLARD. 1992. Effects of gonadectomy and sex hormone therapy on the endotoxin-stimulated hypothalamo-pituitary-adrenal axis: Evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Endocrinology* **131**: 2430–2436.
- ZUK, M., AND K. A. MCKEAN. 1996. Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology* **26**: 1009–1023.

## The Association of *Zygocotyle lunata* and *Echinostoma trivolvis* with *Chaetogaster limnaei*, an Ectosymbiont of *Helisoma trivolvis*

Bernard Fried, Robert C. Peoples, Tyler M. Saxton, and Jane E. Huffman\*, Department of Biology, Lafayette College, Easton, Pennsylvania 18042; \*Department of Biology, East Stroudsburg University, East Stroudsburg, Pennsylvania 18301. e-mail: friedb@lafayette.edu

ABSTRACT: *Helisoma trivolvis* snails collected from a lake in Warren County, New Jersey, in June 2007 possessed the ectosymbiont *Chaetogaster limnaei* (Annelida). Some of these snails were also infected with larval stages of *Zygocotyle lunata* and *Echinostoma trivolvis*. *Chaetogaster limnaei* associated with the infected snails fed on the cercariae of both digeneans. *Zygocotylae lunata* cercariae were observed in the stomach of *C. limnaei* and whole cercariae were loosely attached

to the ventral surface of the chaetogasters. Cercariae in the stomachs were digested within 48 hr and probably served as a source of nutrient for the annelids. Whole cercariae and 1 nonviable metacercaria of *E. trivolvis* were seen in the stomachs of the chaetogasters. The protective action of the chaetogasters on the transmission of the cercariae of *E. trivolvis* and *Z. lunata* to second intermediate hosts in the wild awaits further study.



#### COPYRIGHT INFORMATION

TITLE: Preferential Growth of *Taenia crassiceps* Cysticerci in Female Mice Holds Across Several Laboratory Mice Strains and Parasite Lines

SOURCE: J Parasitol 94 no2 Ap 2008

The magazine publisher is the copyright holder of this article and it is reproduced with permission. Further reproduction of this article in violation of the copyright is prohibited. To contact the publisher:  
<http://www-museum.unl.edu/asp/>

## 5. Planteamiento del problema

En la cisticercosis experimental murina se han encontrado claras diferencias de permisividad entre cepas y sexos. Si bien se ha avanzado en el estudio de la respuesta inmune inducida por la infección, poco se ha ahondado en caracterizar la respuesta inmune innata y adaptativa que media las diferencias de restrictividad/permisividad a la instalación y reproducción del parásito entre cepas de distinto fondo genético y entre sexos. Debe considerarse que la respuesta innata que se establezca en el primer contacto entre el hospedero y el parásito es fundamental para determinar el curso de la infección, así como la evolución de la respuesta inmune adaptativa. En este trabajo de tesis se estudiará la participación de la respuesta innata en mediar dichas diferencias de permisividad/restrictividad a la infección. También se evaluará si existe una relación entre la respuesta innata y el perfil hormonal sexual que participe en la restrictividad/permisividad a la infección entre hembras y machos de la misma cepa y de cepas diferentes.

## 6. HIPÓTESIS

La permisividad en el establecimiento y desarrollo de la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* depende de diferencias en la respuesta innata entre las cepas permisivas y no permisivas, así como su interacción con las diferencias dadas por el género, que modifican la respuesta innata.

## 7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relevancia de la respuesta inmune innata local en hospederos hembras y machos, permisivos y restrictivos al establecimiento y desarrollo de la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar los componentes inmunológicos tempranos que participan en el control de la instalación de la parasitosis (células peritoneales y citocinas peritoneales) en ratones de cepas permisivas (BALB/cAnN) y restrictivas (BALB/cJ y C57BL/6J).
- Evaluar el efecto del fondo genético y del género asociado con la respuesta inmune innata durante la instalación a la parasitosis.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales e infección

#### Ratones

Para este trabajo se utilizaron hembras y machos de ratones que presentan diferente grado de permisividad al establecimiento y la reproducción del cisticerco de *Taenia crassiceps*: BALB/cAnN (permisivos), BALB/cJ y C57BL7/6J (restrictivos).

En un primer estudio evaluamos la respuesta temprana en dos sublíneas de ratones hembras de la cepa BALB/c (BALB/cAnN y BALB/cJ). Como se mencionó en la introducción, durante el tiempo de estudio el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) cambió de convencional a libre de patógenos, lo cual implicó una renovación de ambas cepas de ratones. El primer grupo de ratones BALB/cAnN y BALB/cJ utilizados fueron mantenidos en el bioterio convencional del IIB. La cepa de ratones BALB/cAnN fue obtenida de los laboratorios Charles and Rivers (Estados Unidos) y mantenida por el bioterio desde 1982, y la cepa BALB/cJ fue donación de National Institute for Medical Research (Reino Unido) desde 1992.

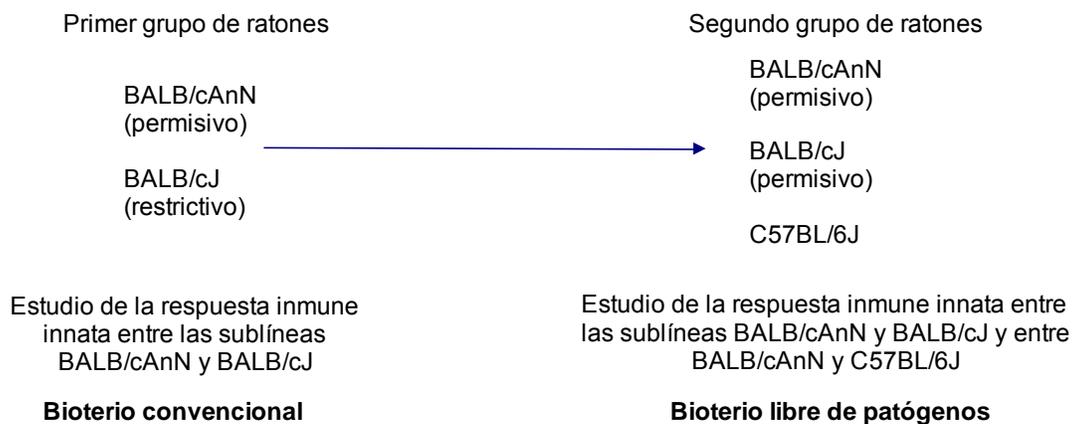
El segundo grupo de ratones utilizados en este estudio se mantuvo en un bioterio libre de patógenos, y las cepas originales se obtuvieron en 2002 de los laboratorios Harlan para el caso de BALB/cAnN y de los laboratorios Jackson para BALB/cJ (Figura 1).

La segunda parte del trabajo de tesis implicó caracterizar la respuesta inmune innata entre cepas de diferente fondo genético y de los dos sexos con distinto

grado de permisividad a la cisticercosis; para ello se utilizaron hembras y machos de las cepas BALB/cAnN (permisiva) y C57BL/6J (restrictiva) mantenidos en condiciones libres de patógenos y procedentes de los laboratorios Harlan.

Todos los ratones utilizados tuvieron de 4 a 6 semanas de edad y recibieron agua y comida *ad libitum* en el bioterio del IIB.

Figura 4. Esquema de los ratones utilizados durante este estudio.



## Infección

La infección de los ratones se realizó con cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF, aislados por Freeman en 1962 y donados por el Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) en 1985; desde entonces se han mantenido por pases seriales entre ratones hembras de la cepa BALB/cAnN en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Los pases seriales se realizan en hembras de la cepa BALB/cAnN de 4 a 6 semanas de edad, infectadas intraperitonealmente con 20 cisticercos de 2 mm de diámetro, vesiculares y no gemantes, con solución salina isotónica estéril (SSI), los cuales se introdujeron en la cavidad peritoneal de los ratones a través de una jeringa de insulina con aguja de calibre 27G. Después de 2 a 3 meses de infección se sacrificaron los ratones en una cámara de CO<sub>2</sub> y se recuperaron los cisticercos, los cuales se lavaron varias veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y se seleccionaron para infectar los ratones experimentales.

Para las infecciones experimentales, los ratones se infectaron con 10 cisticercos por ratón en las mismas condiciones en las que se infectaron los ratones stock. El sacrificio de los ratones se realizó mediante una cámara de CO<sub>2</sub>, 3 y 5 días posteriores a la infección.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS

### Lavado peritoneal

Para la obtención de células y fluido peritoneal, los ratones se sacrificaron como se mencionó en el apartado anterior y se les inyectó 1 ml de solución salina isotónica (ISS) estéril; se dio un masaje y se recuperó la suspensión peritoneal. Se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C y se colectó el sobrenadante, el cual se guardó a -20°C para medir citocinas y hormonas. El botón celular se resuspendió en 1 ml de amortiguador de fosfatos (PBS)

suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (SFB) y 0.2% de  $\text{NaN}_3$  a  $4^\circ\text{C}$  y se mantuvo en hielo.

Viabilidad de los cisticercos recuperados de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J in vitro

Con el fin de conocer si el contacto con los mecanismos de defensa del hospedero durante los primeros días de infección era suficiente para dañar al parásito, decidimos evaluar la viabilidad de los cisticercos recuperados de cada ratón, para lo cual los cisticercos recuperados a los 3 y 5 días posteriores a la infección de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J se colocaron en placas de 16 pozos con 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 1 ml de penicilina estreptomicina SIGMA, a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , durante quince días. El medio se enriqueció dos veces por semana con 750  $\mu\text{l}$  de medio, y al día quince se cuantificó el número de cisticercos y se evaluó el estado de éstos como vesiculares o coloidales.

## CARACTERIZACIÓN DEL INFILTRADO INFLAMATORIO

### CÉLULAS PERITONEALES

#### Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E)

Como un primer análisis se realizó una caracterización celular del infiltrado inflamatorio por microscopía óptica. De cada muestra se tomaron 20  $\mu\text{l}$  y se realizaron frotis de la suspensión celular. Los frotis se fijaron con metanol al 70% durante 10 minutos y se tiñeron con H-E.

Se realizó la identificación y cuantificación de las diferentes poblaciones celulares obtenidas de los lavado peritoneales de ratones no infectados (controles) e infectados con *Taenia crassiceps*.

Las preparaciones se sumergieron durante 10 minutos en hematoxilina, se lavaron al chorro de agua, se pasaron por baños de alcohol ácido (1:100), nuevamente se lavaron al chorro de agua y se pasaron por baños de carbonato de litio (0.01 M); se lavaron en agua, se trataron con eosina y se pasaron por alcohol 96%, alcohol absoluto y xilol; después se montaron con cera comercial.

#### Citometría de flujo

Con el fin de evaluar las poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de los ratones y profundizar en la caracterización del infiltrado inflamatorio, las células se analizaron por citometría de flujo.

Para el marcado de las células con los anticuerpos específicos, se colocaron  $5 \times 10^5$  células (contadas por un hemocitómetro) en 50  $\mu$ l PBS\*, y se bloquearon los receptores Fc para evitar el pegado inespecífico con un anticuerpo monoclonal anti CD16/CD32 purificado (Pharmingen) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron las células y se pusieron a incubar con los distintos anticuerpos. Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 3.

Las reacciones se realizaron en 20  $\mu$ l de PBS\* y se dejaron incubar durante 30 minutos a 4°C en la oscuridad; las células se lavaron tres veces con 200  $\mu$ l de PBS\* frío, se centrifugaron a 2000 rpm y se decantó el sobrenadante. En el caso de las reacciones con anticuerpos biotinilados, se adicionó estreptoavidina acoplada a un fluorocromo, las células se incubaron durante 30

minutos y se lavaron como se describió anteriormente. Finalmente, las células se fijaron con formaldehído al 1% en SSI y se adquirieron en un citómetro FACScan o FACScalibur (Becton and Dickinson) y se analizaron mediante el programa de Cell Quest (Becton and Dickinson).

Tabla 2. Reacciones para la caracterización celular por citometría de flujo

<b>ESTUDIO</b>	<b>Población celular</b>	<b>Reacción directa</b>		<b>Reacción indirecta</b>
<b>Permisividad entre diferentes cepas</b>	Esplenocitos Qa-2+			Qa-2 biotilado, Estreptoavidina (PE)
<b>Sublíneas de BALB/c BALB/cAnN vs BALB/cJ</b>	Células NK Macrófagos	CD69 (FITC) F4/80-Mac3 (PE)-(FITC)		
<b>BALB/cAnN vs C57BL/6J</b>		<b>BALB/cAnN</b>	<b>C57BL/6J</b>	
	Células NK	CD69	NK1.1	
	Células NKT	CD69/CD3	NK1.1/CD3	
	IKDCs	CD69/CD11c/B220	NK1.1/CD11c/B220	
	DCs	CD11c	CD11c	
	Macrófagos	F4/80	F4/80	

## LAVADO PERITONEAL

### DETERMINACIÓN DE IL-12 e IFN $\gamma$ POR ELISA

Con el fin de conocer si las diferencias de permisividad a la infección entre las cepas estudiadas se asocian con un perfil diferente de citocinas proinflamatorias, se evaluaron dos de las principales citocinas proinflamatorias, IL-12 e IFN $\gamma$ , en los sobrenadantes de los lavados peritoneales de ratones infectados y de los controles.

La concentración de IL-12 e IFN $\gamma$  fue determinada por ELISA, utilizando para IL-12 el anticuerpo de captura anti-ratón IL-12 (p40) BD Pharmingen; el anticuerpo de detección anti-ratón IL-12 (p40) (BD Pharmingen, No. de catálogo 554476) y la IL-12 recombinante [2  $\mu$ g a 40  $\mu$ g] (BD Pharmingen, No. de catálogo 19401W), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Para IFN $\gamma$  se utilizaron los anticuerpos de captura anti-ratón IFN $\gamma$  (BD Pharmingen, No. de catálogo 18181D), anticuerpo de detección anti-ratón IFN $\gamma$  (BD Pharmingen, No. de catálogo 18112D) y el IFN recombinante [10  $\mu$ g/500  $\mu$ l, 20  $\mu$ g/ml] de Genzyme, siguiendo las indicaciones del proveedor.

