



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

*Estudio de la respuesta inmune generada por la coinfección
Taenia crassiceps y Toxoplasma gondii*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A:

Laura Maribel Rangel Ruiz

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA

2011



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO



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.

**En la vida a diferencia
del ajedrez el juego
continúa después del
Jaque mate.**

Isaac Asimov

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, bajo la acertada dirección de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

Bajo la revisión de:

Dra. Leticia Moreno Fierros

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdes

Dr. Ricardo Mejia Zepeda

Biol. Julia Reyes Reali

Agradecimientos

Agradezco muy en especial a la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, Directora de esta Tesis, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, ser una guía, por el tiempo, apoyo y paciencia que siempre mostró conmigo, por que más que mi Directora la considero un gran ser humano que ha dejado una huella en mi vida, gracias por haber confiado en mí.

A la M. en C. Imelda Juárez Avelar, quien sin su apoyo y atenciones este trabajo no habría podido realizarse.

De igual modo, deseo agradecer el apoyo de las personas que forman parte de la Comisión Dictatorial, por sus sugerencias y observaciones acerca de este trabajo:

Dra. Leticia Moreno Fierros

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdes

Dr. Ricardo Mejia Zepeda

Biol. Julia Reyes Reali

Por ultimo agradezco a mi familia, amigos y compañeros.

De corazón, Gracias.

Dedicatoria

Este trabajo se los dedico a mi mamá María del Carmen Ruiz Contreras, a mi papá Armando Rangel Morales y a mis hermanas Karelia y Lupita quienes han sido el pilar y las bases de la persona que soy gracias al amor, apoyo y fe con el que siempre me han educado y mostrado, por enseñarme que siempre se puede lograr lo que uno se proponga y ser el motor que me impulsa a seguir adelante sobretodo en los momentos difíciles, los quiero.

A mis muy queridos amigos, Andy Pandi, la abuela, Dalia, Marisela Nuñez, Miriam Jimenez, Richard y Ximena por formar parte en mi vida y compartir grandes momentos, por demostrarme que los verdaderos amigos si existen, por que han dejado cada uno una parte de ustedes en mi, por eso y mucho más me considero muy afortunada de haberlos conocido y formar parte de sus vidas, por haber vivido todas aquellas experiencias.

A mis amigos de laboratorio, Alicia, Esperanza, Erik, Fer, Ime, Juan, Lau, Vic y Yuriko por que a pesar de empezar como compañeros a cada uno de ustedes les he tomado un cariño.

Y a todas aquellas personas que han formado parte de mi vida de algun u otro modo.

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
BBB	Barrera Hematoencefálica
BMEC	Células Endoteliales Microvasculares del Cerebro
CPA	Células Presentadoras de Antígeno
DCs	Células Dendríticas
ELISA	Ensayo Inmuno Enzimático
ES	Error Estandar
ET	Encefalitis Toxoplásmica
IFN	Interferon
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
i.p.	Intra peritoneal
LD	Dosis Letal
MIF	Factor Inhibidor de Migración
MHC	Complejo de Histocompatibilidad
NK	Células Asesinas Naturales
NKT	Linfocitos T naturales
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Oxido Nítrico
PAS	Acido Periódico de Schiff
PBS-T	PBS-Tween
PV	Vacuola Parasitofora
RI	Respuesta Inmune
SEM	Semana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

Abreviaturas	Significado
SNC	Sistema Nervioso Central
<i>T. crassi</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
<i>T. crassiceps</i>	<i>Taenia crassiceps</i>
TGF	Factor de Crecimiento Transformante
<i>T.gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th1	Inmunidad celular o retardada
Th2	Inmunidad Humoral
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
Treg	Células T reguladoras
Tri	Células T reguladoras inducibles
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

GLOSARIO

Endodiogenia	Proceso por el cual a partir de un individuo se inicia la formación de las membranas de 2 individuos. De manera que se intercalan y el núcleo se estrangula y se originan 2 nuevo individuos.
Endopoligenia	Proceso en el cual a partir de un individuo se originan varios más.
Esporogonia	Forma sexuada que da lugar a la formación de microgametos femeninos y microgametos masculinos flagelados.
Fase Enterica	Esta fase se presenta cuando el hospedador definitivo ingiere los quistes. En el caso de <i>T. gondii</i> tiene lugar en el intestino del felino. Los quistes ingeridos liberan los trofozoitos que penetrarán en la célula intestinal mediante un mecanismo activo, y se sitúan en una vacuola. En este momento, pueden dividirse de forma asexuada o sexuada.
Heteroxenous	Parásito que presenta varios hospederos intermediarios.
Oocistis	Estado del parásito <i>T. gondii</i> que se forma tras el ciclo sexuado que tiene lugar en el intestino del gato. En su interior contiene 8 esporozoitos, este es infectivo.

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Pág
1.- Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>	7
2.- Larvas de <i>Taenia sp.</i> Alojadas en diferentes tejidos del cuerpo humano	8
3.- Respuesta Imune del hospedero ante una infección por <i>Taenia crassiceps</i>	9
4.- Casos de Toxoplasmosis localizados en los diferentes órganos	13
5.- Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	15
6.- Representación de la Respuesta Inmune que se monta ante una infección con <i>Toxoplasma gondii</i>	20
7.- Plan de Trabajo	24
8.- Cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> en cavidad abdominal de ratones BALB/c silvestres	28
9.- Quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> en macerado de cerebro de ratones BALB/c silvestres	29
10.- Porcentaje de sobrevida en ratones BALB/c silvestres coinfectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p. y 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	30
11.- Quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> en macerado de cerebro de ratones BALB/c silvestres coinfectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p. y 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	31
12.- Concentración de MIF en suero de ratones BALB/c silvestres infectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	32
13.- Concentración de MIF en suero de ratones BALB/c silvestres infectados con 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i>	33
14.- Permeabilidad hematoenfática en cerebro de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p.	34
15.- Permeabilidad hematoenfática en cerebro de ratones BALB/c	

infectados con 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	35
16.- Concentración de citocinas proinflamatorias en suero de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p.	36
17.- Concentración de citocinas antiinflamatorias en suero de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p.	37
18.- Concentración de IL-12 en suero de ratones BALB/c coinfectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p. y 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	38
19.- Concentración de IFN- γ en suero de ratones BALB/c coinfectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p. y 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	39
20.- Concentración de IL-4 en suero de ratones BALB/c coinfectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p. y 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	40
21.- Concentración de IL-10 en suero de ratones BALB/c coinfectados con 10 cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> vía i.p. y 40 quistes de <i>Toxoplasma gondii</i> vía i.p.	41
22.- Cuadro comparativo de cortes histológicos de bazo observado a diferentes objetivos en microscopio óptico	43
23.- Cuadro comparativo de cortes histológicos de hígado observado a diferentes objetivos en microscopio óptico	44
Tabla 1.- Propuesta de desarrollo de ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejido de ratón alimentado con oocistos	16
Tabla 2.- Propuesta de desarrollo de ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> en tejido de ratón alimentado con bradizoito/quiste tisular	16

CONTENIDO

	Pág.
ABREVIATURAS	VI
GLOSARIO	VII
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	IX
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Sistema inmune innato.....	3
1.2. Sistema inmune adquirido ó adaptativo.....	5
1.3. Helmintos.....	5
1.3.1. Respuesta inmune a helmintos.....	7
1.4. <i>Taenia crassiceps</i>	8
1.4.1. Respuesta Inmune a <i>T. crassiceps</i>	9
1.5. <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.5.1. Taquizoitos.....	11
1.5.2. Quiste.....	11
1.5.3. Bradizoitos.....	11
1.5.4. Ooquistes.....	12
1.6. Toxoplasmosis.....	13
1.7. Ciclo de Vida.....	16
1.8. Respuesta Inmune a <i>T. gondii</i>	20
1.9. Mecanismos de Evasión.....	21
1.10. Coinfecciones.....	22
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. OBJETIVO GENERAL	23
3.1. Objetivos Particulares.....	23
4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1. Animales.....	25
5.2. Parásitos.....	25
5.3. Infección y co-infección con <i>T. crassiceps</i> - <i>T. gondii</i>	25
5.4. Sobrevida.....	25
5.5. Obtención de Suero.....	26
5.6. Quistes de <i>T. gondii</i> en Cerebro.....	26
5.7. Determinación de Permeabilidad Hematoencefálica.....	26
5.8. Determinación de citocinas en suero IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 y MIF.....	27
5.9. Cortes Histológicos.....	27
5.10. Análisis estadístico.....	27
6. RESULTADOS	
6.1. Carga Parasitaria de <i>Taenia crassiceps</i>	28
6.2. Quistes de <i>Toxoplasma gondii</i>	29
6.3. Sobrevida de ratones coinfectados, <i>T. crassiceps</i> – <i>T. gondii</i> ..	30