Determinación de los niveles de TGF $\beta$  en lavados peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J

Con el fin de conocer si TGF $\beta$  está siendo secretado por las células peritoneales durante la cisticercosis experimental, y así pueda ejercer una función antiinflamatoria que medie las diferencias de permisividad a la

infección, o bien que pueda ser utilizado por el parásito para lograr su reconstitución o mejorar sus funciones metabólicas, evaluamos los niveles de TGF $\beta$  en los sobrenadante de los lavados peritoneales de ratones infectados y de los controles.

El TGF $\beta$  se evaluó en el líquido peritoneal de todos los grupos experimentales por ELISA, utilizando el KIT comercial TGF $\beta$  (BD Pharmingen, San Diego, CA, ambas citocinas) y siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, el ensayo se realizó en placas de 96 pozos de microtitulación de fondo plano (Nunc-Immuno mural Maxisorp, Rosekilde, Dinamarca). Las placas fueron recubiertas con el anticuerpo de captura por 18 horas a 4°C (BD Pharmingen, San Diego, CA, ambas citocinas). Después se lavaron con PBS-Tween-20 (0.05%) y se bloquearon por 30 minutos a temperatura ambiente con PBS-BSA 2%; las placas se incubaron durante 18 h con la recombinante y las muestras, respectivamente, a 4°C, se lavaron tres veces y se incubaron con el anticuerpo de detección a temperatura ambiente durante 2 h. los anticuerpos de detección unidos fueron identificados con conjugado diluido estreptoavidina-fosfatasa 1:10,000 (BD Pharmingen) y p-nitrofenilfosfato (Sigma) como sustrato. Se leyó a una densidad óptica (DO) de 405 nm a los 30 y 60 minutos de la incubación. El análisis de sensibilidad para TGF $\beta$  se midió en pg/ml.

## ESTUDIO DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Estudio del espaciador transcrito interno (ITS) entre cisticercos procedentes de diferentes stocks de ratones BALB/cAnN

Durante el cambio de bioterio de convencional a libre de patógenos se renovaron las cepas de ratones, y con los nuevos grupos de ratones perdimos las diferencias en la permisividad entre BALB/cAnN y BALB/cJ. Con el fin de evaluar si este cambio en las cepas de ratones había afectado al parásito, decidimos realizar un estudio de variabilidad genética a través del espaciador transcrito interno (ITS).

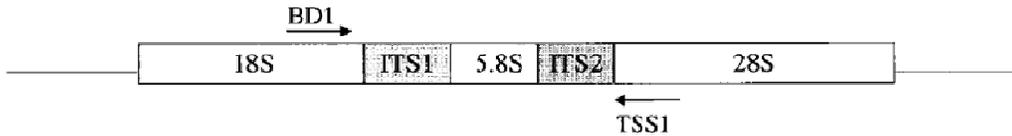
El ITS se ha utilizado para estudios intra e interespecíficos en varios parásitos, incluyendo *Taenia solium* (Mayta et al., 2000; Cuervo et al., 2004).

Para este estudio utilizamos parásitos que provenían del primer grupo de ratones BALB/cAnN que se habían utilizado para otro estudio en el año 2000 y que se encontraban en etanol al 70% a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y parásitos obtenidos del segundo grupo de ratones en el año 2004.

Primero se obtuvo el DNA genómico de los cisticercos con el KIT Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo las instrucciones del proveedor. La calidad y cantidad de DNA se cuantificó por espectrofotometría.

La amplificación del ITS por PCR se realizó utilizando los oligonucleótidos BD1 y TSS1.

### Espaciador transcrito interno (ITS)



Structure of a single rDNA repeat unit showing the primer annealing position for the PCR-REA (~1300pb)

**BD1:** 5' GTCGTAACAAGGTTTCCGTA 3'

**TSS1:** 5' ATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAATC 3'

Tabla 3. Reacciones de PCR

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
DNA 100 ng		100 ng	Depende de concentración inicial
Buffer	10×	1×	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 mM	5 µl
Dntp	10 mM	10 mM	1 µl
BD1	4.2 ng/µl	Dil. 1:42	1 µl
TSS1	4.9 ng/µl	Dil. 1:49	1 µl
Taq polimerasa	10 U	1U	1 µl
H <sub>2</sub> O			Lo que falte para llegar a 50 µl

Los ciclos de PCR para amplificación del ITS fueron: un ciclo de 5 minutos a 94°C y 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minutos a 72°C, 7 minutos a 72°C.

El producto del PCR se corrió en un gel de agarosa 1% con TAE y 1 µl de bromuro de etidio a 100 V, adicionando 1 µl de la solución de stop + 5 µl del producto del PCR.

#### Purificación del ITS

La purificación del ITS se llevó a cabo con el kit MinElute PCR Purification kit (Qiagen, Cat. No 28004).

Las bandas obtenidas del PCR se cortaron y pesaron. Se adicionó el triple del volumen del gel de la solución amortiguadora QG.

Se incubaron durante 10 minutos a 50°C y se adicionó 1 volumen de isopropanol, se transfirió la columna de purificación a tubos de 2 ml y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm.

El sobrenadante se descartó y se adicionaron 500 µl de la solución QG, se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm y se descartó el sobrenadante.

Nuevamente se transfirió la columna de purificación a tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de agua. Después de 2 minutos de incubación, se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se guardó a 4°C.

El ITS purificado se corrió en un gel de agarosa 1%, utilizando 2  $\mu$ l del ITS purificado para confirmar su peso molecular, y el resto del ITS se mandó a secuenciar.

#### Análisis estadísticos

Todos los resultados fueron analizados por ANOVA (análisis de varianza) seguidos de una prueba *t* de Student para determinar las diferencias. Para los resultados no paramétricos se realizó la prueba de Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank; se reportan diferencias significativas con  $P < 0.05$ .

## 9. RESULTADOS

Diferencias en la permisividad de la cisticercosis experimental murina causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps* en dos sublíneas de BALB/c: BALB/cAnN y BALB/cJ

En este trabajo comenzamos evaluando la respuesta inmune en dos sublíneas de BALB/c: BALB/cAnN, reportada como la cepa evaluada más permisiva, y BALB/cJ, considerada una cepa restrictiva a la infección por *Taenia crassiceps* (Fragoso et al., 2008).

Hay pocas diferencias fenotípicas reportadas entre estas dos sublíneas, y entre ellas destaca la expresión de la proteína Qa-2, cuya expresión está relacionada con la restricción en el incremento de la carga parasitaria en la cisticercosis (Fragoso et al., 1996). Se evaluó la participación de la respuesta temprana en la mediación de las diferencias de susceptibilidad.

Durante el tiempo en que se realizó este trabajo, el bioterio de nuestro Instituto cambió de convencional a libre de patógenos, lo que implicó cambios de infraestructura, mantenimiento y alimentación, así como la renovación de los pies de cría de las cepas de ratones mantenidas en el bioterio.

En el inicio del estudio, como se mencionó en la metodología, los ratones BALB/cAnN mantenidos en el bioterio fueron adquiridos de Charles and Rivers en 1982, y los ratones BALB/cJ fueron donados por National Institute for Medical Research en 1992; ambos stocks de ratones fueron mantenidos por

cruzas entre hermanos en el bioterio del Instituto hasta 2004, fecha cuando el bioterio se renovó con condiciones libres de patógenos y ambas cepas fueron renovadas.

Estos cambios en el bioterio repercutieron las diferencias de permisividad a la infección por *Taenia crassiceps*, y ahora BALB/cJ es tan permisiva a la infección como BALB/cAnN. Cabe señalar que los cambios en la permisividad a la infección, si bien son sorprendentes, no son inesperados, considerando que las cepas sufren cambios genéticos a lo largo de su separación. Como se observa en la figura 1, la línea de BALB/c se ha movido a distintos lugares geográficos generando distintas sublíneas, entre las que destacan las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ, cuyas modificaciones genéticas se han traducido en diferencias fenotípicas asociadas con distintos fenómenos biológicos (Tabla 1).

Por esta razón, el estudio de la respuesta temprana realizado en las sublíneas de BALB/c se presenta con ratones del primer grupo mantenidos en el bioterio convencional (antes de 2004, cuando las diferencias de permisividad se mantenían, con BALB/cAnN permisiva y BALB/cJ restrictiva) y con ratones del segundo grupo, mantenidos en el bioterio libre de patógenos (después del 2004, cuando ambas sublíneas de BALB/c son permisivas a la infección).

DIFERENCIAS EN LA PERMISIVIDAD A LA INSTALACIÓN Y REPRODUCCIÓN DE LA CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL CAUSADA POR *Taenia crassiceps*

BALB/cJ pierde su capacidad restrictiva a la instalación y reproducción de los cisticercos de *Taenia crassiceps*

La diferencia en la carga parasitaria a treinta días de infección entre las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ se ha reportado desde 1996 por Fragoso y colaboradores; nosotros nos preguntamos si esas diferencias en el número de parásitos se presentaban desde tiempos tempranos (3 y 5 días de infección), por lo que cuantificamos la carga parasitaria en ratones hembras de estas dos sublíneas de BALB/c.

Con el primer grupo de ratones encontramos que desde tiempos tempranos se presentaban diferencias significativas en el número de cisticercos recuperados; en promedio, al día 3 de infección en los ratones BALB/cAnN se recuperaron de 1 a 6.3 cisticercos, y en BALB/cJ de 0.3 a 1.6; al día 5 de infección, en BALB/cAnN se recuperaron de 6.3 a 9.6 cisticercos, y en BALB/cJ de 0.3 a 1.3, y al día 30 de infección en BALB/cAnN se recuperaron de 116 a 203 cisticercos, mientras que en BALB/cJ de 0.3 a 1 cisticerco. BALB/cAnN era claramente más permisiva que BALB/cJ.

Con el segundo grupo de ratones esas diferencias se perdieron: al día 3 de infección se recuperaron de 2 a 3.3 cisticercos en BALB/cAnN y de 2 a 7 en BALB/cJ; al día 5 de infección, en BALB/cAnN se recuperaron de 1.5 a 4.6 cisticercos y de 1 a 7 en BALB/cJ; al día 30 de infección en BALB/cAnN se

recuperaron de 11 a 65 cisticercos, mientras que en BALB/cJ de 34 a 87. BALB/cJ se encontró igual o más permisiva que BALB/cAnN (Tabla 4).

Tabla 4. Carga parasitaria en sublíneas de ratones BALB/c después de la infección intraperitoneal con cisticercos de *Taenia crassiceps*

Días de infección	3			5			30		
# experimento	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Primer stock									
BALB/cAnN	1±1.4 <sup>a</sup>	4.3±1.7 <sup>a</sup>	6.3±1.5 <sup>a</sup>	6.3±1.5 <sup>a</sup>	7±2 <sup>a</sup>	9.6±2 <sup>a</sup>	129±39 <sup>a</sup>	116±52 <sup>a</sup>	203±80 <sup>a</sup>
BALB/cJ	0.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.4 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>b</sup>	1±1.3 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>b</sup>	1.3±1.1 <sup>b</sup>	1±1.7 <sup>b</sup>	0.5±0.7 <sup>b</sup>	0.3±0.5 <sup>b</sup>
Segundo stock									
BALB/cAnN	26±2.3 <sup>b</sup>	3±2.6 <sup>a</sup>	2.3±2.5 <sup>c</sup>	4.6±0.5 <sup>c</sup>	1.5±1.9 <sup>c</sup>	1.6±0.5 <sup>b</sup>	11.7±10. 7 <sup>c</sup>	65±66 <sup>a</sup>	51.8±98 <sup>c</sup>
BALB/cJ	3.6±2.5 <sup>b</sup>	7±2 <sup>c</sup>	2±1.7 <sup>c</sup>	7±2.6 <sup>c</sup>	1±1.5 <sup>c</sup>	2.3±1.5 <sup>b</sup>	43±40 <sup>c</sup>	87±64 <sup>a</sup>	34±30 <sup>c</sup>

El promedio ± la desviación estándar del número de cisticercos recuperados tras la infección de cinco ratones por grupo con 10 cisticercos por ratón. Las literales indican las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre hembras en los días 3 y 5 de infección, utilizando la prueba *t* de Student.

La expresión de Qa-2 en BALB/cJ y TgB1 ya no está relacionada con la restricción a la instalación y reproducción del parásito

Considerando los resultados presentados en la tabla 4, evaluamos si las diferencias se mantendrían entre otras cepas de ratones previamente evaluadas en su permisividad al crecimiento del parásito. Además se evaluó si la expresión del gene Q9, que codifica a la proteína Qa-2, aún estaba relacionada con la restrictividad a la infección. Por ello cuantificamos la carga parasitaria a treinta días de infección en ratones de la cepa Qa-2 negativa; BALB/cAnN y Qa-2 positivas; BALB/cJ y TgB1 y C57BL/6J. Para este estudio incluimos hembras y machos, con el fin de corroborar también las diferencias entre sexos.

Adicionalmente se correlacionó la carga parasitaria con la expresión de la proteína Qa-2. Los valores de la carga parasitaria del primer grupo de ratones se tomaron de una recopilación de datos durante 14 años (Fragoso et al., 2008); durante todo este tiempo se encontraban diferencias significativas entre las diferentes cepas, lo que muestra la relevancia del fondo genético en el control de esta parasitosis. Las cepas más restrictivas al crecimiento del parásito eran C57BL/6J, BALB/cJ y TgB1. Todas son Qa-2<sup>+</sup>.

Tabla 5.-Diferencia en la permisividad a la infección experimental causada por *Taenia crassiceps* entre diferentes cepas de ratones

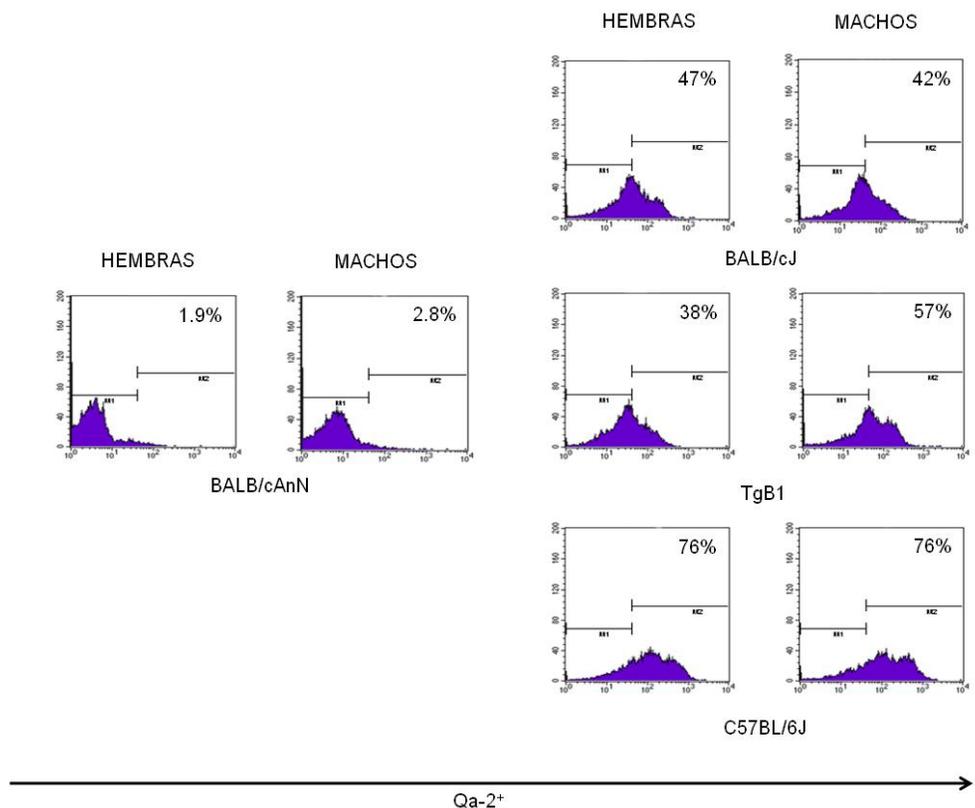
Cepa	Primer grupo				Segundo grupo			
	♀		♂		♀		♂	
	N	X±SD	n	X±SD	n	X±SD	n	X±SD
BALB/cAnN	15	115±8 <sup>a</sup>	13	29±3 <sup>b</sup>	7	120±154 <sup>ace</sup>	7	74±75 <sup>c</sup>
C57BL/6J	18	0 <sup>d</sup>	18	0 <sup>d</sup>	7	0 <sup>d</sup>	7	1±1 <sup>e</sup>
BALB/cJ	30	4±0.5 <sup>f</sup>	30	0.2±0.04 <sup>g</sup>	7	340±170 <sup>h</sup>	7	113±36 <sup>ac</sup>
TgB1	14	28±18 <sup>b</sup>	13	3±5 <sup>ef</sup>	7	339±272 <sup>h</sup>	7	43±51 <sup>abe</sup>

Promedio y desviación estándar del número de parásitos recuperados 30 días posteriores a la infección, después de infectar con 10 cisticercos intraperitonealmente ( $n$  = número de ratones estudiados). Los datos del primer grupo de ratones fueron tomados de Fragoso et al., 2008. Las literales indican diferencias significativas entre cepas y sexos del primer y segundo grupo de ratones utilizados ( $P < 0.05$ ).

Como se observa en la tabla 5, con el primer grupo de ratones la cepa BALB/cAnN fue la cepa más permisiva a la infección evaluada, y las diferencias de permisividad entre sexos se mantuvieron en todas las cepas evaluadas una vez que la infección se establecía, siendo las hembras más permisivas que los machos. Tras el cambio del bioterio y con el segundo grupo de ratones encontramos que tanto BALB/cJ como TgB1 son tan permisivas o más que BALB/cAnN, aunque la cepa C57BL76J se mantuvo como la cepa más restrictiva a la infección. Las diferencias de permisividad a la infección se mantuvieron entre los sexos, siendo las hembras en todas las cepas estudiadas más permisivas a la infección que los machos.

Con respecto a la expresión de Qa-2, como se observa en la figura 5, no se encontraron diferencias en el porcentaje de expresión de Qa-2 entre el primer y segundo grupos de ratones de todas las cepas estudiadas.

Figura 5. Expresión de Qa-2 en esplenocitos de ratones de diferentes cepas y sexos del segundo grupo de ratones utilizados



Porcentaje de la expresión de Qa-2 en esplenocitos obtenidos de ratones BALB/cAnN (Qa-2<sup>-</sup>) y TgB1, BALB/cJ y C57BL/6J (Qa-2<sup>+</sup>). Los histogramas son representativos de siete ratones evaluados por cepa y sexo.

C57BL/6J continúa siendo restrictiva a la cisticercosis experimental murina, lo que señala la relevancia de otros genes implicados en el control de esta infección

Considerando la pérdida de la restricción de BALB/cJ a la instalación y reproducción del cisticerco tanto a tiempos tempranos como a tiempos tardíos (3, 5 y 30 días de infección), decidimos evaluar si entre la cepa BALB/cAnN (permisiva) y la cepa más restrictiva a la infección, C57BL/6J, pudieran haberse presentado variaciones en tiempos tempranos y tardíos, con el fin de continuar el estudio de la respuesta temprana en cepas permisivas y restrictivas a la cisticercosis.

También se evaluó a tiempos tempranos el porcentaje de cisticercos dañados, el número de ratones totalmente restrictivos a la infección y la viabilidad de los cisticercos recuperados del hospedero después de dos semanas en cultivo, para determinar si tienen la capacidad de recuperarse y reproducirse.

Como se observa en la tabla 6, las diferencias de permisividad entre BALB/cAnN y C57BL/6J fueron evidentes desde los primeros días. Encontramos que la carga parasitaria recuperada durante los días 3 y 5 de infección fue mayor en ratones hembras de la cepa BALB/cAnN que en las hembras de la cepa C57BL/6J. En cuanto a los machos, sólo se encontraron diferencias significativas al día 5 de infección: se recuperaron más parásitos en BALB/cAnN.

Con respecto a las diferencias entre sexos, sólo en BALB/cAnN se encontraron diferencias significativas al día 3 de infección, con un mayor número de cisticercos recuperados en las hembras que en los machos.

Al recuperar los cisticercos de los diferentes hospederos se observaron claras diferencias en el estado del parásito: la mayoría de los cisticercos recuperados de la cepa BALB/cAnN eran vesiculares, mientras que la mayoría de los cisticercos recuperados de C57BL/6J tenían un aspecto coloidal, estaban dañados. En la tabla 7 también puede observarse que hay un mayor porcentaje de cisticercos calcificados en la cepa C57BL/6J de ambos sexos, aunque sólo al día 3 de infección encontramos diferencias significativas para C57BL/6J.

Tabla 6. Diferencias en la permisividad entre BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos

<u>Días de infección</u>		Hembras	Machos
3 días	BALB/cAnN	3±1a†	1.1±0.9b
		12%‡	23%
	C57BL/6J	0.8±1b	1.7±1.9a,b
		42%	37%
5 días	BALB/cAnN	2.5±1.5a	2.5±1.5a
		19%	29%
	C57BL/6J	0.7±0.9b	1±1.5b
		57%	62%

Promedio ± desviación estándar de los cisticercos recuperados durante los días 3 y 5 posinfección. Las literales señalan diferencias entre grupo utilizando la prueba de Mann-Whitney a  $P < 0.05$ . †el porcentaje de ratones sin parásitos viables (ratones resistentes) de un total de 7 a 15 ratones de dos diferentes experimentos. Las diferencias en el porcentaje de ratones restrictivos entre cepas y sexos fueron comparados usando la prueba exacta de Fisher.

Para evaluar si los cisticercos obtenidos de los diferentes hospederos mantenían su viabilidad y capacidad reproductiva, se cultivaron in vitro durante dos semanas. Se determinó la relación del número de cisticercos vesiculares con el número de cisticercos dañados o coloidales. Como se observa en la tabla 7, se encontró un incremento significativo del porcentaje de cisticercos vesiculares recuperados de hembras de la cepa BALB/cAnN durante el tercer y quinto día de infección, tanto recién recuperados como después de estar dos semanas en cultivo, mientras que en los machos la diferencia significativa en el porcentaje de cisticercos vesiculares recuperados sólo se observó durante el día 5 de infección, tanto con los cisticercos recién recuperados como a las 2 semanas de cultivo.

En cuanto al efecto del género en la viabilidad de los parásitos, se encontró al quinto día un mayor porcentaje de cisticercos recién recuperados de las hembras BALB/cAnN con respecto al porcentaje encontrado en los machos, y después de dos semanas en cultivo encontramos un mayor porcentaje en cisticercos recuperados de hembras de la cepa BALB/cAnN al tercer día con respecto a los machos de la misma cepa (Tabla 7).

TABLA 7.- Viabilidad de los cisticercos recuperados de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos

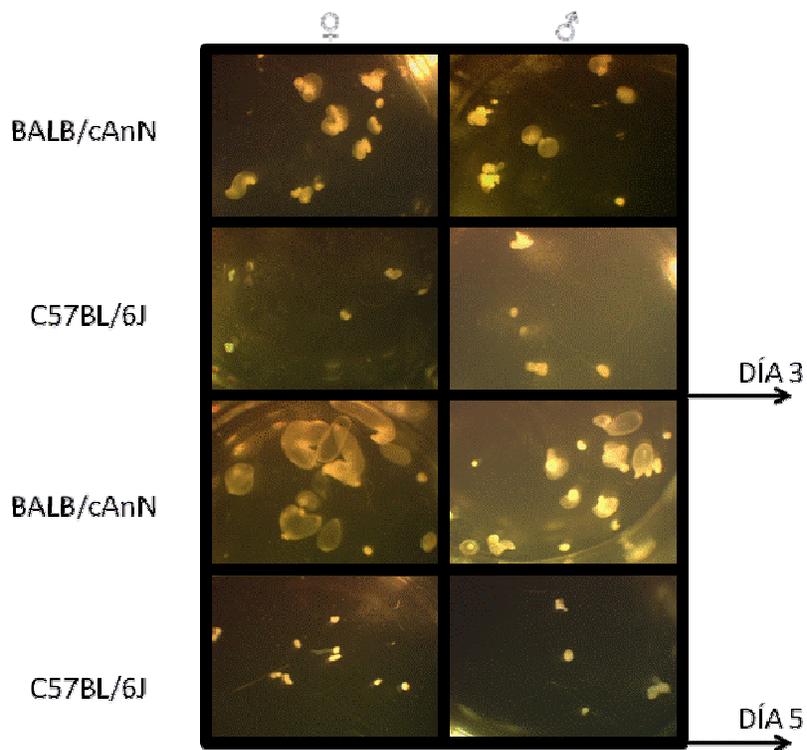
Cisticercos recuperados de:						
	Antes		P3	Después		P4
<b>3 días</b>						
	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>		<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>	
BALB/cAnN	25/21†	15/16		28/30	15/35	
	54%	48%	0.61	48%	30%	0.053
C57BL/6J	3/15	5/13		4/15	3/15	
	16%	27%	0.69	21%	17%	1
P1	<b>0.01</b>	<b>0.23</b>		<b>0.04</b>	0.36	
<b>5 días</b>						
BALB/cAnN	68/33	22/33		49/52	24/44	
	67%	40%	<b>0.001</b>	48%	35%	0.09
C57BL/6J	1/9	2/15		0/10	0/17	
	10%	11%	0.89	0%	0%	1
	<b>0.001</b>	<b>0.04</b>		<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	

†Número de cisticercos macroscópicamente no dañados (vesiculares) / número de cisticercos dañados (coloidales y calcificados). Las diferencias en el porcentaje de cisticercos no dañados versus cisticercos dañados fueron comparadas usando la prueba de Fisher o la prueba de chi cuadrada.  $P < 0.05$ . \*P1: Diferencias entre cepas al tercer día; #P2: Diferencias entre cepas al quinto día; \$P3: Diferencias entre genero antes del cultivo; +P4: Diferencias entre genero después del cultivo.

En la figura 6 se muestra las diferencias del aspecto macroscópico de los cisticercos recuperados de los ratones hembras y machos de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J después de dos semanas en cultivo. Los cisticercos recuperados de C57BL/6J salen del hospedero en su mayoría

casi muertos y no logran recuperarse, mientras que los cisticercos recuperados de BALB/cAnN son vesiculares, y en especial los recuperados de las hembras crecen mejor in vitro y tienen mayor capacidad de gemación (Figura 6).

Figura 6. Viabilidad de los cisticercos recuperados de ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J



Imágenes representativas de los cisticercos recuperados de ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos, recuperados 3 y 5 días después de la infección, tras estar dos semanas en cultivo.

Infiltrado inflamatorio en la cavidad peritoneal de ratones permisivos y restrictivos a la cisticercosis

Con el fin de evaluar diferencias en el infiltrado inflamatorio (basófilos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos) que llegaba a la cavidad peritoneal de los ratones infectados con distinto grado de permisividad a la infección, se realizó una primera caracterización por microscopía óptica.

Un incremento en el porcentaje de macrófagos peritoneales pudiera estar asociado con la restricción dada por BALB/cJ

Como se observa en tabla 8, en ratones del primer grupo no infectados se encontró un mayor porcentaje significativo de eosinófilos (10%) en ratones BALB/cAnN con respecto a BALB/cJ (6%), y de linfocitos en BALB/cJ (46%) con respecto a BALB/cAnN (38%). Al quinto día posterior a la infección con el primer grupo de ratones se encontró un incremento significativo de macrófagos peritoneales (22%) en BALB/cJ con respecto a BALB/cAnN (11%).

Estos datos podrían sugerir que las macrófagos desempeñan un papel importante en la restrictividad a la infección en la cepa BALB/cJ.

Con el segundo grupo de ratones utilizados sólo se encontraron diferencias significativas entre las dos sublíneas de BALB/c en el porcentaje de basófilos: BALB/cAnN presenta un incremento con respecto a BALB/cJ al día 3 (5.6% vs. 3.3%) y 5 (5.3% vs. 3%) tras la infección, respectivamente.

Se encontraron claras diferencias en la composición celular de los ratones controles utilizados del primer y segundo grupos

Comparando los ratones control del primer y segundo grupos, encontramos que en BALB/cAnN los ratones del primer grupo presentaron un incremento de basófilos con respecto a los del segundo (34% vs. 4.6%), mientras que los del segundo tienen un mayor porcentaje de linfocitos con respecto al primer grupo de ratones (47% vs. 38%). En BALB/cJ, los ratones del primer grupo presentan un mayor porcentaje de basófilos (25% vs. 4%) y de eosinófilos (6% vs. 5%) con respecto al segundo grupo, mientras que estos últimos presentan mayor porcentaje de neutrófilos (8% vs. 4%) y de macrófagos peritoneales (29% vs. 14%) (Tabla 8).