6.4. Número de quistes de <i>T. gondii</i> en la coinfección con <i>T. crassiceps</i>	31
6.5. Determinación de MIF en suero	
6.5.1. Producción de MIF en la infección por <i>T. crassiceps</i>	32
6.5.2. Producción de MIF en la infección por <i>T. gondii</i>	33
6.6. Permeabilidad Hematoencefálica	
6.6.1. Permeabilidad Hematoencefálica en la infección por <i>T. crassiceps</i>	34
6.6.2. Permeabilidad Hematoencefálica en <i>T. gondii</i>	35
6.7. Producción de citocinas en la infección con <i>T. crassiceps</i>	
6.7.1. Citocinas Pro inflamatorias.....	36
6.7.2. Citocinas Anti inflamatorias.....	37
6.8. Producción de citocinas durante la coinfección <i>T. crassiceps-T. gondii</i>	
6.8.1. Citocinas Pro-inflamatorias.....	40
6.8.2. Citocinas Anti inflamatorias.....	42
6.9. Cortes Histológicos	
6.9.1. Histología de Bazo.....	43
6.9.2. Histología de Hígado.....	44
7. DISCUSIÓN	51
8. CONCLUSIONES	51
9. BIBLIOGRAFIA	55
APENDICE	57

RESUMEN

Diversas evidencias sugieren que la respuesta inmune generada por un reto inicial influye el curso de la respuesta inmune a un segundo reto no relacionado con el primero. La respuesta inmune (RI) en ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* se caracteriza porque en infecciones agudas se desarrolla una respuesta tipo Th1 asociada a IFN- γ , IL-2 y anticuerpos de tipo IgG2a, mientras que en infecciones crónicas se desarrolla una respuestas de tipo Th2 con los niveles altos de IL-4, IL-6, IL-10 y anticuerpos tipo IgG1 e IgG2b. En este trabajo se aprovecharon estas condiciones para explorar *in vivo* si diferentes perfiles de la RI de la infección en ratones por cisticercos de *T. crassiceps* pueden influir sobre la RI y la susceptibilidad a una infección posterior de un parásito intracelular como *T. gondii*. Ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad, se infectaron con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía intraperitoneal (i.p.). Después de una, cuatro y ocho semanas de infección, fueron coinfectados vía i.p. con cuarenta quistes de *T. gondii* (ME49). Se usaron como controles ratones de la misma edad y sexo infectados únicamente con *T. gondii* y no infectados. El número de quistes de *T. gondii* en cerebro fue determinado al microscopio. Los niveles de IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10 y MIF fueron determinados por ELISA tipo Sandwich; asimismo se determinó la permeabilidad hematoencefálica en el curso de cada una de las dos infecciones parasitarias. Se encontró que en las co-infecciones se observaron dos cursos diferentes de la infección de *T. gondii* dependientes de los momentos de la coinfección. 1) Una reducción en la susceptibilidad a *T.gondii* cuando la coinfección se hizo en la semana uno asociadas a niveles incrementados de IFN- γ e IL-12. 2) Un incremento significativo en la susceptibilidad y muerte por *T. gondii* cuando se coinfectarón en la semana 4 y 8 asociada a un decremento en la producción de IFN- γ así como un aumento en la permeabilidad hematoencefálica. Por lo que se concluye que la infección con *T. crassiceps* domino sobre la respuesta inmune que se desarrolla en *T. gondii*.

Palabras Clave: Coinfección, *Toxoplasma*, *Taenia crassiceps*.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune protege al organismo por su capacidad de reconocer a los agentes patógenos potenciales tales como bacterias, virus, protozoos, parásitos, hongos (y sus productos tóxicos, toxinas bacterianas) e inicia una serie de respuestas para combatirlos [1].

El sistema inmune puede dividirse en dos partes:

- Sistema inmune Innato
- Sistema inmune Adquirido o Adaptativo

1.1. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa de los seres vivos, es capaz de detectar la presencia y naturaleza de la infección de manera inmediata [2] y rápidamente monta una respuesta protectora, capaz de detectar un espectro amplio de bacterias, virus, hongos, parásitos y protozoos, la actividad de esta respuesta puede ser reconocida como una reacción inflamatoria. El sistema inmune innato está constituido por una serie de mecanismos de defensa los cuales están mejor caracterizados en los mamíferos y sobretodo en humanos, aun cuando esta respuesta se presenta en todos los animales [3].

Las características de la inmunidad innata se limitan a la capacidad para discriminar a un microorganismo de otro y a su naturaleza moderadamente estereotípica. Funciona de manera parecida frente a la mayoría de los agentes infecciosos [1].

Los elementos esenciales de la inmunidad innata son: 1) Barreras Físicas y Químicas, como epitelios y sustancias antimicrobianas producidas en la superficie epitelial; 2) Proteínas sanguíneas entre las que se incluyen miembros del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación, y 3) Células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y otros leucocitos como granulocitos, eosinófilos y células citotóxicas naturales (células NK) [1, 3].

Otra función sobresaliente de la respuesta inmune innata es el reclutamiento de muchas células fagocíticas y moléculas efectoras al sitio de la infección a través

de la liberación de citocinas secretadas por los fagocitos, los cuales constituyen una diversidad de sustancias mediadoras de inflamación entre las que se encuentran interleucinas (IL) 1, 6, 8, 12 y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interferón (IFN) del tipo 1 [4]. Además, la respuesta inmune innata favorece diversas funciones importantes en la inducción de respuestas inmunitarias específicas.

1.2. Sistema inmune adquirido ó adaptativo

La inmunidad adquirida se desarrolla cuando los agentes infecciosos logran evadir los mecanismos de defensa de la respuesta inmune innata. Esta respuesta se inicia cuando entra en el hospedero una cierta dosis de antígenos, haciéndose efectiva sólo después de varios días; tiempo requerido para que las células presentadoras de antígeno (CPA) procesen y presenten antígenos a los linfocitos T y B para que reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras [1].

Las características de la inmunidad adquirida o adaptativa son; especificidad exquisita para moléculas diferentes; especialización, que las capacita para responder de forma singular a distintos tipos de microorganismos y su capacidad para recordar y responder con mayor fuerza tras exposiciones repetidas al mismo microorganismo [1].

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla mediante dos mecanismos fundamentales reconocidos como; Respuesta Inmune Humoral, donde los linfocitos B juegan un papel preponderante, y una Respuesta Inmune Celular, donde los linfocitos T son las células esenciales. Ambas respuestas comienzan con la actividad de los linfocitos en los órganos periféricos favorecida por las CPA, que alcanza a estos órganos a través de la circulación linfática [4], además producen componentes linfocíticos y sus productos, entre ellos los anticuerpos, que ejercen una influencia importante en la respuesta inmune [1].

El sistema inmune específico considera muchos de los mecanismos efectoras de la inmunidad innata para eliminar invasores extraños: 1) la respuesta inmune innata estimula los mecanismos protectores de la Inmunidad específica y de este

modo los capacita mejor para eliminar a los antígenos extraños, 2) el sistema inmune específico ha supuesto sobre los mecanismos relativamente estereotipados de la inmunidad innata al grado de especialización y 3) el Sistema inmune específico “recuerda” todos los encuentros con un microorganismo o antígeno extraño, de tal modo que los encuentros posteriores estimulan mecanismos de defensa cada vez más eficaces. Esta propiedad se denomina “Memoria Inmunológica” [1].

Con base a la funcionalidad de los linfocitos T se han diferenciado en dos tipos de respuestas colaboradoras la Th1 (inmunidad celular o retardada) altamente efectiva en la eliminación de patógenos intracelulares y la Th2 de gran importancia en la eliminación de organismos extracelulares y parásitos, esta división se basó en el panel de citocinas que son capaces de secretar y con las que modulaban diversos tipos celulares. Se denominó Th1 a los linfocitos secretores de Interferón γ (IFN- γ) e Interleucina 2 (IL-2), mientras que la IL-12 es la promotora en la transformación en células Th1; y se denominó Th2 a los linfocitos que liberan IL 13 e IL-4 siendo esta última la encargada de promover la transformación de células vírgenes a Th2 [5].

Se han descrito una amplia variedad de poblaciones celulares reguladoras que controlan la respuesta inmune en diferentes puntos y a través de diversos mecanismos. Entre las que poseen funciones reguladoras se encuentran los linfocitos T CD4+, los T CD8+, T $\gamma\delta$, los linfocitos citolíticos naturales (NK), los linfocitos T naturales (NKT), los T CD3+ y los linfocitos B [5].

Los linfocitos TCD4+ que expresan constitutivamente altas concentraciones de CD25+ se denominan genéricamente como células T reguladoras (Treg). La mayoría de las células Treg que se encuentran en la sangre se originan en el timo y se conocen como células Treg naturales; las que mejor se conocen son las células T reguladoras inducibles (Tr1) y las Th3 [5].

Las Tr1 se diferencian a partir de CD4+CD25- tras la presentación del antígeno por células dendríticas inmaduras en presencia de citocinas como la IL-10 [6] y el Factor de Crecimiento Transformante alfa (TGF- α 35) mientras que las Treg se sitúan en los órganos linfoides periféricos y parecen actuar de forma antígeno

específica a través de señales dependientes del contacto celular y la secreción de interleucinas [7].

Las células Th3 son las productoras del Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) con un funcionamiento similar a las Tr1 describiéndose en las placas de Peyer y los ganglios mesentéricos y se les considera como las causantes de los mecanismos de tolerancia oral [5].

1.3. Helmintos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que más de 1 billón de personas alrededor del mundo sufren de enfermedades tropicales como la helmintiasis, la cual representa uno de los mayores problemas de salud [8] debido a que pueden provocar enfermedades fatales infectando animales y humanos, así como económicos [9].

El clima y la topografía son determinantes cruciales para la distribución de las infecciones causadas por helmintos [10]. En el hombre, los helmintos pueden habitar en el intestino, vasos sanguíneos, órganos linfáticos u otras localizaciones. Con frecuencia migran a través de tejidos hasta alcanzar el órgano definitivo en el que se asientan [11].

La patología producida por las infecciones por helmintos es generalmente compleja, con componentes derivados de las lesiones directas ocasionadas por el parásito y/o por la respuesta inmune a la infección [11], aunque las infecciones por helmintos también pueden ser crónicas asintomáticas o subclínicas.

1.3.1. Respuesta inmune a helmintos

El estudio de la respuesta inmune en infecciones por helmintos ha sido importante, no sólo para el entendimiento de la inmunidad protectora e inmunopatología, sino también para establecer el tipo de inmunidad específica relacionada a esta clase de patógenos [10].

Cada tipo de helminto tiene una estrategia única para infectar y evadir la respuesta inmune del hospedero. Su habilidad inmunomoduladora le permite sobrevivir e interactuar con los mecanismos inflamatorios e inmunológicos involucrados en otras infecciones, vacunas, alérgicas y enfermedades auto inmunes [9]. Por su

parte, el hospedero emplea una variedad de células inmunes y sus productos para repeler esta invasión helmíntica [8]. Hasta ahora, se han descrito 2 tipos de respuestas inmunes para la parcial eliminación de parásitos helmintos y la resistencia a la reinfección, una inmunidad pre-establecida y una inmunidad parcial generada [9].

La inmunidad pre-establecida es definida como un estado en donde el hospedero está protegido de una futura infección de una especie dada debido a una infección persistente con el mismo organismo [9].

Los helmintos inducen una expansión de los linfocitos Th2, no está claro si esta respuesta que incluye aumento de la concentración de IgE total y la expansión y movilización de células efectoras específicas como eosinófilos, mastocitos y basófilos [12], es importante en la respuesta inmune protectora, o si es la responsable de la patología que se observa en algunas parasitosis o, si la presencia de estas células interviene en los dos aspectos [11].

La respuesta inmune Th2 se caracteriza por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 [12] y se induce cuando los helmintos han invadido sitios cutáneos o de mucosas, y representa una función inmune protectora contra estos patógenos. De manera interesante, las citocinas del perfil Th2 se presentan poco después de la infección por helmintos y antes de que la especificidad patogénica las células Th2 se establezca [8].

Aunque la expulsión final de helmintos requiere de una respuesta mediada por células Th2: una pronta respuesta inmune innata de tipo Th2 es importante en la restricción de invasión por helmintos antes de que la respuesta inmune adaptativa se inicie [11]. A pesar de que la respuesta inmune contra la mayoría de los helmintos es orquestada por las citocinas tipo Th2, los gusanos son todavía capaces de persistir en el huésped por mucho tiempo. De hecho, la respuesta inmune durante la fase crónica de la infección recientemente se ha reportado como una respuesta Th2 modificada, es decir, una respuesta Th2 asociada con la actividad de células Treg y la producción de citocinas anti-inflamatorias como son IL-10 y TGF- β [9].

Se sabe también que los helmintos pueden secretar otras citocinas como el Factor Inhibitorio de Migración de macrófagos (MIF), el cual favorece junto con IL-4, el desarrollo de macrófagos alternativos [9].

1.4. *Taenia crassiceps*

Es un céstodo conocido como “gusano cintado”, en estado adulto vive en el intestino de carnívoros, principalmente en zorros, siendo los roedores hospederos intermediarios naturales, en donde se encuentran las larvas o quistes (metacéstodos, cisticercos) en la cavidad peritoneal, tejido conectivo subcutáneo y pleura, donde se multiplican de forma asexual [13, 14]. Por otra parte, los humanos sirven de hospederos intermediarios desarrollándose los metacéstodos en el subcutis y entre el tejido muscular, cuando consumen o ingieren alimentos o agua contaminada con heces de caninos o felinos infectados (Figura 1) [15].

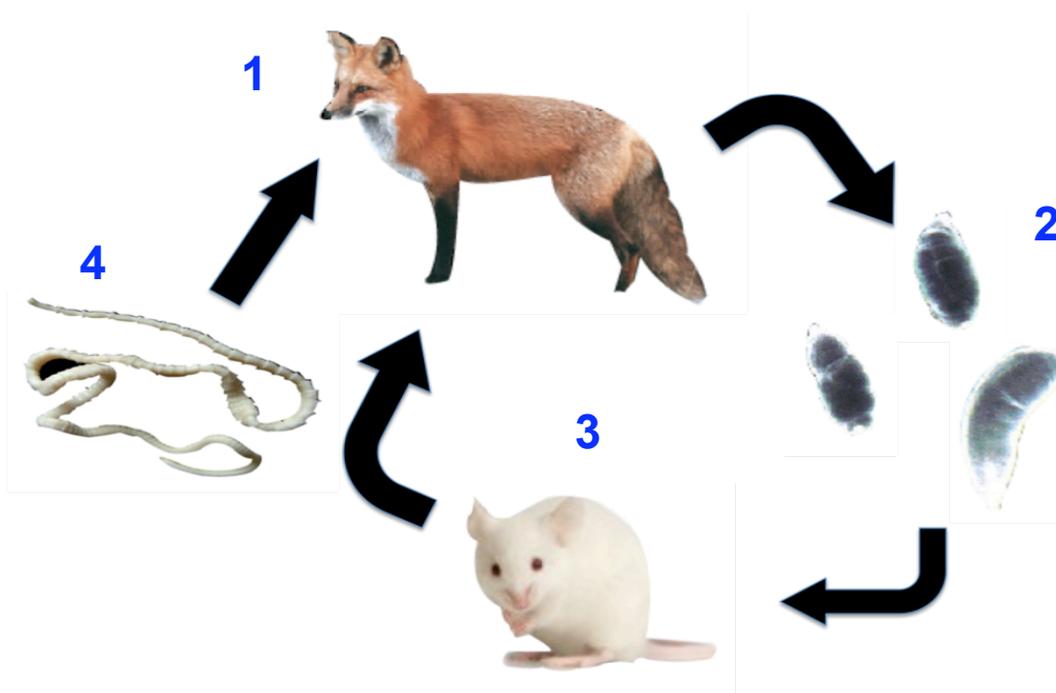


Fig. 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. 1) El canino (zorro, hospedero definitivo) se infecta al consumir presas infectadas, dentro de él se presenta la etapa adulta del gusano 4) y la propagación del parasito por reproducción asexual 2) de la que se obtiene los cisticercos que son liberadas en las heces del zorro, 3) para posteriormente alojarse dentro de los roedores (hospedero intermedio) y reproducirse asexualmente; al ser ingerido por otro animal (zorro) comienza nuevamente el ciclo.

T. crassiceps tiene una amplia reactividad antigénica y una inmunidad protectora cruzada con *Taenia solium* (*T. solium*); la similaridad antigénica es tal que el antígeno de *T. crassiceps* puede ser usado para el inmunodiagnóstico de cisticercosis en humanos [16].

En humanos la infección con quistes de *T. solium* causa la cisticercosis, siendo común en México y países no desarrollados e incrementando su prevalencia en Norte América [17]; ocurre principalmente en personas con VIH y hay reportes de que estos se desarrollan en el ojo o en la sub-retina (Figura 2) [15].