El cambio de grupos de ratones, así como del bioterio de convencional a libre de patógenos, se ve reflejado de manera importante en la composición inicial de las células peritoneales, y podrían repercutir en los

cambios observados en el infiltrado inflamatorio durante la respuesta temprana ante la infección.

Hubo diferencias en la composición del infiltrado inflamatorio entre cepas, mientras que entre sexos sólo se encontraron en la cepa C57BL/6J

En el análisis del infiltrado inflamatorio entre ratones hembras BALB/cAnN y C57BL/6, se encontró en los ratones control un incremento de macrófagos en hembras de la cepa BALB/cAnN con respecto a las hembras de C57BL/6J (36% vs. 24%). En cuanto a los machos, se encontró al día 3 un incremento de linfocitos en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J (25% vs. 12%) (Tabla 9).

En cuanto a las diferencias entre sexos, no se encontraron diferencias significativas entre ratones de la cepa BALB/cAnN, mientras que en la cepa C57BL/6J encontramos al día 3 de infección un incremento de linfocitos en las hembras con respecto a los machos (30% vs. 12%) y un incremento de neutrófilos en los machos con respecto a las hembras (28% vs. 16%); sin embargo, estas diferencias no se ven reflejadas en la infección, ya que ambos sexos son igualmente restrictivos a la cisticercosis (Tabla 9)

Tabla 8. Composición del infiltrado inflamatorio de ratones del primer y segundo grupo de las cepas BALB/cAnN y BALB/cJ infectados con *Taenia crassiceps*

Day of infection:	BALB/cAnN						C57BL/6J					
	Female			Male			Female			Male		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
Neutrophils	12±7 <sup>ab</sup>	20±4 <sup>a</sup>	10±2 <sup>b</sup>	14±7 <sup>ab</sup>	19±10 <sup>abc</sup>	8±5 <sup>ab</sup>	13±2.5 <sup>ab</sup>	16±5 <sup>ab</sup>	13±1 <sup>ab</sup>	14±8 <sup>ab</sup>	28±1 <sup>c</sup>	17±3 <sup>a</sup>
Basophils	6±2 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	7±2 <sup>a</sup>	5.7±3 <sup>a</sup>	5±3 <sup>a</sup>	5±1 <sup>a</sup>	8±4 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.7 <sup>a</sup>	4±0.07 <sup>a</sup>	3±1 <sup>a</sup>	4±2 <sup>a</sup>
Eosinophils	3±2 <sup>a</sup>	4±2 <sup>ab</sup>	6±1 <sup>ab</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.5 <sup>ab</sup>	4±3 <sup>a</sup>	5±0.5 <sup>a</sup>	3±1 <sup>b</sup>	2±0.7 <sup>b</sup>	5±0.07 <sup>a</sup>	2±0.5 <sup>b</sup>	3±1 <sup>ab</sup>
Lymphocytes	40±7 <sup>a</sup>	26±5 <sup>b</sup>	35±15 <sup>ab</sup>	38±17 <sup>a</sup>	25±13 <sup>b</sup>	33±16 <sup>ab</sup>	48±8 <sup>a</sup>	30±9 <sup>ab</sup>	43±10 <sup>ab</sup>	54±10 <sup>a</sup>	12±3 <sup>c</sup>	36±12 <sup>ab</sup>
Macrophages	36±5 <sup>a</sup>	43±7 <sup>ac</sup>	39±13 <sup>ac</sup>	36±12 <sup>abc</sup>	47±0.5 <sup>ac</sup>	48±10 <sup>ac</sup>	24±7 <sup>b</sup>	45±6 <sup>ac</sup>	38±11 <sup>abc</sup>	22±2 <sup>b</sup>	53±3 <sup>c</sup>	38±16 <sup>abc</sup>

† Promedio ± desviación estándar del porcentaje de las células peritoneales recuperadas durante los días 0, 3 y 5 de infección, infectando intraperitonealmente con 10 cisticercos por ratón. Las literales indican las diferencias significativas entre cepas utilizando el primer y segundo stock de ratones usando la prueba *t* no paramétrica.

Tabla 9. Composición del infiltrado inflamatorio de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos infectados con *Taenia crassiceps*

Días de infección:	BALB/cAnN						C57BL/6J					
	Hembras			Machos			Hembras			Machos		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
Neutrófilos	12±7 <sup>ab</sup>	20±4 <sup>a</sup>	10±2 <sup>b</sup>	14±7 <sup>ab</sup>	19±10 <sup>abc</sup>	8±5 <sup>ab</sup>	13±2.5 <sup>ab</sup>	16±5 <sup>ab</sup>	13±1 <sup>ab</sup>	14±8 <sup>ab</sup>	28±1 <sup>c</sup>	17±3 <sup>a</sup>
Basófilos	6±2 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	7±2 <sup>a</sup>	5.7±3 <sup>a</sup>	5±3 <sup>a</sup>	5±1 <sup>a</sup>	8±4 <sup>a</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.7 <sup>a</sup>	4±0.07 <sup>a</sup>	3±1 <sup>a</sup>	4±2 <sup>a</sup>
Eosinófilos	3±2 <sup>a</sup>	4±2 <sup>ab</sup>	6±1 <sup>ab</sup>	5±2 <sup>a</sup>	3±0.5 <sup>ab</sup>	4±3 <sup>a</sup>	5±0.5 <sup>a</sup>	3±1 <sup>b</sup>	2±0.7 <sup>b</sup>	5±0.07 <sup>a</sup>	2±0.5 <sup>b</sup>	3±1 <sup>ab</sup>
Linfocitos	40±7 <sup>a</sup>	26±5 <sup>b</sup>	35±15 <sup>ab</sup>	38±17 <sup>a</sup>	25±13 <sup>b</sup>	33±16 <sup>ab</sup>	48±8 <sup>a</sup>	30±9 <sup>ab</sup>	43±10 <sup>ab</sup>	54±10 <sup>a</sup>	12±3 <sup>c</sup>	36±12 <sup>ab</sup>
Macrófagos	36±5 <sup>a</sup>	43±7 <sup>ac</sup>	39±13 <sup>ac</sup>	36±12 <sup>abc</sup>	47±0.5 <sup>ac</sup>	48±10 <sup>ac</sup>	24±7 <sup>b</sup>	45±6 <sup>ac</sup>	38±11 <sup>abc</sup>	22±2 <sup>b</sup>	53±3 <sup>c</sup>	38±16 <sup>abc</sup>

Promedio ± desviación estándar del porcentaje de células peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos durante los días 0, 3 y 5 de infección. Las literales indican las diferencias significativas entre el promedio de cada tipo celular usando la prueba Mann-Whitney con  $P < 0.05$ . Los datos son representativos de tres experimentos independientes realizados con  $n = 3$  ratones por variable.

Un incremento de células NK y macrófagos peritoneales están presentes en la cepa BALB/cJ (restrictiva)

Como se observa en la tabla 10, se encontró en el primer grupo de ratones un incremento significativo de células NK al día cinco de infección en la cepa BALB/cJ (restrictiva) con respecto a BALB/cAnN (12% vs 3%) (Figura 7) y desde el día tres un incremento de células Mac-3+ peritoneales en BALB/cJ con respecto a BALB/cAnN de (10% vs 2%) y al día 5 de infección de (16% vs 3%) (Figura 8) (Tabla 10).

Tabla 10. Caracterización del infiltrado inflamatorio de ratones BALB/cAnN y BALB/cJ del primer y segundo grupos de ratones infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps*

	Pan-NK+ (%)		Mac-3+ (%)	
	1 <sup>er</sup>	2 <sup>o</sup>	1 <sup>er</sup>	2 <sup>o</sup>
Control				
BALB/cAnN	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	5.4 ± 2 <sup>a</sup>	30.6 ± 11.4 <sup>a</sup>
BALB/cJ	2.5 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 1.5 <sup>a</sup>
Día 3				
BALB/cAnN	4.7 ± 1.8 <sup>b</sup>	10.1 ± 2.8 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	10.1 ± 6.3 <sup>a</sup>
BALB/cJ	4 ± 1 <sup>b</sup>	5.5 ± 4.2 <sup>a</sup>	10.8 ± 1 <sup>b</sup>	24.5 ± 1.5 <sup>a</sup>
Día 5				
BALB/cAnN	3.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	13.9 ± 2.7 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.02 <sup>a</sup>	24.4 ± 5.2 <sup>a</sup>
BALB/cJ	12.4 ± 2 <sup>c</sup>	14.5 ± 4.3 <sup>a</sup>	16.4 ± 0.1 <sup>c</sup>	18.3 ± 3.4 <sup>a</sup>

Porcentaje de células Pan-NK+ y Mac-3+ peritoneales recuperadas de ratones infectados después de 3 y 5 días de infección, con  $n = 3$  a 5 ratones por grupo. Las literales indican las diferencias significativas entre columnas usando una prueba  $t$  no paramétrica ( $P < 0.05$ ). Estos datos son representativos de tres experimentos independientes.

FIGURA 7. Incremento de células NK peritoneales en ratones del primer grupo BALB/cJ (restrictivos) infectados con *Taenia crassiceps*

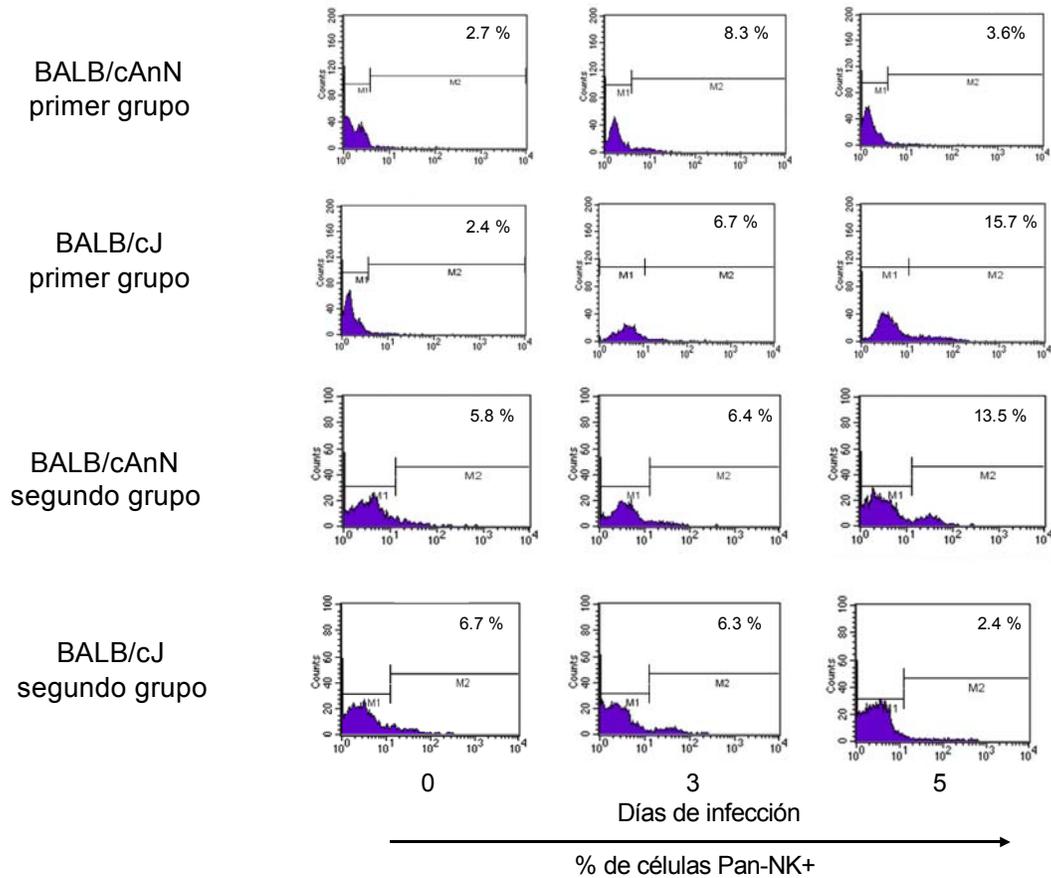


Figura 7. Histogramas representativos del porcentaje de células peritoneales Pan-NK+, de ratones hembras BALB/cAnN y BALB/cJ del primer y segundo grupos, de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos después de 3 y 5 días de infección. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes con  $n = 3$ .

Figura 8. Incremento de células Mac-3+ peritoneales en ratones del primer grupo BALB/cJ infectados con *Taenia crassiceps*

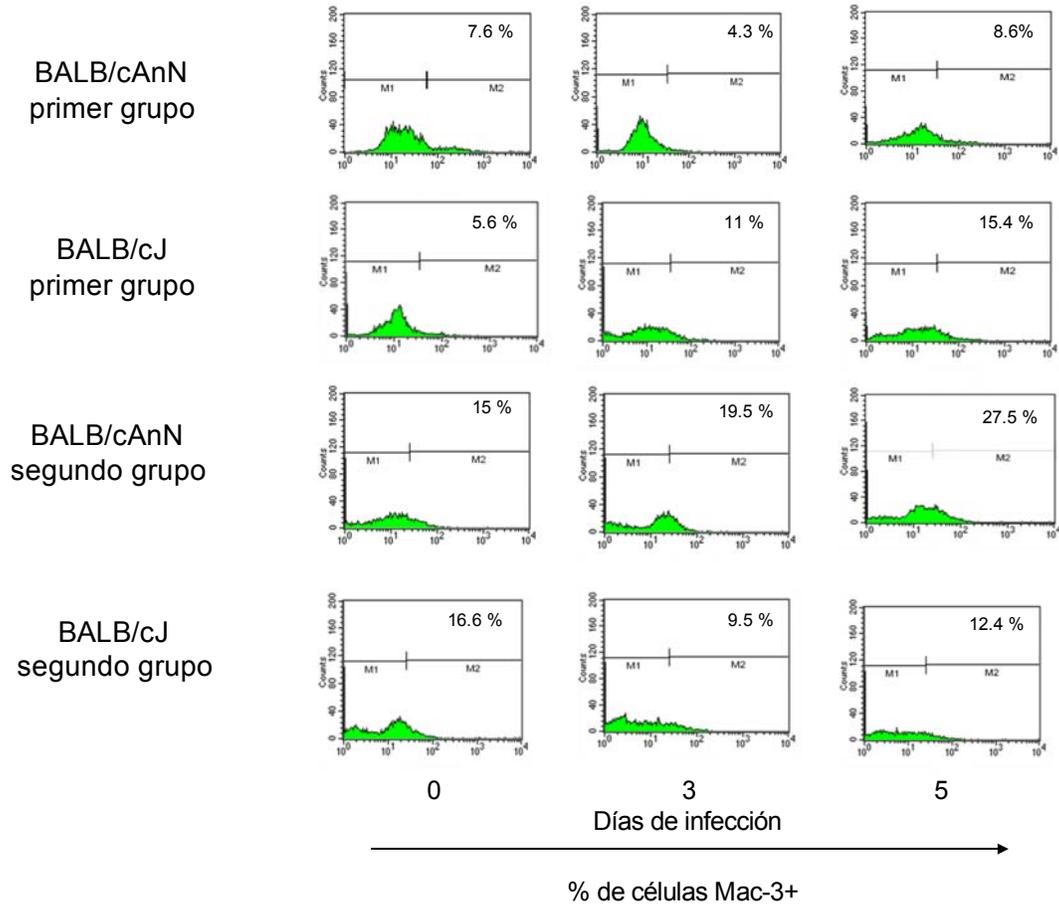


Figura 8. Histogramas representativos del porcentaje de células peritoneales Mac-3+ de ratones hembras BALB/cAnN y BALB/cJ del primer y segundo grupos, de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos después de 3 y 5 días de infección. Los histogramas son representativos de tres experimentos independientes con  $n = 3$ .