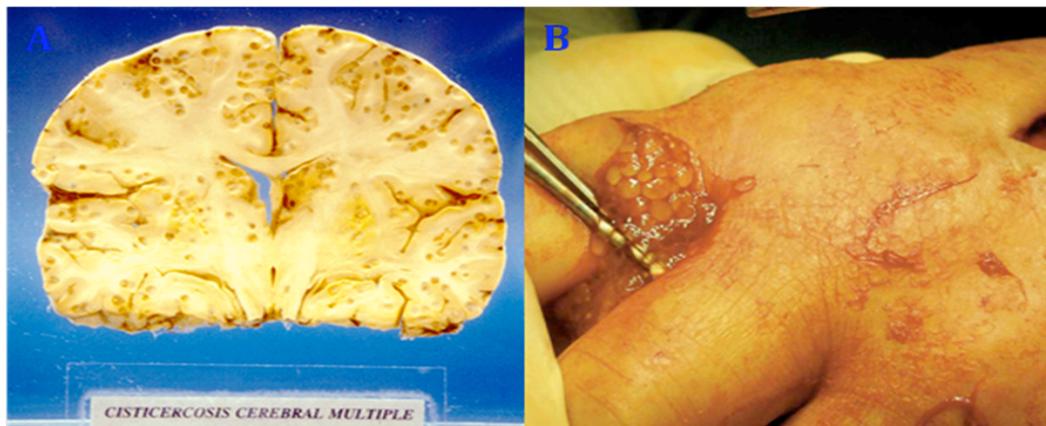


Fig. 2. Larvas de *Taenia* sp. alojadas en diferentes tejidos del cuerpo humano; A) Caso de múltiples larvas de cisticercos alojadas en el cerebro, B) Larvas de cisticercos localizadas en la piel (mano).

1.4.1. Respuesta Inmune a *T. crassiceps*

Al igual que la mayoría de los parásitos extracelulares *T. crassiceps* desarrolla una respuesta inmune de tipo Th2 en donde después de un periodo inicial de establecimiento aparece la respuesta inmune para tener un pequeño efecto en el crecimiento de las larvas, aunque se ha sugerido que los cisticercos activos evaden la respuesta inmune del hospedero a través de factores relacionados con la supresión de la proliferación de células T y la inducción de citocinas que favorecen el cambio de una respuesta temprana Th1 restrictiva hacia una respuesta permisiva (Th2 o mixta Th1/Th2), interfiriendo de esta manera en el desarrollo y función las células accesorias [18]. Así, en un principio se presenta una respuesta tipo Th1 que rápidamente pasa a una débil respuesta mixta

Th1/Th2, pero conforme la infección comienza a progresar a una fase crónica la respuesta de tipo Th2 se va desarrollando de manera intensa (Figura 3) [19].

El dominio de las respuestas Th2 durante la infección con *T. crassiceps* lleva a la susceptibilidad de la infección, principalmente por la supresión del óxido nítrico (ON), una molécula efectora clave en contra de estos parásitos producida principalmente por macrófagos influenciados por linfocitos Th1 [19].

Las células B no parecen participar en la resistencia, después del establecimiento de las larvas [18].

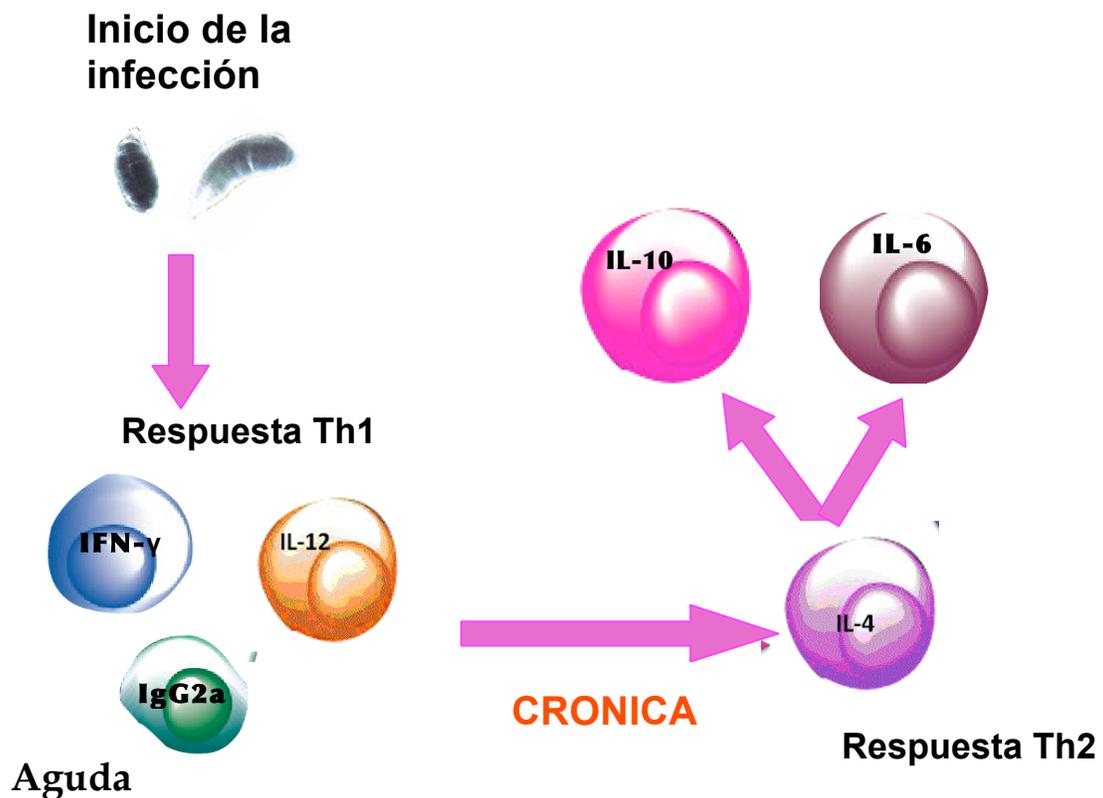


Fig. 3. Respuesta Inmune del hospedero ante una infección por *Taenia crassiceps*.

1.5. *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito intracelular obligado, pertenece al Filo Apicomplexa; clase Sporozoa; subclase Coccidiasina, orden Eimeriorina de la familia Toxoplasmatidae y del género *Toxoplasma* [20] constituyendo la única especie del género *Toxoplasma* en el que todas las cepas parecen ser similares antigénicamente [21].

Es uno de los parásitos protozoos intracelulares más exitoso debido a su capacidad para infectar a un amplio rango de vertebrados de sangre caliente incluido el humano [22]; es uno de los parásitos eucariontes con una mayor abundancia y prevalencia a nivel mundial [23] con una distribución cosmopolita [21].

T. gondii ha sido clasificado en tres tipos de linajes (tipo I-II y III), el tipo I es el de mayor virulencia (LD_{100} de un parásito); por su parte los tipos II y III son de menor virulencia ($LD_{50} \sim 10^3$ y $\sim 10^5$ respectivamente). Todos causan en humanos enfermedades pero aparecen en diferentes tejidos [24]; de igual modo presenta diversos estadios los cuales son taquizoito, bradizoito (en tejido) y esporozoito (estado sexual que sólo se desarrolla en felinos) [25].

Todos los estadios de *T. gondii* se desarrollan dentro de una vacuola parasitofora (PV) en las células del hospedero; los esporozoitos forman dos tipos de PV en células de cultivo, la primera vacuola (PV 1) tiene de 10 a 15 veces el tamaño del esporozoito y no tiene una red membranosa, mientras que la segunda vacuola (PV 2) presenta la red membranal [26].

La localización y número de quistes tisulares difiere con respecto al hospedero y el estadio de *T. gondii*, así como a la cepa del parásito, encontrándose un mayor número de quistes tisulares en cerebro y tejido visceral independientemente de la cepa. Sin embargo, en mamíferos grandes (gato, ganado, ovejas y cabras), los quistes tisulares son más frecuentes en tejido muscular que en el cerebro [26].

T. gondii presenta distintas formas de estadios, de acuerdo a su ciclo de vida y el huésped en el que se encuentre.

1.5.1. Taquizoitos

Este estadio es conocido también como trofozoito, o forma proliferativa, presenta una morfología oval o arqueada (semilunar) con un tamaño de 3-7 μm ; teniendo la capacidad de infectar prácticamente cualquier célula del cuerpo, parasitando sobre todo cerebro, retina, músculo cardíaco y estriado encontrándose libre o intracelularmente [21, 23].

Los taquizoitos se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, reproduciéndose con extraordinaria rapidez [21]. Estructuralmente presentan un núcleo central con pocos o ningún granulo positivo para la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) [26], son de importancia fundamental los micronemas y gránulos densos en la adhesión, invasión, formación de la vacuola parasitófora y adquisición de nutrientes. La replicación conduce a la lisis celular y a la diseminación de taquizoitos a diferentes tejidos [27].

Los taquizoitos son sensibles a las condiciones del ambiente por lo que usualmente mueren rápidamente cuando se encuentran en el exterior del hospedero. Asimismo, son sensibles a las enzimas proteolíticas por lo que usualmente son destruidos por los ácidos gástricos [23].

1.5.2. Quiste

Son formaciones redondas con un tamaño de entre 10-200 μm , se localizan fundamentalmente en el sistema nervioso central (SNC), músculo esquelético y cardíaco, y menos a menudo en pulmón, bazo y ganglios linfáticos. Estos contienen hasta 3000 bradizoitos, estando rodeado de una membrana que le brinda protección [21].

1.5.3. Bradizoitos

Recibe también el nombre de cistozoitos o quistozoitos; son formas de reproducción lenta, encontrándose en el interior del quiste [21].

Presentan una terminal localizada en el núcleo, muchos de los gránulos positivos PAS son encerrados en un quiste con pared resistente prevaleciendo con mayor frecuencia en la fase crónica [26].

Los bradizoitos son menos susceptibles a las quimioterapias, y al jugo gástrico por lo tanto el destino de los bradizoitos en tejidos tiene un significado clínico [26].

1.5.4. Ooquistes

Son elementos ovoides de 10 a 12 μm de diámetro, con una pared gruesa y resistente, siendo la forma más resistente, ya que estos son encontrados comúnmente en el ambiente [21].

1.6. Toxoplasmosis

El parásito de *T. gondii* tiene relevancia veterinaria y médica; al ser el agente causal de la enfermedad conocida como Toxoplasmosis, la cual afecta a 500 millones de personas alrededor del mundo; la seroprevalencia varía de 5% al 90% dependiendo de la localización geográfica, hábitos alimenticios así como hábitos de higiene [28]. La incidencia de la infección es alta en lugares de clima húmedos aumentando con la edad [29].

Aun cuando la infección primaria es habitualmente asintomática (90% de los casos) o leve, se considera un importante patógeno oportunista, ya que la infección se asocia a severas complicaciones en los principales grupos en riesgo (sujetos inmunocomprometidos, mujeres embarazadas, fetos y recién nacidos) [23].

La infección normalmente procede de una fase aguda asociada con una rápida proliferación de taquizoitos a un estadio crónico caracterizado por la presencia de quistes tisulares en el SNC y músculo esquelético [21, 29], éste también puede cruzar otras barreras biológicas y puede diseminarse en diferentes órganos incluido el cerebro [30] de igual modo se le puede encontrar en corazón, pulmones, pericardio y tejido linfático [25].

La enfermedad puede ser congénita o adquirida, al ingerir quistes tisulares en carne, al ingerir agua o alimentos contaminados con ooquistes, al recibir un trasplante de un órgano infectado o por una inoculación accidental [26, 25].

La toxoplasmosis congénita ocurre cuando una mujer embarazada seronegativa está infectada, caracterizada por enfermedades neonatales subclínicas [25] debido

a que durante el embarazo *T. gondii* es capaz de producir una infección primaria que con el tiempo se vuelve congénita, por su habilidad de trasmigrar a través de la placenta y replicarse dentro de diferentes tejidos fetales sin ser obstaculizado por el sistema inmune del feto siendo una causa importante de infecciones prenatales lo que eventualmente puede llevar a lesiones en el feto, nacimiento de patologías considerables con posibles secuelas futuras o a la muerte prenatal o fetal [30], dependiendo del momento de la adquisición de la enfermedad durante la maternidad [25].

En individuos inmunocompetentes la infección normalmente es leve y asintomática [31]; no así en individuos inmunodeficientes (VIH) siendo la infección oportunista del SNC más frecuente [32, 30] y la mayor causa de lesiones cerebrales (encefalitis) (Figura 4) [31, 33, 34].

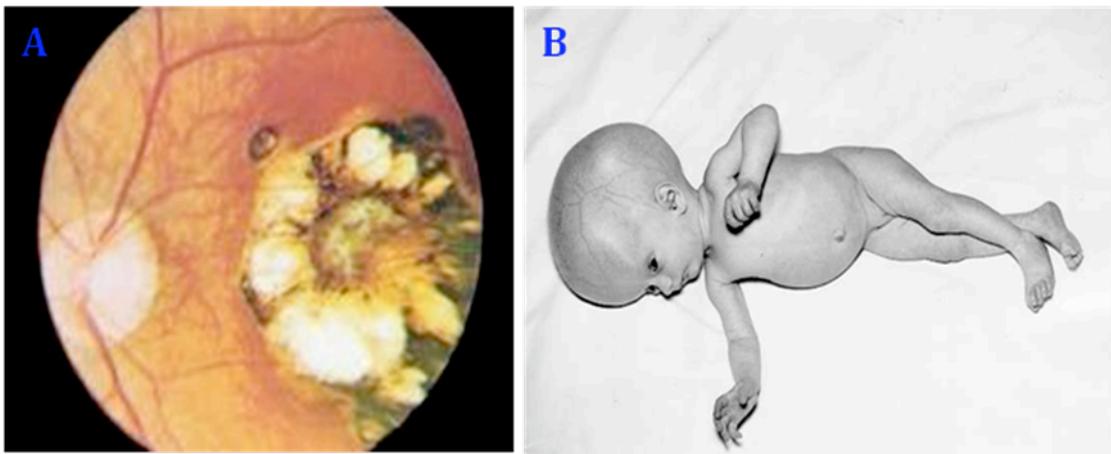


Fig. 4 Casos de Toxoplasmosis localizados en diferentes órganos A) Toxoplasmosis ocular, B) Paciente menor con Toxoplasmosis cerebral.

1.7. Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *T. gondii* es facultativamente heteroxenous, presenta hospederos intermediarios, todos animales de sangre caliente, sus hospederos definitivos son miembros de la familia Felidae.

En el hospedero intermediario *T. gondii* presenta dos fases de desarrollo asexuales, en la primera se presentan los taquizoitos (o endozoitos) multiplicándose rápidamente por una endogamia repetida en varias células del

hospedero [26, 23]. Los últimos taquizoitos generados inician la segunda fase de desarrollo el cual consiste en la formación de un quiste tisular; dentro del quiste de tejido bradizoito (o cistizoito) se multiplican lentamente.

Estos muestran una mayor afinidad por el tejido muscular y neuronal localizándose predominantemente en el SNC, ojos, músculo cardiaco, aunque también se puede encontrar en órganos viscerales como son el hígado, pulmones y riñones. Los quistes tisulares son el estado final del ciclo de vida en el hospedero intermediario [26].

En caso de que este sea ingerido por su hospedero definitivo el bradizoito inicia otra fase asexual en la cual se presentarán cinco diferentes morfologías [26] donde la proliferación que inicia consiste en una multiplicación por endodiogenia seguido por repetidas endopoligenias en células epiteliales del intestino delgado culminando con la fase asexual para iniciar su fase sexual.

La formación de gagamia y oocistis también tiene lugar en el epitelio del intestino delgado; oocistis esporulados son liberados dentro del lumen del intestino pasando junto con las heces al ambiente, tardando alrededor de un promedio de 10 días en ser liberados, este lapso de tiempo varía de acuerdo al estadio que fue ingerido una vez en el exterior se produce la esporogonia la cual conduce al desarrollo de ooquistes infecciosos que contienen dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos [26] (Figura 5).

Estos tres estados (taquizoito, bradizoito y esporozoito) son infecciosos tanto para el hospedero intermediario como para el definitivo, este puede ser adquirido por 1) la ingestión oral de un oocistis infeccioso del ambiente, 2) la ingestión de un quiste tisular contenido en carne cruda o mal cocida y 3) por transmisión transplacentaria de taquizoitos [23].

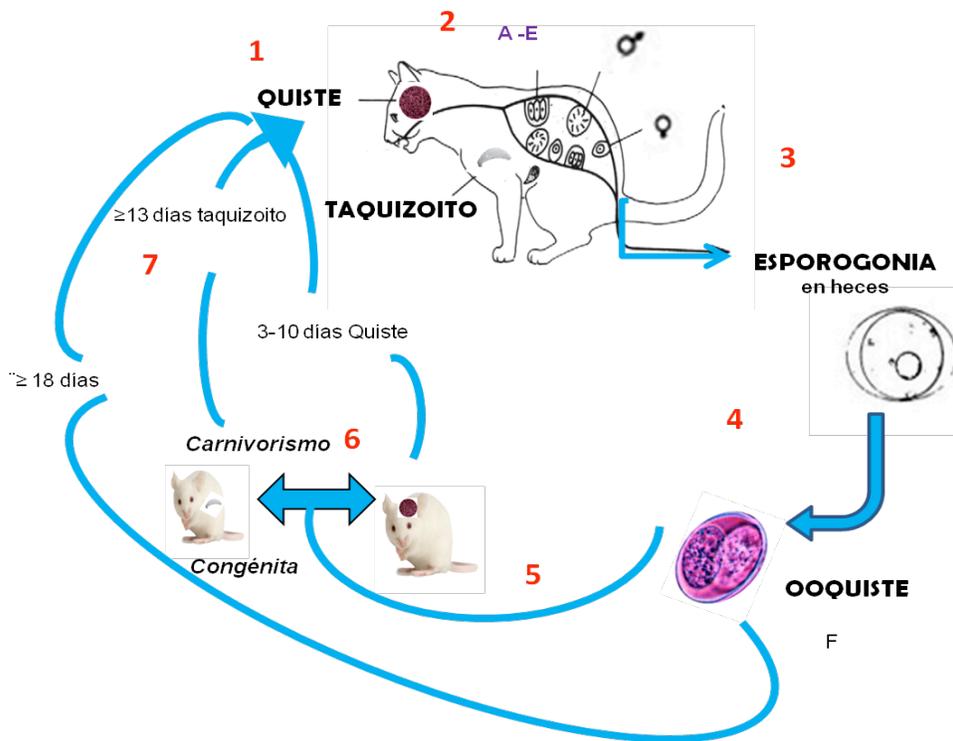


Fig. 5 Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. 1) El gato (hospedero definitivo) se infecta al consumir presas infectadas 2) dentro de él se presenta la reproducción sexual del parásito y la fase entérica A-E 3) del que se obtiene las esporogonias que son liberadas en las heces del felino, 4) para posteriormente convertirse en un ooquiste esporulado 5) que al ser ingerido por otro animal (ratón) este se convierte en su hospedero intermedio 6) transmitiéndolo a otros individuos por carnivorismo o vía congénita 7) en el cual de 3-10 días se encuentra como quiste sobretodo en el cerebro y en un tiempo menor de 13 días se encuentra como taquizoito y en un tiempo mayor a 18 días como ooquiste.