En el segundo grupo de ratones, no se encontraron diferencias significativas entre las dos sublíneas de BALB/c durante el tiempo estudiado; sin embargo, es notorio que desde el inicio ambas cepas tienen un mayor porcentaje de células NK, el cual se mantiene durante los tiempos de infección evaluados (Tabla 10).

Se encontró un mayor porcentaje de células en la cepa permisiva BALB/cAnN

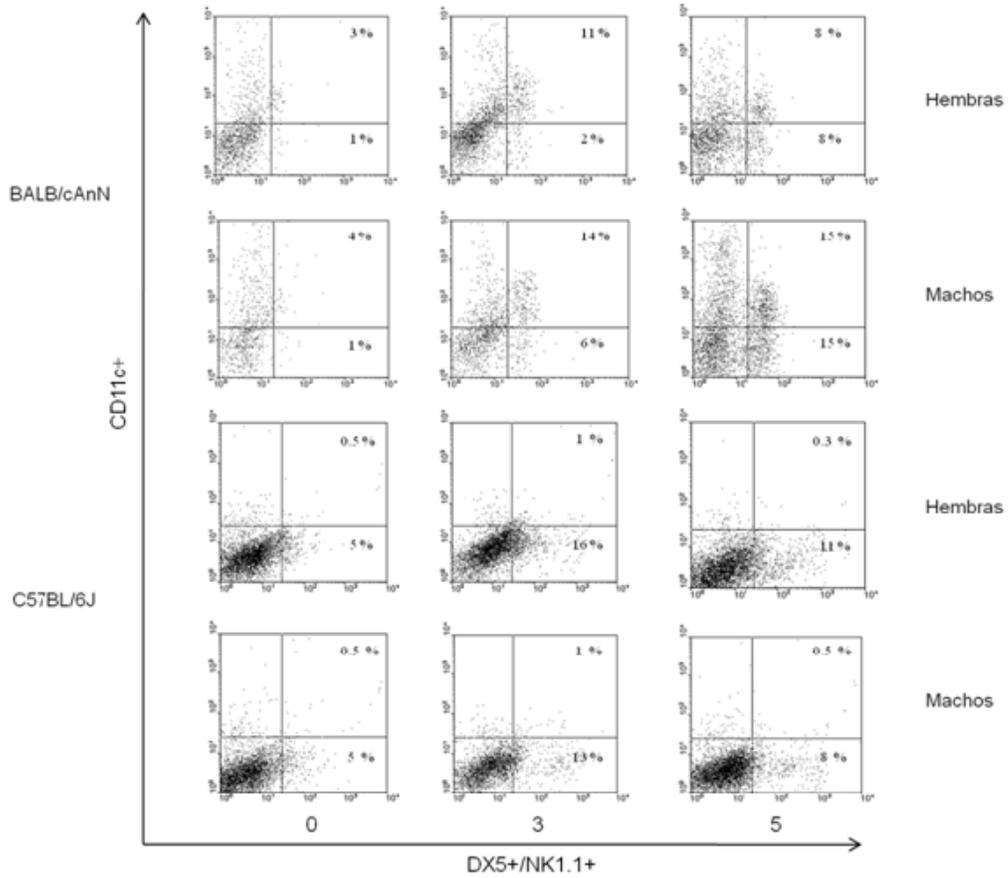
En cuanto a las diferencias encontradas entre hembras de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J, se halló en los ratones de la cepa BALB/cAnN controles un mayor porcentaje de células IKDCs (4% vs. 0.5%) (Figura 9), células dendríticas (4% vs. 1%) y macrófagos peritoneales (91% vs. 62%); al día 3 de infección hay un incremento significativo de células NKT, de 3% vs. 0.1% a favor de C57BL/6J (Tabla 11) y un incremento de IKDCs (16% vs. 0.3%) a favor de BALB/cAnN durante el quinto día de infección. El incremento de IKDCs en BALB/cAnN se mantiene (11% vs. 0.1%), y esto se ve reflejado en el porcentaje de células NK totales, siendo mayor en BALB/cAnN (21% vs. 8%) (Figura 10).

Mientras tanto, en este día se observó un decremento en BALB/cAnN en el porcentaje de linfocitos B con respecto a C57BL/6J (39% vs. 63%) (Tabla 11).

Con respecto a las diferencias de cepa entre machos, encontramos, al igual que en las hembras, que en los ratones controles hay un incremento de IKDCs a favor de BALB/cAnN (5% vs. 0.4%), células dendríticas (5% vs. 0.6%) y

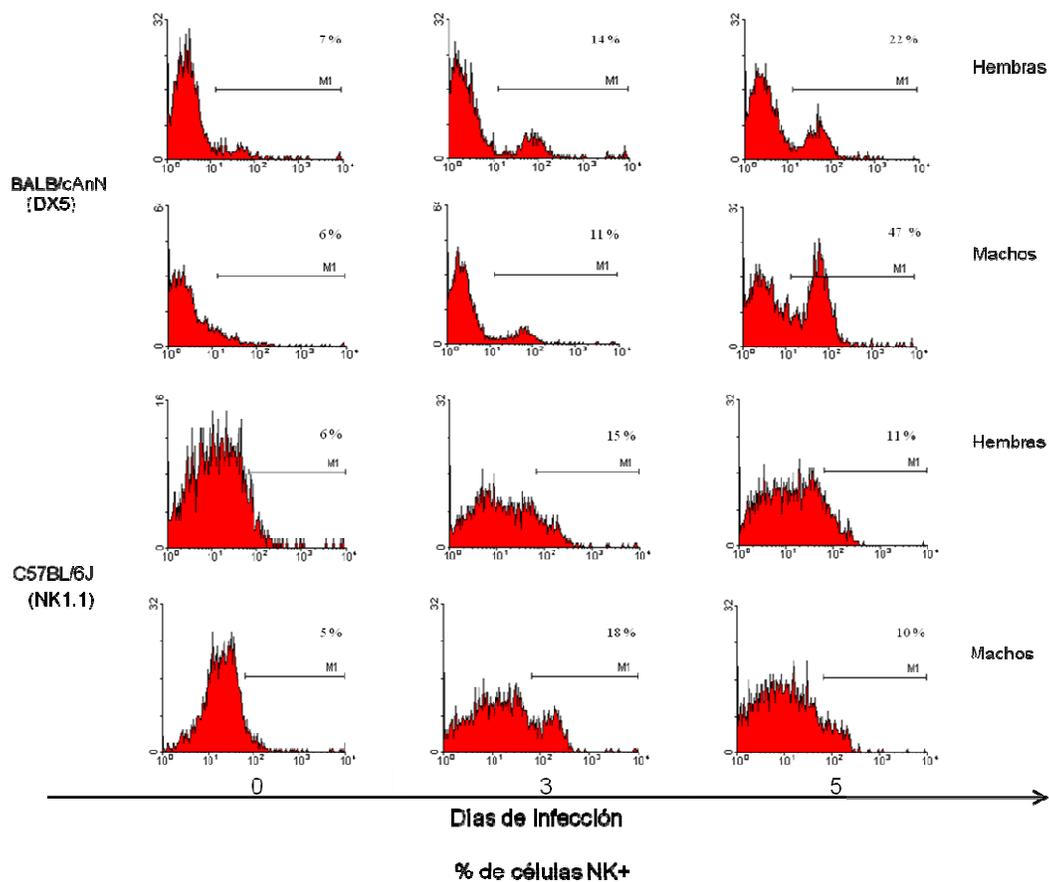
macrófagos peritoneales (90% vs. 76%); al día tres de infección se mantuvo la diferencia en el incremento del porcentaje de IKCDs en BALB/cAnN (16% vs. 0.6%), al igual que al quinto día (13% vs. 0.3%), además de un incremento del porcentaje de células NK totales en BALB/cAnN (46% vs. 9%); encontramos también un mayor porcentaje de células dendríticas en BALB/cAnN (4% vs. 2%).

Figura 9. Células IKDCs peritoneales en ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos infectados con *Taenia crassiceps*



Porcentaje de células doble positivas CD11c+/Nk1.1 (C57BL/6J) o DX5 (BALB/cAnN) presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos a los 3 y 5 días de infección. Las figuras son representativas de uno de tres experimentos independientes con  $n = 3$  a 5 ratones.

Figura 10. Células NK peritoneales en ratones BALB/cAnN y C57BL/6J infectados con *Taenia crassiceps*



Porcentaje de células doble positivas Nk1.1 (C57BL/6J) o DX5 (BALB/cAnN), presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos a los 3 y 5 días de infección. Las figuras son representativas de uno de tres experimentos independientes con  $n = 3$  a 5 ratones.

En cuanto a las diferencias entre sexos, en BALB/cAnN hay un incremento significativo del porcentaje de células NK totales a favor de los machos (46% vs. 21%) al día 5 de infección, mientras que en la cepa C57BL/6J encontramos al día 3 un incremento de células NKT, también a favor de los machos (7% vs. 3%) (Tabla 11).

Como puede observarse, las diferencias entre cepas están dadas desde el inicio por el incremento del porcentaje en BALB/cAnN de la población de células IKDCs; hay también mayor porcentaje de células dendríticas y macrófagos peritoneales. Durante la infección encontramos en BALB/cAnN mayor porcentaje de células IKDCs, y al día 5 una reducción de linfocitos B, así como un incremento en la población de células NK totales, mientras que en C57BL/6J hay diferencias en la población de células NKT en las hembras en el día 3. Por ello, la participación de las células NKs, en especial IKDCs, así como de las células dendríticas en BALB/cAnN no parece presentar una acción eficiente contra la instalación del cisticerco. La función de las células NKTs en la restricción a la instalación por C57BL/6J podría estar dada por la producción de citocinas.

Efectos de citotoxicidad celular a células del parásito, sin embargo no se descarta la acción de otras células en tiempos anteriores al tercer día, nuestro primer tiempo de infección evaluado.

Tabla 11. Porcentaje de células peritoneales NK, NKT, IKDCs, LB, células dendríticas y macrófagos en ratones de las cepas BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos infectados con *Taenia crassiceps*

	NK		NKT		IKDCs		LB		DCs		Macrófagos	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
Control BALB/cAnN	7±2 <sup>a</sup>	5.3±3 <sup>a</sup>	2±1 <sup>a</sup>	1±1 <sup>a</sup>	4±0.9 <sup>a</sup>	5±0.01 <sup>a</sup>	50±1 0 <sup>a</sup>	45±10 <sup>a</sup>	4.8±3.5 <sup>a</sup>	5±4.7 <sup>ab</sup>	91±1 <sup>a</sup>	90±2 <sup>a</sup>
C57BL/6J	6±2.7 <sup>a</sup>	3.7±1. 5 <sup>a</sup>	1±0.6 <sup>a</sup>	1±0.8 <sup>a</sup>	0.5±0. 4 <sup>b</sup>	0.4±0.2 <sup>b</sup>	50±2 0 <sup>a</sup>	57±10 <sup>a</sup>	1±0.4 <sup>bc</sup>	0.6±0.4 c	62±8 <sup>b</sup>	76±1 2 <sup>b</sup>
Día 3 de infección												
BALB/cAnN	15±2 <sup>b</sup>	12±6 <sup>b</sup>	0.1±0. 5 <sup>b</sup>	0.7±0. 6 <sup>ab</sup>	16±6 <sup>c</sup>	16±2 <sup>c</sup>	53±1 0 <sup>a</sup>	45±5 <sup>a</sup>	4.3±3.9 ab	3.8±3.7 abc	75±2 1 <sup>b</sup>	77±2 <sup>b</sup>
C57BL/6J	17±1.4 b	14.7±7 b	3.2±1. 5 <sup>c</sup>	7.4±2. 8 <sup>d</sup>	0.3±0. 1 <sup>b</sup>	0.6±0.0 8 <sup>b</sup>	43±6 <sup>a</sup>	50±8 <sup>a</sup>	0.9±0.1 bc	0.7±0.1 c	48±1 0 <sup>b</sup>	49±1 0 <sup>b</sup>
Días 5 de infección												
BALB/cAnN	21±5 <sup>b</sup>	46±7 <sup>c</sup>	0.3±0. 1 <sup>b</sup>	0.1±0. 1 <sup>ab</sup>	11±2 <sup>c</sup>	13±2 <sup>c</sup>	39±2 <sup>b</sup>	30±3 <sup>b</sup>	4.5±4 <sup>ab</sup>	4.4±1 <sup>a</sup>	64±4 <sup>b</sup>	79±9 <sup>b</sup>
C57BL/6J	8.3±5. 7 <sup>a</sup>	9±0.01 a	1±0.2 <sup>a</sup>	3±2.3 ac	0.1±0. 1 <sup>b</sup>	0.3±0.1 <sup>b</sup>	63±1 3 <sup>a</sup>	42±1 <sup>a</sup>	2.9±4.4 abc	2.7±0.2 b	61±1 <sup>b</sup>	62±1 <sup>b</sup>

Promedio ± desviación estándar del porcentaje de las diferentes poblaciones celulares obtenidas de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J controles e infectados con 10 cisticercos intraperitonealmente. Las literales muestran las diferencias significativas entre el promedio de cada fenotipo usando la prueba Mann-Whitney,  $P < 0.05$ . Los datos son representativos de tres experimentos independientes con  $n = 3$  a 6 ratones.