Tiempo post alimentación	Etapas de Desarrollo
0.5 -4 Horas	Alimentados con oocistos Desenquiste de esporozoitos, penetran en enterocitos Parasitemia
6-12 Horas	Esporozoitos se convierten a taquizoitos Se divide en dos, en las células intestinales de la lámina propia
≥ 2 Días	Enterocitos y otras células parasitadas por taquizoitos
6 Días	Parasitemia en cerebro
7 Días	Formación de bradizoitos

Tabla 1. Propuesta de desarrollo de ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* en tejido de ratón alimentado con oocistos. Extraído de Dubey, J, P, 1998, Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*, International Journal for Parasitology 28: 1019-1024

Tiempo post alimentación	Etapas de Desarrollo
	Quiste tisular / Alimentados con bradizoitos
2 Horas	Penetra en enterocitos Entra en las células intestinales de la lamina propia
18 Horas	División Taquizoitos
24 Horas	Parasitemia
≥ 4 Días	Invasión en pulmones, cerebro y otros órganos
≥ 6 Días	Quistes tisulares / Bradizoitos

Tabla 2. Propuesta de desarrollo de ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* en tejido de ratón alimentado con bradizoito/ quiste tisular. Extraído de Dubey, J, P, 1998, Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*, International Journal for Parasitology 28: 1019-1024.

1.8. Respuesta Inmune a *T. gondii*

La inhibición de la replicación o destrucción de *T. gondii* es resultado de varios mecanismos: a) mecanismo oxidativo, b) mecanismos no oxidativos representados principalmente por la producción de óxido de nítrico (ON) por macrófagos activados por IFN- γ , también involucrados durante la fase crónica para inhibir la proliferación parasitaria intracerebral c) mecanismos no dependientes de oxígeno, pueden ser toxoplásmicidas tales como los inducidos por IFN- γ de índole amina 2-3 dioxigenasa, el cual degrada el triptofano requerido para el crecimiento del parásito [35].

La respuesta inmune contra *Toxoplasma* se genera en dos momentos distintos; en una infección aguda cuando se ha iniciado la infección en el hospedero caracterizándose por una fuerte polarización hacia una respuesta Th1 [36] y reactivándose la infección después de que los parásitos se liberan de los quistes [24].

Cuando ocurre la respuesta temprana no específica las plaquetas también pueden aparecer siendo capaces de exacerbar la actividad citotóxica contra *T. gondii* independientemente de los anticuerpos específicos. Los neutrófilos y muy probablemente los eosinófilos y mastocitos intervienen rápidamente en el sitio de infección y son envueltos en una sobre respuesta inmune temprana no específica vía IL-12 y la producción de varios factores proinflamatorios [35, 22].

La primera defensa que se presenta durante una fase temprana de la infección es mediada por macrófago y células NK [30].

El control de la infección es mediada por células T y una fuerte respuesta inflamatoria en la cual IL-12 depende de IFN- γ , este juega un papel central y crucial [21, 32]. De igual modo se sabe que los Linfocitos T citotóxicos, CD4+ y CD8+ actúan de forma sinérgica en la respuesta inmune contra la infección de *T. gondii* [25, 35] [30].

Durante la infección por *T. gondii* la IL-12 es crucial para la inducción de una eficiente respuesta inmune [37], la cual resulta en diferenciación y expansión clonal de células T de tipo Th1 favorecidas por los macrófagos, neutrófilos y especialmente células dendríticas (DCs) [30], cuando presentan los antígenos a

las células CD4+ y CD8+, por ejemplo las DCs probablemente favorecen la producción del IFN- γ por las células NK, al ser éstas inductoras inducir la producción de IL-12 en macrófagos, mejorando aún más la producción de IFN- γ por las células NK. Esta producción del IFN- γ se amplifica mas por la inducción del TNF- α en macrófagos [31].

Sin embargo, el control de la infección de *T. gondii* durante la enfermedad aguda tiende a ser un delicado equilibrio entre la producción de citocinas proinflamatorias para controlar el crecimiento del parásito y la producción simultánea de citoquinas antiinflamatorias para limitar la patología del hospedero [31] (Figura 6).

Las citocinas proinflamatorias que comprenden la respuesta innata también influyen la generación de una respuesta protectora adaptativa de tipo 1 [31]. La respuesta Th1 se asocia con altos niveles de, TNF- α , ON, IFN- γ , IL-2 e IL-12, los cuales proveen de una importante protección contra infecciones causadas por parásitos intracelulares obligados [25] además de ser cruciales para una completa expresión de mecanismos efectores de la RI que limiten el crecimiento y propagación del parásito [21].

La activación de las células NK que se producen al principio de la infección son rápidamente reguladas por la actividad de citocinas reguladoras como IL-10 y de TGF- β inhibiendo directamente la producción de IFN- γ por las células NK [31], mientras que IL-10 cumple un doble papel en la supresión de las células de la respuesta inmune del hospedero, inhabilitando la producción de IFN- γ posiblemente la proliferación de linfocitos T, antagonizando el desarrollo de una respuesta inmune protectora Th1 y desactivando los macrófagos, disminuyendo el IFN- γ inducido por la actividad toxoplásmica facilitando la supervivencia del parásito.

El ON, además de considerarse toxoplásmica, también promueve la transformación de taquizoitos a bradizoitos por la inhibición de la respiración mitocondrial, se ha identificado por tener un importante papel regulador en la caquexia, disminución en los daños de tejidos y muerte temprana durante la infección con *T. gondii*, inhibiendo la producción de IL-2, IFN- γ e inducir linfocitos hiporeactivos 7 días después de la infección [31].

En sujetos en los que predomina la respuesta Th2, no se bloquea la replicación parasitaria. La patogenia de la enfermedad se asocia a una replicación no limitada y a una continúa destrucción de células parasitadas.

Los astrositos, un subconjunto de células glial dominantes en el SNC, también pueden ser importantes en la resistencia contra la infección [25].

Los fagocitos mononucleares son un importante mediador en la defensa del hospedero contra un número de protozoos parásitos intracelulares, los fagocitos con una actividad significativa contra *T. gondii* ha demostrado contener gránulos de peroxidasa y posee la capacidad de generar una explosión vigorosa respiratoria además IFN- γ ha demostrado que activan el metabolismo oxidativo de los macrófagos humanos y la actividad antimicrobiana [25].

El papel de los anticuerpos y el complemento en la eliminación de *T. gondii* sigue siendo incierto, aunque la combinación puede matar trofozoitos extracelulares. Mientras que la respuesta humoral para la infección incluye la producción de IgA, IgM, IgG y los anticuerpos IgE, la respuesta inmune celular parece mucho más importante para el desarrollo de una inmunidad protectora [25].

Generalmente la inmunidad hacia la infección se encuentra durante toda la vida, manteniendo al parásito en latencia por una respuesta adaptativa de tipo 1 de células T [31]. Sin embargo, la respuesta inmune inflamatoria inducida por taquizoitos puede causar inmunidad mediada por la destrucción de tejidos. Por lo tanto un subsecuente balance entre la inducción y la evasión de la respuesta inmune es crucial para el establecimiento de una infección crónica de *T. gondii* [24].

expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II), lo que puede contribuir a la supervivencia intracelular y establecimiento de una infección persistente [37].

Cuando el parásito ha infectado a macrófagos favorece una sobre expresión de SOCS-1, SOCS-3 o CIS esto, condiciona a los macrófagos para que no produzcan NO, lo que limitaría el crecimiento de los parásitos en respuesta de IFN- γ [24].

1.10. Coinfecciones

Las infecciones por helmintos presentan una distribución cosmopolita además son una de las infecciones parasitarias mas comunes [38] por lo que no es raro que los helmintos puedan presentarse conviviendo con uno o mas parásitos (intra o extracelulares) por lo que se han realizado diversas investigaciones donde se ha estudiado la influencia que ejerce una primera infección a una segunda infección no relacionada.

En el 2008 un estudio en ratones demostró que una infección crónica de *Trichuris muris* los hacía más susceptibles a una segunda infección con *Schistosoma mansoni* [38]. También se han realizado estudios de coinfecciones de helmintos con bacterias como *Heligmosomoides polygyrus* – *Citrobacter rodentium*, demostrando una mayor susceptibilidad y aumento en la mortalidad [39].

Este tipo de coinfecciones no ha sido la únicas estudiadas, se ha observado que cuando la infección primaria por el helminto *T. crassiceps* está presente de manera crónica en ratones experimentales, una segunda infección por el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi* se ve modificada la respuesta inmune hacia este segundo parásito incrementando la susceptibilidad y mortalidad del hospedero [40].

Las infecciones con helmintos han mostrado tener efectos directos e indirectos en la malaria y el VIH/ SIDA en países en desarrollo, sobre todo en África y en otros lugares en donde la helmintiasis es frecuentemente co-endémica con la malaria y el VIH/ SIDA. Estas pueden presentar efectos tales como anemias severas así como efectos sinérgicos tales como el incremento en la transmisión de la malaria [10], un estudio en Senegal concluyo que la infección de *Ascaris* estaba asociada

con el incremento y prevalecía de la malaria mientras que en Tailandia mostraba protección contra la malaria cerebral o la insuficiencia renal [41].

De igual manera, existen estudios en donde se ha observado que las coinfecciones de helmintos con *Plasmodium sp*, modifica la carga parasitaria de *Plasmodium sp* pero este fenómeno depende de la especie del helminto utilizado así como de la intensidad y duración de la infección del gusano, y edad del hospedero [9].

Es posible que los helmintos al ser capaces de persistir en el huésped por largo tiempo, puedan dar lugar a interacciones con los mecanismos inflamatorios e inmunológicos involucrados en la resistencia a otras infecciones, modificar la eficacia de vacunas o intervenir en alergias y enfermedades autoinmunes [9].

Sin embargo parásitos intracelulares también son capaces de alterar la respuesta inmune contra los helmintos, como es la infección con *T. gondii* la cual reduce la infección de *S. mansoni* [42] y de *Faciola hepática* [28] y disminuye la respuesta Th2 inducida por la infección de *Nippostrongylus brasiliensis*. [43], y aumenta la tasa de mortalidad de ratones coinfectados con *Heligmosomoides polygyrus* [44]. Otro estudio demostró que la infección por *T. gondii* redujo el desarrollo de alergias en vías respiratorias [36].

2. JUSTIFICACIÓN. Se sabe que en las primeras semanas de la infección murina con el cisticerco de *T. crassiceps* se desarrolla una respuesta tipo Th1, y que conforme la infección se vuelve crónica se da una respuesta tipo Th2 aprovechando esta condición, se averiguó si la condición inicial de Th1 ó crónica Th2 generada por la infección de *T. crassiceps* puede afectar el curso de la infección por *T. gondii*.

Se utilizó el modelo de infección de *T. crassiceps* en sustitución de *T. solium* por las ventajas de las cuales este dispone, como el poder mantenerlo fácilmente por pases intraperitoneales de una ratón a otro, así como el hecho de ser menos nocivo en la salud de los seres humanos, además de contar con una gran similitud antigénica con *T. solium*.

3. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el curso de la infección con *T. gondii* en un modelo de coinfección con *T. crassiceps*.

3.1. Objetivos Particulares:

- 1) Definir en ratones BALB/c si la infección inicial por *T. crassiceps*, caracterizada por una respuesta tipo Th1, afecta la susceptibilidad a una infección posterior por un parásito intracelular como *T. gondii*.
- 2) Definir en ratones BALB/c si la infección crónica por *T. crassiceps*, caracterizada por una respuesta tipo Th2, afecta la susceptibilidad a *T. gondii*.
- 3) Determinar el perfil de citocinas generado en el hospedero durante la coinfección de *T. crassiceps* con *T. gondii*.

Determinar en ratones BALB/c si la presencia de *T. crassiceps* influye en la permeabilidad hematoencefálica y si es condición propicia para un mayor enquistamiento de *T. gondii* en el sistema nervioso central.

4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

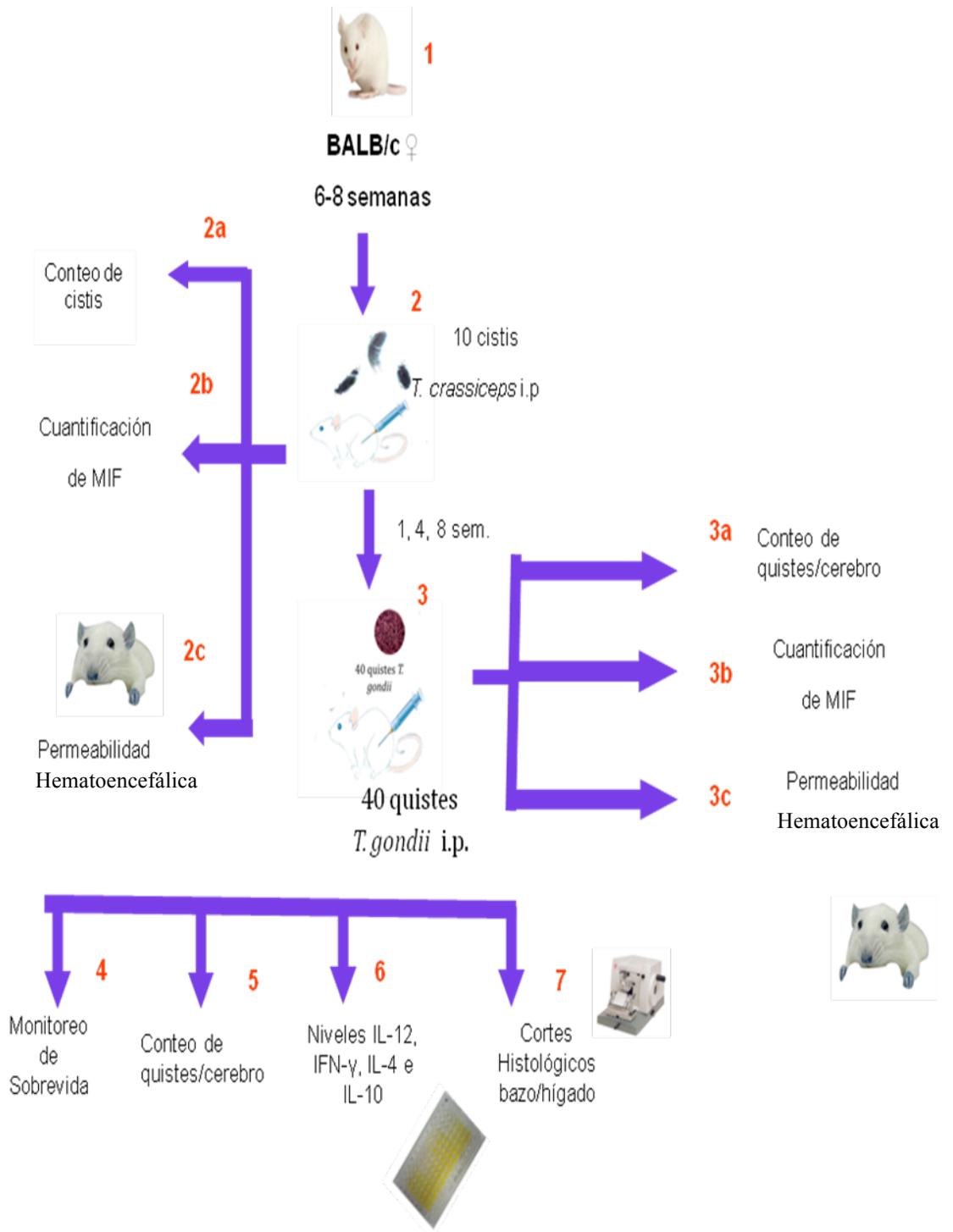


Fig. 7 Plan de trabajo

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Animales. Se utilizaron ratones BALB/c hembras con edades de 6-8 semanas, los cuales se mantuvieron bajo condiciones estándares en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. El fondo genético BALB/c ha sido reportado como susceptible a la infección por *T. crassiceps* y como resistente a la infección por *T. gondii*, de ahí su importancia de usar esta cepa de ratones para determinar si la coinfección con *T. crassiceps* hace susceptible a esta cepa de animales.