## Moléculas efectoras

El primer grupo de ratones de la cepa BALB/cJ tienen un mayor nivel de IFN $\gamma$  en el lavado peritoneal que BALB/cAnN

En el estudio entre sublíneas de BALB/cAnN evaluamos sólo la expresión de IFN $\gamma$  en lavados peritoneales de los ratones infectados del primer y segundo grupos.

En el primer grupo de ratones, encontramos un incremento en los niveles de IFN $\gamma$ , de 202 pg/ml en los ratones control de la cepa BALB/cJ con respecto a 54 pg/ml en los BALB/cAnN; durante la infección no se encontraron diferencias significativas en los niveles de IFN entre ambas cepas.

En el segundo grupo de ratones no se encontraron diferencias significativas entre ratones no infectados e infectados (Tabla 12).

Hay diferencias en la concentración de citocinas entre BALB/cAnN y C57BL/6J; estas diferencias varían con respecto al sexo

En el análisis de la respuesta temprana entre las cepas de BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos medimos IL-12 e IFN $\gamma$ , por ser dos de las principales citocinas proinflamatorias.

Entre cepas encontramos un incremento significativo de IFN $\gamma$  al día 5 en BALB/cAnN (215 pg/ml) con respecto a C57BL/6J (8 pg/ml), y entre machos se

observó al día 5 un incremento en C57BL/6J de IL-12 (615 pg/ml) con respecto a BALB/cAnN (216 pg/ml) (Tabla 13).

Entre sexos en la cepa BALB/cAnN encontramos un incremento significativo de IL-12 en las hembras (604 pg/ml) con respecto a los machos (381 pg/ml) al día 3 de infección, y al quinto día de infección hay un incremento de IFN $\gamma$  en las hembras (215 pg/ml) con respecto a los machos (35 pg/ml), y un incremento de IL-12 en los machos (216 pg/ml) con respecto a las hembras (108 pg/ml).

En la cepa C57BL/6J encontramos al día 3 un incremento en las hembras con respecto a los machos de IL-12 (612 pg/ml vs. 393 pg/ml), y al día 5 de infección un incremento de IFN $\gamma$  en los machos (615 pg/ml) en comparación con las hembras (197 pg/ml), así como de IL-12 de los machos (45 pg/ml) en comparación con las hembras (8 pg/ml).

Tabla 12. Niveles de IFN $\gamma$  en ratones BALB/cAnN y BALB/cJ infectados con *Taenia crassiceps*

IFN $\gamma$ (pg/ml) <sup>†</sup>		
Ratones control	Primer grupo	Segundo grupo
BALB/cAnN	54 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	375 $\pm$ 32 <sup>a</sup>
BALB/cJ	202 $\pm$ 44 <sup>b</sup>	362 $\pm$ 61 <sup>a</sup>
Día 3 de infección		
BALB/cAnN	174 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	447 $\pm$ 82 <sup>a</sup>
BALB/cJ	389 $\pm$ 262 <sup>b</sup>	316 $\pm$ 51 <sup>a</sup>
Día 5 de infección		
BALB/cAnN	200 $\pm$ 54 <sup>b</sup>	761 $\pm$ 191 <sup>a</sup>
BALB/cJ	267 $\pm$ 37 <sup>b</sup>	493 $\pm$ 224 <sup>a</sup>

Promedio + DS de los niveles de IFN-gamma (pg/ml) antes y después de tres y cinco días de infección en grupos de tres ratones. Las literales indican las diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre columnas usando la prueba  $t$  no paramétrica. Estos datos son representativos de tres experimentos independientes.

Tabla 13. Niveles de IFN $\gamma$  e IL-12 en ratones BALB/cAnN y C57BL/6J infectados con *Taenia crassiceps*

	BALB/cAnN						C57BL/6J					
	Hembras			Machos			Hembras			Machos		
	0	3	5	0	3	5	0	3	5	0	3	5
IL-12 (pg/ml)	98 $\pm$ 78 <sup>a</sup>	604 $\pm$ 88 <sup>b</sup>	108 $\pm$ 90 <sup>a</sup>	133 $\pm$ 50 <sup>a</sup>	381 $\pm$ 54 <sup>c</sup>	216 $\pm$ 45 <sup>d</sup>	92 $\pm$ 40 <sup>a</sup>	612 $\pm$ 114 <sup>b</sup>	197 $\pm$ 139 <sup>acd</sup>	94 $\pm$ 33 <sup>a</sup>	393 $\pm$ 43 <sup>c</sup>	615 $\pm$ 126 <sup>b</sup>
IFN $\gamma$ (pg/ml)	3 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	96 $\pm$ 56 <sup>b</sup>	215 $\pm$ 29 <sup>c</sup>	5 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	39 $\pm$ 39 <sup>ab</sup>	35 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	9 $\pm$ 12 <sup>a</sup>	40 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	8 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	10 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	145 $\pm$ 71 <sup>b</sup>	45 $\pm$ 5 <sup>b</sup>

†Promedio + DS de los niveles de IFN $\gamma$  e IL-12 de lavados peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos después de tres y cinco días de infección. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos independientes usando ELISA. Las literales indican las diferencias significativas entre columnas,  $P < 0.05$ .

Resumen de la respuesta temprana evaluada entre BALB/cAnN y C57BL/6J

Al día cero se observa un incremento del porcentaje de macrófagos peritoneales, células dendríticas e IKCDs en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J. No se encontraron diferencias significativas entre sexos en ninguna de las dos cepas en los ratones controles.

Al día tres se observa un incremento de células IKCDs en BALB/cAnN en ambos sexos con respecto a C57BL/6J. Además, en las hembras de BALB/cAnN hay un número consistentemente mayor de cisticercos vesiculares recuperados tras el sacrificio, así como un mayor número de cisticercos después de dos semanas en cultivo con respecto a C57BL/6J. Con respecto a la cepa C57BL/6J se observa un incremento de células NKTs, así como un mayor número de cisticercos dañados con respecto a BALB/cAnN. Entre los machos encontramos un incremento en el porcentaje de linfocitos totales en BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J.

En las diferencias entre sexos, en BALB/cAnN encontramos un incremento de IL-12, así como un mayor número de cisticercos recuperados al sacrificio y tras dos semanas después en cultivo, en las hembras con respecto a los machos. En C57BL/6J, se observa en las hembras un incremento de linfocitos totales e IL-12, y en los machos un incremento de neutrófilos.

Al día 5 de infección se encontró en las hembras BALB/cAnN un mayor número de cisticercos recuperados al tiempo de sacrificio y después de dos semanas en cultivo con respecto a las hembras de C57BL/6J.

Hay además en BALB/cAnN un incremento en el porcentaje de células IKCDs, células NK totales e IFN $\gamma$ , así como una disminución en el porcentaje de linfocitos B con respecto a C57BL/6J.

Entre machos encontramos un incremento en el porcentaje de linfocitos totales y de IKCDs en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J.

En las diferencias entre sexos de BALB/cAnN, se encontró en las hembras un mayor número de cisticercos recuperados y mayores niveles de IFN $\gamma$  que los machos, mientras que en los machos hay mayor porcentaje de células NK totales y mayores títulos de IL-12. En C57BL/6J se observa un incremento en machos de células NKTs, IL-12 e IFN $\gamma$  con respecto a las hembras.

La respuesta de BALB/cAnN podría beneficiar al parásito en vez de perjudicarlo. Considerando los resultados anteriormente presentados, en donde se observa que la cepa permisiva BALB/cAnN tiene un perfil inflamatorio incrementado con respecto a la cepa C57BL/6J (restrictiva), esto podría implicar que dicha respuesta facilita la instalación del cisticerco. A menudo los parásitos utilizan algunas de las moléculas de la respuesta inflamatoria, mismas que pueden favorecer su crecimiento y diferenciación; tal es el caso de *C. elegans* y *Schistosoma mansoni* con el factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ ) (Patterson et al., 2000; Braeckman et al., 2001; Davies et al., 1998; Knobloch et al., 2004).

En virtud de lo anterior, se evaluaron las concentraciones de TGF $\beta$  en los lavados de la cavidad peritoneal de los ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos durante los días 3 y 5 de infección, y no se encontraron diferencias significativas entre cepas ni entre sexos (Tabla 14); esto llama la atención, ya que las principales células que producen esta molécula son linfocitos y macrófagos, y ambas poblaciones celulares están incrementadas en la cepa BALB/cAnN con respecto a C57BL/6J. Ello podría sugerir que si en BALB/cAnN se secreta más TGF $\beta$ , el parásito puede estar utilizando ese factor, por lo que no se encontrarían diferencias con C57BL/6J.

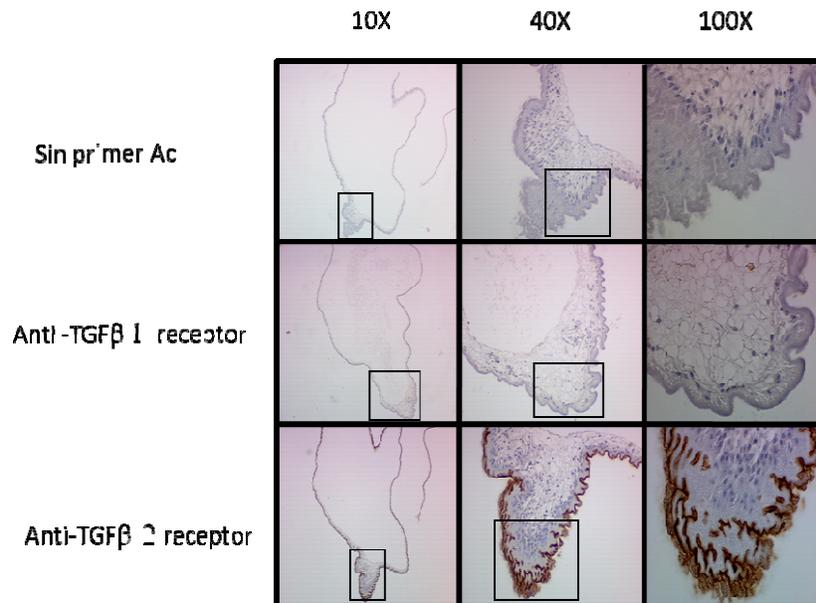
En estudios adicionales realizados en el laboratorio se evaluó la expresión del receptor TGF $\beta$ -1 y TGF $\beta$ -2 en el cisticerco. Se encontró expresión del receptor TGF $\beta$ -2 en el tegumento de los cisticercos, y ésta es mayor en la zona de gemación (Figura 11).

Tabla 14. Niveles de TGF $\beta$  en lavados peritoneales de ratones BALB/cAnN y C57BL/6J de ambos sexos

	BALB/cAnN			C57BL/6J		
	0	3	5	0	3	5
Hembras	193 $\pm$ 156 <sup>a</sup>	153 $\pm$ 126 <sub>a</sub>	118 $\pm$ 66 <sub>a</sub>	153 $\pm$ 67	164 $\pm$ 105 <sub>c</sub>	213 $\pm$ 165 <sub>c</sub>
Machos	150 $\pm$ 106 <sup>a</sup>	236 $\pm$ 105 <sub>b</sub>	119 $\pm$ 84 <sub>a</sub>	185 $\pm$ 167	165 $\pm$ 91 <sup>d</sup>	143 $\pm$ 71 <sup>d</sup>

Promedio  $\pm$  desviación estándar de los niveles de TGF $\beta$  en lavados peritoneales con SSI de ratones infectados con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* a los 3 y 5 días de infección.  $n = 3$  a 5 ratones.

Figura 11. Localización de los receptores TGF $\beta$  I y II en el tegumento del cisticerco de *Taenia crassiceps*



Inmunolocalización de los receptores para TGF $\beta$  I y II en el tegumento de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

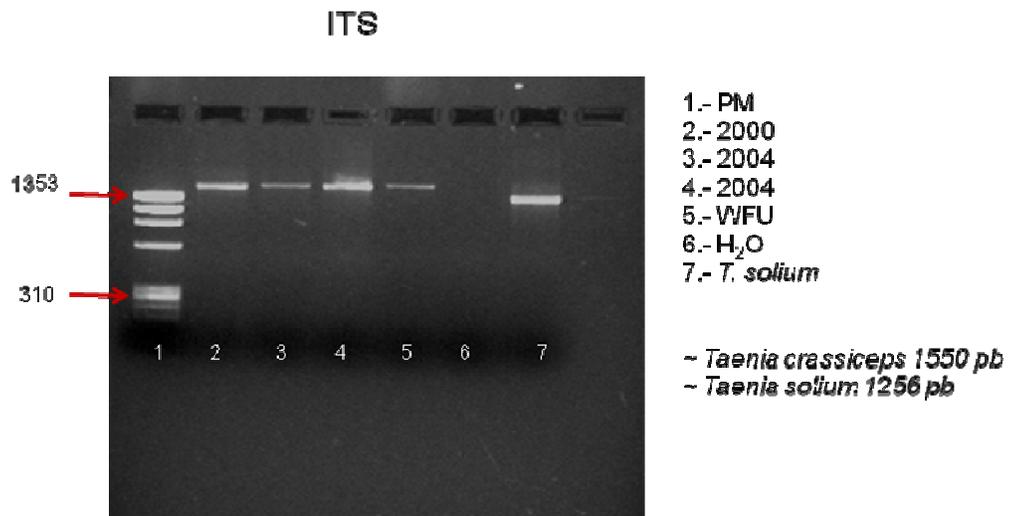
No encontramos modificaciones en el parásito tras la renovación de la cepa del hospedero a través del análisis del espaciador transcrito interno (ITS)

Adicionalmente se evaluaron posibles modificaciones genéticas en el parásito que podrían estar relacionadas con los cambios de permisividad/restrictividad a la infección observada entre las sublíneas de BALB/cAnN y BALB/cJ. Para ello se estudiaron cambios en la secuencia del ITS, la cual se ha utilizado ampliamente para evaluar cambios inter e intraespecíficos en diferentes parásitos, incluyendo tenias.

Se analizó la secuencia del ITS1 e ITS2, amplificado de DNA de cisticercos utilizados durante la infección del primer grupo de ratones, que corresponden a cisticercos colectados en el año 2000 y guardados en etanol 70% a  $-70^{\circ}\text{C}$ , y de los cisticercos utilizados durante la infección del segundo grupo de ratones. Además se evaluó la variabilidad del ITS en tres cisticercos de *T. crassiceps*, obtenidos de un mismo ratón, así como cuatro de ratones diferentes.

Como se observa en la figura 12, se encontró que el ITS de *Taenia crassiceps* tiene un tamaño aproximado de 1550 pares de bases, mientras que en *Taenia solium* tiene un tamaño de 1256, como se había reportado previamente (Mayta et al., 2000).

Figura 12. Expresión del ITS en cisticercos de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*.



En el análisis de las secuencias de los amplificadas se encontró que entre los cisticercos utilizados para infectar el primer y segundo stocks de ratones no hay diferencias en la secuencia del ITS1 (Tabla 15). Sin embargo, en los cisticercos obtenidos de diferentes ratones, una guanina es remplazada por una timina en la posición 427, mientras que en los cisticercos utilizados para infectar el primer y segundo grupos de ratones hay una guanina en vez de una timina en las posiciones 449 y 457 (Tabla 15).

En cuanto al ITS2, encontramos en la posición 302 el remplazo de una citosina por una guanina, y encontramos once diferencias comparando la secuencia de nuestros cisticercos con la secuencia de ITS2 reportada obtenida del estado adulto de *Taenia crassiceps* (GenBank Accession No. QD099564) (Tabla 16).

Tabla 15. Polimorfismo de ITS1 en cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	Posición del carácter variable para ITS1		
	427	449	457
2000	T	N	T
2004	T	T	T
1	G	G	G
2	T	G	G
3	T	G	G
4	G	G	G
5	G	G	G
6	T	G	G
7	T	G	G

Análisis de las secuencias de los amplificadores de la región ITS1. Se encontraron diferencias en la posición de tres bases. Se utilizaron cisticercos que infectaron a los ratones del primer grupo y recuperados en el año 2000, cisticercos que infectaron al segundo grupo y recuperados en el año 2004. Los cisticercos del 1 al 3 fueron recuperados de un mismo ratón, y del 4 al 7 fueron recuperados de cuatro ratones distintos.

Tabla 16. Polimorfismo de ITS2 en cisticercos de *Taenia crassiceps*

	Posición de la base variable para ITS2												
	302	322	278	279	280	281	283	285	286	287	660	661	662
2000	C	C	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
2004	C	G	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
1	G	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
2	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
3	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
4	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
5	C	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
6	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
7	N	N	G	C	C	C	T	C	T	G	T	G	T
ITS2	C	G	C	T	T	G	A	G	A	T	G	A	G
QD09956													
4													

Análisis de las secuencias de los amplificadores de la región ITS2. Se observa el remplazo de una guanina por una citosina en la posición 302 en la secuencia del ITS2 de cisticercos recuperados en los años 2000 y 2004. Secuencia del ITS2 de cisticercos recuperados de un mismo ratón de 1 al 3, y cada uno de diferente ratón del 4 al 7.

## 10. DISCUSIÓN

En la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* se ha encontrado relevante la participación genética (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al., 1998), sexual (Larralde et al., 1995; Morales-Montor et al., 1996; 2003) e inmunológica (López-Briones et al., 2003<sup>a</sup>; 2003<sup>b</sup>) del hospedero en mediar las diferencias de permisividad a la instalación y reproducción del cisticerco.

En las diferentes cepas evaluadas hasta el momento se ha encontrado que los ratones de la cepa BALB/c son más permisivos a la cisticercosis experimental que las cepas de la línea C57BL, y dentro de la línea BALB/c se han identificado diferencias entre dos sublíneas, siendo BALB/cAnN permisiva y BALB/cJ restrictiva. Esta diferencia en la permisividad entre BALB/cAnN y BALB/cJ se encontró asociada con la expresión de la proteína Qa-2 en BALB/cJ (Fragoso et al., 1998), así como con un incremento en la respuesta proliferativa de esplenocitos, altos niveles de IL-2 inducidos por antígeno de cisticerco de BALB/cJ y un decremento en la población de esplenocitos CD4+ y CD8+ TCR V $\beta$ 2 en ratones BALB/cAnN (López-Briones et al., 2003). Estos estudios se realizaron en condiciones en las que el parásito se encontraba establecido en el hospedero. Es concebible entonces que los eventos tempranos son determinantes en el destino de la parasitosis. Considerando este supuesto, el presente trabajo se diseñó con el propósito de explorar la respuesta inmune temprana, hacia la identificación de los eventos inmunológicos involucrados en mediar las diferencias de permisividad entre ambas sublíneas.

En el estudio de la respuesta temprana entre ratones de una misma cepa con diferente grado de permisividad: BALB/cAnN (permisiva) y BALB/cJ (restrictiva). Los resultados obtenidos muestran que en tiempos tempranos de la infección BALB/cJ presenta un mayor porcentaje de macrófagos peritoneales y células NK que BALB/cAnN. El incremento de estas poblaciones celulares podría ser favorecido por el aumento de IFN $\gamma$  que presentan estos ratones desde antes de la infección; se sabe que esta citocina puede acelerar el proceso de activación y acción de las células NK y los macrófagos hacia una respuesta proinflamatoria, misma que podría participar en la eliminación del parásito.

La participación directa de estos tipos celulares sobre el parásito resulta factible, considerando que éste entra fragmentado al hospedero, y está más expuesto a posibles acciones de células y moléculas del hospedero que podrían mediar un daño de mayor extensión en los mismos. De hecho, se ha observado que las diferencias en la permisividad a la infección entre sublíneas de BALB/c sólo se presentan cuando la infección se realiza con agujas de menor calibre (27G), que reducen el tamaño de los fragmentos parasitarios inyectados en la cavidad peritoneal. En contraste, cuando la infección se realiza con agujas de mayor calibre (20G), el parásito ingresa al hospedero prácticamente intacto y las diferencias de permisividad a la infección desaparecen. Estas observaciones explican en parte que algunos grupos de investigación reporten a la cepa BALB/cJ como permisiva, considerando que la infección en estos estudios se ha realizado con el parásito íntegro (Mooney et al., 2000).

Los cambios en las instalaciones del bioterio del Instituto en el año 2002, de convencional a libre de patógenos, aunados a los cambios en los parentales de las sublíneas BALB/cAnN y BALB/cJ, se asociaron con la desaparición de las diferencias en la permisividad de las sublíneas de BALB/c, así como el perfil celular diferencial encontrado. Es factible que las nuevas cepas adquiridas presenten diferencias con las originalmente disponibles en el bioterio, que se habían mantenido durante más de diez años. Se ha reportado extensamente la posibilidad de que durante el cruzamiento de cepas endogámicas ocurran modificaciones genéticas, y de que se acumulen aumentando el número de cruces. Por ejemplo, la separación de la cepa BALB/c ocurrida desde 1947 ha generado diferentes sublíneas con diferencias tanto fenotípicas como genotípicas, como BALB/cAnN y BALB/cJ (Ciaranello et al., 1974; Potter and Wax, 1981; Pollarf et al., 1982; Mellor et al., 1985; Shi et al., 1989; Fragoso et al., 1998; Larralde et al., 1995; Aldridge et al., 2007; Kumar et al., 2009).

Adicionalmente, es factible que en el cambio de permisividad en la capacidad de desarrollo de la cisticercosis en las sublíneas de BALB/c pudieran participar las modificaciones en la exposición a otros patógenos

presentes en un bioterio convencional en comparación con un bioterio libre de patógenos. En este sentido, se ha reportado que infecciones concomitantes pueden modificar la capacidad de crecimiento en la cisticercosis experimental (Rodríguez et al., 1999), y se han reportado claras diferencias en ratones mantenidos en condiciones libres de patógenos y ratones mantenidos en casa en cuanto a las características morfológicas en placas de Peyer, así como un aumento en la proporción de las células M; ambas características se ven favorecidas en ratones mantenidos en casa y claramente pueden influir en su respuesta a antígenos (Smith et al., 1987).

Con el cambio en las cepas de ratones y tras las diferencias encontradas en BALB/cAnN y BALB/cJ, nos preguntamos si otras cepas, como C57/BL6J (adquirida en laboratorios Harlan) y TgB1 (ratones que fueron incorporados por cesárea al bioterio libre de patógenos), aún mantenían su característica restrictiva a la instalación y reproducción del parásito (Fragoso et al., 1996; 1998). Los resultados señalan que, al igual de BALB/cJ, los ratones TgB1 son ahora tan permisivos como BALB/cAnN. En este caso podríamos pensar que la diferencia en el mantenimiento de los animales fue suficiente para los cambios

encontrados hacia la cisticercosis experimental murina; sin embargo, los ratones TgB1 no se han monitoreado desde el año 2002 para seleccionar a los parentales de cada cruce, por lo que aunque expresan la proteína Qa-2 no tenemos la certeza de que conservan el transgén, tomando en cuenta que el fondo del transgénico es C57BL/6J (Fragoso et al., 1998). La cepa C57BL/6J conservó su capacidad restrictiva a la instalación y reproducción del parásito, lo que pone de manifiesto la condición multifactorial para la restricción de esta parasitosis. La literatura reporta la expresión de la proteína Qa-2 en los esplenocitos (Fragoso et al., 1996; 1998) en las cuatro cepas evaluadas.

Estos resultados señalan que, en el caso de BALB/cJ y TgB1, se ha perdido la expresión de la proteína Qa-2, así como su posible relevancia en mediar los procesos de restricción en la cisticercosis causada por *T. crassiceps* en estas condiciones ha perdido.

En el intento de identificar si estos cambios podrían haber determinado modificaciones en el genoma del parásito que se reflejaran en su capacidad de crecimiento, se estudió la variabilidad genética del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Los cisticercos utilizados en este trabajo son de la cepa ORF. Estos cisticercos fueron aislados por primera vez de una cepa de infección natural por Freeman en 1962, y desde esa fecha se han mantenido por pases intraperitoneales en ratones BALB/c. La cepa fue donada a nuestro grupo de investigación en 1986, y también se ha mantenido también por pases intraperitoneales de ratón a ratón cada dos meses. Esta forma de mantenimiento se logra gracias a la capacidad de los cisticercos de esta cepa de reproducirse de manera asexual por gemación (Smith et al., 1972). Considerando su reproducción por gemación, es factible que ocurrieran mutaciones en los parásitos capaces de actuar en el cambio de la permisividad de las sublíneas. Para evaluar posibles variaciones entre los parásitos, se realizó un estudio de variabilidad genética, utilizando del DNA ribosomal la región del “espaciador transcrito interno” (ITS), que se ha utilizado para la identificación inter e intraespecífica de distintas especies de tenia, así como para diagnóstico (Luton et al., 1992; Wachira et al., 1993; Bowles and McManus, 1994; Mayta et al., 2000; Cuervo et al., 2004). En el análisis de la secuencia del ITS no se encontraron diferencias entre el DNA de cisticercos obtenidos del primer y segundo stocks de ratones BALB/cAnN. Este resultado no invalida la posibilidad de que variaciones genéticas en otras regiones del parásito se hayan presentado como consecuencia de su constante reproducción por gemación, y que se asocien con una mejor adaptación de crecimiento en la cepa restrictiva BALB/cJ.

De hecho, al evaluar los polimorfismos de esta secuencia entre muestras de cisticercos obtenidas del primer y segundo grupos de ratones, así como de distintos cisticercos procedentes de un mismo ratón BALB/cAnN, se

encontraron en el ITS1 cambios en la posición 427 (guanina por timina), 449 (timina por guanina) y 457 (timina por guanina) (Tabla 16). De manera similar, para la secuencia ITS2 se encontró un cambio en la posición 302 de guanina por citosina, y con respecto al reportado en el banco de genes (QD099564) se encontraron 12 cambios (Tabla 17). Para explicar esto hay que observar que la secuencia se obtuvo de una tenia, el estado adulto del parásito, y considerando que los cisticercos de ORF presentan mutaciones (Kuhn, 1971), las diferencias encontradas con las secuencias amplificadas de los cisticercos ORF son de esperarse.

Para continuar con el estudio de la participación de la respuesta temprana en mediar las diferencias de permisividad, y debido a que BALB/cJ es tan permisiva como BALB/cAnN, decidimos evaluar la respuesta temprana entre BALB/cAnN y C57BL/6J, la cepa más restrictiva a la instalación y el crecimiento del parásito (Sciutto et al., 1991; Fragoso et al 2008).

En la respuesta inmune hacia la cisticercosis experimental murina se ha reportado que en la cepa BALB/c hay una respuesta polarizada tipo Th1 durante las tres primeras semanas de infección, con altos niveles de IFN $\gamma$  (Toenjes et al, 1999; Terrazas et al, 1999), IgG2a específicos y macrófagos activados que producen una fuerte respuesta proinflamatoria (Rodríguez-Sosa et al., 2002); esta respuesta se ha considerado restrictiva a la reproducción del parásito, debido a que durante este tiempo el número de parásitos es bajo comparado con tiempo tardíos, cuando la carga parasitaria se incrementa notablemente (Toenjes et al, 1999; Terrazas et al, 1999). Con estos

antecedentes, al evaluar la respuesta temprana en BALB/cAnN y C57BL/6J se esperaba un claro incremento en la respuesta de ratones restrictivos C57BL/6J; sin embargo, durante los días 3 y 5 de infección se encontró que la mayor respuesta inflamatoria se presentó en la cepa más permisiva BALB/cAnN, en la cual hay un mayor porcentaje de células peritoneales NK totales, IKDCs, así como mayores niveles de IFN $\gamma$ , además de un mayor número de cisticercos vesiculares recuperados en comparación con los ratones de la cepa restrictiva C57BL/6J.

En la cepa C57BL/6J se encontró un mayor porcentaje de células NKT y los ratones presentaron casi todos los cisticercos dañados o coloidales.

Estos resultados sugieren que la respuesta de los ratones BALB/cAnN no resulta protectora, sino más bien podría facilitar la restructuración e instalación del parásito, ya que los parásitos recuperados de estos animales, después de dos semanas en cultivo, logran crecer y gemar; en cambio, los cisticercos recuperados de ratones C57BL/6J casi todos son coloidales, y después de dos semanas in vitro no aumentan su tamaño ni geman; por el contrario, casi todos se calcifican.

Algunos parásitos, como *Echinococcus multilocularis* (Schussler et al., 1997), *C. elegans* (Zavala-Gongora et al., 2003; Freitas et al., 2005) y *Schistosoma mansoni* (Davies et al., 1998; Kinobloch et al., 2004), utilizan moléculas producidas por el hospedero como el TGF $\beta$  o el EGF para promover su reproducción y diferenciación a través de receptores, en los cuales se ha encontrado una homología estructural y funcional con el hospedero.

Entre estas moléculas, el TGF $\beta$ , además de regular funciones reproductivas y de diferenciación (Brehm, 2003), es capaz de modular la respuesta inmune inflamatoria del hospedero (Dissous et al., 2006). Considerando que las principales células productoras de factores de crecimiento como el TGF $\beta$  son los linfocitos y macrófagos, que se presentaron en mayor cantidad en la cepa permisiva, se decidió evaluar los niveles de TGF $\beta$  en el lavado peritoneal de los ratones de ambas cepas permisivas y restrictivas a la infección. No se encontraron diferencias en los niveles de TGF $\beta$  en el líquido peritoneal de los ratones infectados de ambas cepas. Esto podría deberse a que los cisticercos en BALB/cAnN pudieran utilizar el factor para su reestructuración y reproducción, mientras que los cisticercos en C57BL/6J no utilizan, los productos de secreción de las células peritoneales, ya que en su mayoría están muy dañados y posteriormente morirán.

Simultáneamente se evaluó la expresión del receptor TGF $\beta$  1 y 2 en los cisticercos, y se encontró que *Taenia crassiceps* expresa el receptor para TGF $\beta$  2 en mayor concentración hacia la zona de gemación. Se ha comenzado a evaluar la producción de TGF $\beta$  durante la respuesta temprana en ratones permisivos a la cisticercosis, así como su posible utilización por el cisticerco para su reestructuración y exitosa instalación.

Se han identificado cinco diferentes tipos de receptores para TGF $\beta$ : los receptores funcionales, como el tipo I (T $\beta$ RI, de 53 a 65 kDa) y el tipo II (T $\beta$ RII, de 83 a 110 kDa), y los receptores no funcionales, que incluyen el tipo III (T $\beta$ RIII, de 250 a 310 kDa), tipo IV (T $\beta$ RIV, de 60 kDa) y el tipo V (T $\beta$ RV, de

400 kDa) (Massague, 1992). Hasta ahora se sabe que el TGF $\beta$  se\u00f1aliza por la uni\u00f3n a los receptores serina-treonina cinasa T $\beta$ RI y T $\beta$ RII; sin embargo, los efectos biol\u00f3gicos son mediados principalmente por T $\beta$ RI (Ohtsuki, 1992). La expresi\u00f3n constitutiva de receptores produce la activaci\u00f3n del receptor T $\beta$ RII de TGF $\beta$ , el cual puede homodimerizarse de manera independiente del ligando, a trav\u00e9s de las regiones extracelular-transmembranal. Sin embargo, la homodimerizaci\u00f3n del receptor II de TGF $\beta$  no es capaz de transducir una se\u00f1al funcional (Feng y Derynck, 1997). La expresi\u00f3n s\u00f3lo de T $\beta$ RII en *Taenia crassiceps* y su transducci\u00f3n de se\u00f1al de TGF $\beta$  tendr\u00e1n que evaluarse, considerando la posibilidad de que el T $\beta$ RI en *T. crassiceps* no sea hom\u00f3logo al que se utiliz\u00f3 para su identificaci\u00f3n.

En general, los resultados presentados en este trabajo de investigaci\u00f3n se\u00f1alan a la posibilidad de que una respuesta efectora montada antes del tiempo evaluado en el estudio y el incremento del porcentaje de c\u00e9lulas NKTs a los d\u00edas 3 y 5 en los ratones C57BL/6J resulte en un da\u00f1o del par\u00e1sito y que \u00e9ste se encuentre sin posibilidades de instalarse ni reproducirse. Mientras tanto, el incremento de c\u00e9lulas (NK, IKDCs) compatibles con una mayor respuesta inflamatoria promueve el establecimiento y crecimiento del par\u00e1sito en los ratones BALB/cAnN.

En tiempos tempranos llama la atenci\u00f3n que la acci\u00f3n de las c\u00e9lulas NK e IKDCs no parece ser efectiva para el control de la cisticercosis; entre las principales funciones de las c\u00e9lulas NK est\u00e1 la producci\u00f3n de citocinas y quimiocinas proinflamatorias; nosotros evaluamos los niveles de IFN $\gamma$  como un

primer acercamiento al estudio de la respuesta temprana, puesto que es una citocina clave en la activación clásica de macrófagos y de las mismas células NK, induciendo el desarrollo de una respuesta inflamatoria.

En este caso, a pesar del gran incremento en el porcentaje de esta población celular en BALB/cAnN, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de esta citocina entre BALB/cAnN y C57BL/6J, lo que podría implicar que todas estas células la utilizan, y por esa razón no se detecta en los lavados peritoneales; es muy importante considerar la evaluación de otras citocinas producidas por las células NK y que podrían actuar en esta respuesta, como  $TNF_{\alpha}$ , IL-3, GM-CSF y M-CSF, así como ciertas quimiocinas, MIP-1, MIP-1 $\beta$  y RANTES, de gran importancia en los fenómenos inflamatorios.

Otra función importante de las células NK es la eliminación de células blanco por procesos de citotoxicidad celular; conociendo que las células NK pueden reconocer células blanco a través de receptores CD16 y considerando que los cisticercos pueden tener anticuerpos unidos a ellos, éstos podrían ser reconocidos por su extremo Fc. Ninguno de los mecanismos de acción de las células NK parece ser eficientes en el control de la instalación del cisticerco.

En el caso de las células IKDCs, una población recientemente descrita de células NK (NK+CD11c+B220+) tiene la cualidad de funcionar en un principio como células NK, incrementando los marcadores de estas células (producen  $IFN_{\gamma}$  y son capaces de eliminar células blanco por citotoxicidad celular) y en tiempos más avanzados como células dendríticas, capaces de procesar antígenos y presentar en órganos linfoides secundarios (Shortman K. y

Villadangos. 2006; Chaput et al., 2006), aunque en esta función no son tan eficientes como las células dendríticas convencionales. Consideramos que la función principal de estas poblaciones celulares en tiempos tempranos de la infección consiste en la producción de citocinas, que estarían promoviendo una mayor activación de la respuesta proinflamatoria. En cuanto a la función de citotoxicidad, no podemos descartar que las dos poblaciones de células NK reconozcan al cisticerco de *T. crassiceps* y que éstas puedan tener efectos citotóxicos sobre células del parásito; sin embargo, esto es algo que deberá evaluarse.

La posibilidad de que en la cepa restrictiva C57BL/6J las células NKT, o una respuesta en tiempos anteriores a los evaluados en este estudio, medien directa o indirectamente el daño al parásito se fortalece considerando las observaciones de Reyes y colaboradores en 2009. En este trabajo, los autores demuestran que células presentadoras de antígeno derivadas de la médula ósea de ratones C57BL/6J estimulados con antígeno de *T. crassiceps* se activan de manera más eficiente que las provenientes de ratones BALB/cAnN. Es factible que una activación tardía o ineficiente de la respuesta temprana en los ratones BALB/cAnN, aunada a la liberación de moléculas como TGF $\beta$ , podría participar en la reconstitución e instalación del parásito, dando como resultado la permisividad a la instalación y reproducción del mismo.

Otro factor biológico relevante en mediar las diferencias de permisividad es el sexo. Desde que comenzó a utilizarse la cisticercosis murina como modelo experimental de cisticercosis se observó que las hembras son más permisivas

a la infección que los machos (Larralde et al., 1995; Morales-Motor, 1996). Por otro lado, se ha observado que durante infecciones crónicas el parásito es capaz de cambiar el ambiente hormonal del hospedero, y una vez “feminizado” logra reproducirse de manera que en los machos la carga parasitaria se iguala con las hembras después de varios meses de infección (Larralde et al., 1995).

Se estudió la participación de los factores sexuales en mediar las diferencias de permisividad al crecimiento del parásito, y se ha determinado que un ambiente con estradiol (E2) y progesterona (P4) estimula la reproducción e infectividad del cisticerco, mientras que un ambiente con testosterona (T4) y dihidrotestosterona (DTH) inhibe tanto la reproducción como la infectividad (Escobedo et al., 2004).

Con el fin de evaluar si la respuesta temprana es más eficiente en el sexo más restrictivo, en este trabajo comparamos la composición celular peritoneal en hembras y machos de ratones permisivos BALB/cAnN y restrictivos C57BL/6J para el crecimiento del parásito. Observamos en los machos de la cepa BALB/cAnN un mayor porcentaje de células NK totales, mientras que en las hembras hay un incremento significativo del número de cisticercos vesiculares recuperados, así como un incremento en los niveles de IFN $\gamma$ . Esto sugiere que la acción de las células NK podría retrasar la reproducción del parásito, dado que los cisticercos obtenidos en estos tiempos de infección logran crecer después de permanecer dos semanas en cultivo, pero no reproducirse, a diferencia de los recuperados de las hembras de la misma cepa; este posible

efecto de las células NK en el retraso de la reproducción en los cisticercos, así como sus mecanismos de acción, deberán evaluarse.

El incremento de IFN $\gamma$  en las hembras pudiera reflejar que, a pesar de la existencia de moléculas activadoras de la respuesta proinflamatoria, ésta no es suficiente para controlar la instalación y reproducción del parásito. De hecho, en la relación hospedero-parásito se establecen asociaciones muy complejas, en las que difícilmente una sola molécula podría controlar un parásito.

Otro resultado de interés es la observación de que dependiendo del ambiente inmunoendocrinológico al que se enfrentó el parásito, éste queda sensibilizado a cierto destino. Los parásitos recuperados luego de tres días en el peritoneo de machos BALB/cAnN, tras permanecer dos semanas en cultivo, no fueron capaces de crecer ni gemar. Mientras tanto, parásitos obtenidos en condiciones equivalentes de hembras de la misma cepa crecen y geman tras dos semanas en cultivo. En experimentos similares realizados con parásitos provenientes de ratones C7BL/6J de ambos sexos no se observaron diferencias entre la capacidad de crecimiento de los parásitos recuperados. Ni los parásitos provenientes de hembras ni los recuperados de machos crecieron, y casi todos murieron después de dos semanas. Esta observación nos permite concluir que el ambiente de C57BL/6J implica un daño irreversible al parásito, de una magnitud que no permite observar diferencias entre factores relacionados con el sexo.

En resumen, en este trabajo de tesis se estudiaron los eventos inmunológicos y endócrinos tempranos ocurridos durante la infección en hospederos con diferente permisividad al crecimiento del parásito, determinada por el sexo y por la cepa de ratones. Los resultados obtenidos señalan la complejidad de la relación hospedero-parásito, en donde la respuesta inmune pudiera no ser benéfica para el hospedero, y sugieren algunos de los componentes que podrían mediar restricción o permisividad a la reproducción del parásito.

## 11. CONCLUSIONES

La restrictividad en los ratones BALB/cJ, está relacionada con un incremento al día 5, en el porcentaje de células NK y macrófagos peritoneales, así como un incremento de IFN $\gamma$  en la cavidad peritoneal de los ratones antes de la infección.

El cambio del bioterio de convencional a libre de patógenos, ocasionó la pérdida en las diferencias de permisividad entre las sublíneas de BALB-cJ y BALB/cAnN, anulando también las diferencias de la respuesta inmune encontrada.

La correlación en la expresión de la proteína Qa-2 y la restrictividad a la instalación y reproducción del cisticerco dejó que existiera en las cepas BALB/cJ y TgB1 en estas nuevas condiciones de mantenimiento.

No se encontraron cambios asociados al ITS entre los cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizados durante el estudio que pudieran estar relacionados con el cambio en la restrictividad a la cisticercosis en BALB/cJ.

La cepa C57BL/6J continúa siendo restrictiva a la instalación y reproducción del parásito, lo que pone de manifiesto la participación multifactorial en el control de la cisticercosis.

En el estudio de la respuesta temprana entre BALB/cAnN y C57BL/6J, se encontró un incremento de la respuesta inmune en la cepa permisiva

BALB/cAnN, dada por células NK, IKDCs e IFN $\gamma$  sugiere que esta respuesta podría resultar facilitadora a la instalación del parásito.

La expresión del receptor TGF $\beta$ 2 en *Taenia crassiceps*, señala que la producción de estas moléculas por las células inmunes, podrían ser utilizadas a favor del parásito para lograr su instalación y reproducción en el hospedero.

En la cepa restrictiva C57BL/6J una respuesta dada antes del tiempo estudiado así como el incremento de IL-12 al día 3 de infección son determinantes en el control a la instalación del cisticerco, dañándolo y ocasionando su muerte.

La participación de los factores sexuales en la cepa permisiva esta dado por un incremento de células NK en los machos. La participación de estas células podría estar en el retraso de la reproducción del cisticerco, ya que este logra instalarse exitosamente y los mecanismo bajo los cuales actúan deben ser evaluados.

En la cepa restrictiva C57BL/6J, no se detectaron cambios en la restrictividad a la infección entre sexos, ya que en ambos los cisticercos no logran instalarse y mueren.

## 12. PERSPECTIVAS

Evaluar la participación de TGF $\beta$  en la estructuración y reproducción del cisticerco.

Estudiar el efecto de las células NK en el retraso de la reproducción del cisticerco en los machos de la cepa permisiva BALB/cAnN.

Evaluar la función de las células IKDCs en la cepa BALB/cAnN y su función como CPA.

Estudiar la respuesta temprana antes de los tiempos estudiados durante este trabajo en la cepa C57BL/6J, así como la función de las células NKT en el control de la cisticercosis.