5.2. Parásitos. Se empleó el modelo experimental murino del cisticerco de *T. crassiceps*, cepa ORF (crecimiento rápido), los cuales fueron mantenidos en ratones BALB/c por subsecuentes pasajes intraperitoneales (i.p.). Para la infección los cisticercos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal del ratón y lavados cuatro veces en PBS y seleccionados para inocularlos en los ratones (2 mm. de diámetro, sin gemas). Para la infección por *T. gondii*, se emplearon quistes de la cepa semi-virulenta ME49 de *T. gondii* (donada por el Dr. Rafael Saavedra, IIB-UNAM) obtenidos de homogenizado de cerebro de ratones C57BL/6 previamente infectados crónicamente y suspendidos en solución salina.

5.3. Infección y co-infección con *T. crassiceps*–*T. gondii*. Los ratones fueron inoculados con diez cisticercos de *T. crassiceps* por vía i.p. con una jeringa de 1 ml para insulina y usando como vehículo 0.3-0.4 ml de PBS. Después de una, cuatro y ocho semanas de infección, estos mismos animales fueron coinfectados vía i.p. con cuarenta quistes de la cepa ME49 de *T. gondii*.

Colateralmente a los grupos de animales coinfectados, como controles se usaron ratones sanos de la misma edad y mantenidos en las mismas condiciones del bioterio.

5.4. Sobrevida. El monitoreo de la sobrevida de los ratones coinfectados *T. crassiceps*-*T. gondii*, se llevó a cabo diariamente durante 40 días posteriores a la coinfección.

5.5. Obtención de suero. Los ratones fueron sangrados en diferentes tiempos post-coinfección. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts (Phillips),

para inducir dilatación en la vena caudal. Con un bisturí se hizo un corte y se obtuvieron de 500 a 700 µl de sangre en tubos eppendorf. Los tubos fueron mantenidos a baja temperatura hasta la formación de coagulos para su centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm. Se obtuvo el suero en tubos nuevos y debidamente etiquetados. Las muestras se mantuvieron a -20° C hasta su uso para la determinación de citocinas.

5.6. Quistes de *T. gondii* en Cerebro. El cerebro de los ratones muertos en diferentes tiempos post-coinfección fueron macerados y mantenidos en 2 ml. de solución salina de los cuales se tomaron 10 µl para identificación y conteo de quistes al microscopio de luz realizándose tres repeticiones.

5.7. Determinación de Permeabilidad Hematoencefálica. Para evaluar la permeabilidad hematoencefálica en ratones infectados con *T. crassiceps* y *T. gondii* se inyectaron 250 µl de Azul de Evans (Hycel de México) al 1% por cada 30 gramos de peso corporal vía intravenosa. Los animales fueron sacrificados trascurridos 120 min, se obtuvieron los cerebros que fueron conservados en una solución de 1400 µl de Acetona - 600 µl de PBS por un lapso de 24 h. El sobrenadante se leyó en el espectrofotómetro Bio Mate 3 a una longitud de 620 nm.

5.8. Determinación de citocinas en suero IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 y MIF. Estas citocinas fueron evaluadas en el suero de los ratones a diferentes tiempos de la coinfección y en ratones con una sola infección por medio de la técnica de ELISA tipo Sandwich y de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (Peprotech México). Las placas de 96 pozos (High binding, Costar) fueron sensibilizadas con 100 µl por pozo del anticuerpo de captura (purified antimouse IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-10 y MIF) diluido en PBS a una concentración de 1 µg/ml. Se cubrió la placa y se dejó incubar toda la noche a 4° C. Pasada la incubación la placa se lavó tres veces usando un buffer de lavado PBS-Tween 0.05% (PBS-T). Posteriormente la placa fue secada, se bloqueo la placa con 300 µl de buffer de bloqueo PBS-BSA 1% (200 µl por pozo) y se dejó incubar al menos por una hora a temperatura ambiente. Después se lavó la placa cuatro veces con PBS-T y se procedió a hacer la curva de citocina recombinante murina por duplicado en los primeros pozos de

la placa. La curva se realizó a una concentración de 12500 ng/ml y se realizaron diluciones a la mitad, hasta el pozo 11 y en el último pozo sólo se agregó PBS-BSA 1%. A los pozos restantes se agregaron por duplicado 50 µl de las muestras de los sueros. Se incubaron toda la noche a 4° C. Posteriormente se lavó la placa cuatro veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo biotinilado diluido en PBS-BSA a una concentración de 0.5 µg/ml, y se agregó 100 µl por pozo. Se dejó incubado a temperatura ambiente por dos horas. Trascorrida la incubación la placa se lavó cinco veces con PBS-T, y se agregó a cada pozo 100 µl de avidina peroxidada diluida 1:2000 en PBS-BSA 1% y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Se lavó la placa seis veces con PBS-T y se añadió a cada placa 10 ml de ABTS y 100 µl de H₂O₂ al 3% y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente y se procedió a leer la placa en un lector de ELISA (Thermo LabSystems) a 405 nm. Los datos arrojados por el lector de ELISA fueron procesados por el software Multiskan Ascent y evaluados en el software de GraphPad Prism 5.0.

5.9. Cortes Histológicos. Se realizaron cortes histológicos de bazo e hígado, los cuales fueron conservados en paraformaldehído al 4% hasta su procesamiento en el tren de alcoholes; estos cortes fueron en serie en un micrótopo de rotación LEICA modelo RM 2125RT a 5 micras de grosor para cada uno de los tejidos. Los cortes se extendieron en un portaobjetos con Ruyter usando una parrilla LEICA modelo HI 1220 a 45° C, dejándose en una incubadora Felisa R a una temperatura de 60° C por 24 hrs.

Tinción: Una vez secados los cortes histológicos, el proceso de tinción para la técnica histológica clásica de Hematoxilina-Eosina de Harris (HE), se realizó, sumergiendo los cortes en una serie de soluciones y colorantes (ver Apéndice).

5.10. Análisis estadístico. Las comparaciones entre los diferentes grupos considerados en el presente trabajo se llevaron a cabo mediante la prueba de *t*-Student (GraphPad Prism 5.0). Se consideraron significativas las comparaciones con valores de $p < 0.05$

6. RESULTADOS

6.1. Carga Parasitaria de *Taenia crassiceps*.

Con la finalidad de establecer los puntos críticos de la infección de *T. crassiceps* para llevar a cabo la co-infección con *T. gondii*, se determinó la cinética de crecimiento de los cisticercos en la cavidad peritoneal de los ratones BALB/c infectados via i.p. con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Como se puede observar en la figura 8, desde la semana 1 post-infección hubo presencia de cisticercos (12 cist), incrementándose de manera moderada pero significativa en las semanas 2 y 4. Pero a partir de la semana 6 la replicación del cisticerco fue prácticamente exponencial de tal manera que se pudo contabilizar en promedio un total de 942 cisticercos en la semana 8 post.infección. Con esta cinética se pudo establecer los tiempos para coinfectar con *T. gondii*, en las semanas 1, 4 y 8 de infección con *T. crassiceps*, es decir cuando hubo un número reducido, un número moderado y un número alto de cisticercos en la cavidad peritoneal.

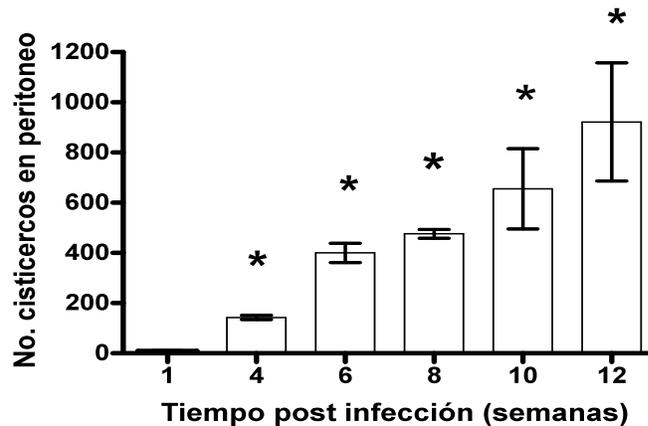


Fig. 8. Cisticercos de *T. crassiceps* en cavidad abdominal de ratones BALB/c silvestre. Los datos ilustrados representan el promedio y Error Estándar (ES). (n=4). * estadísticamente diferente con respecto a las semanas 1 y 2. $p \leq 0.05$ prueba de "Mann-Whitney test" Graph Prism 5.

6.2. Quistes de *Toxoplasma gondii*

Por otro lado, para poder establecer el impacto de la infección previa por el helminto *T. crassiceps* sobre la infección por *T. gondii*, primero se estableció el número de quistes que se pueden identificar en el cerebro de ratones previamente sanos infectados con 40 quistes de *T. gondii*. El número de quistes se incrementó proporcionalmente con relación a las semanas transcurridas después de la infección. En la semana ocho se registró el mayor número de quistes en el cerebro alcanzando un promedio de 432 ± 439 quistes/cerebro) (Fig. 9 A, B y C).

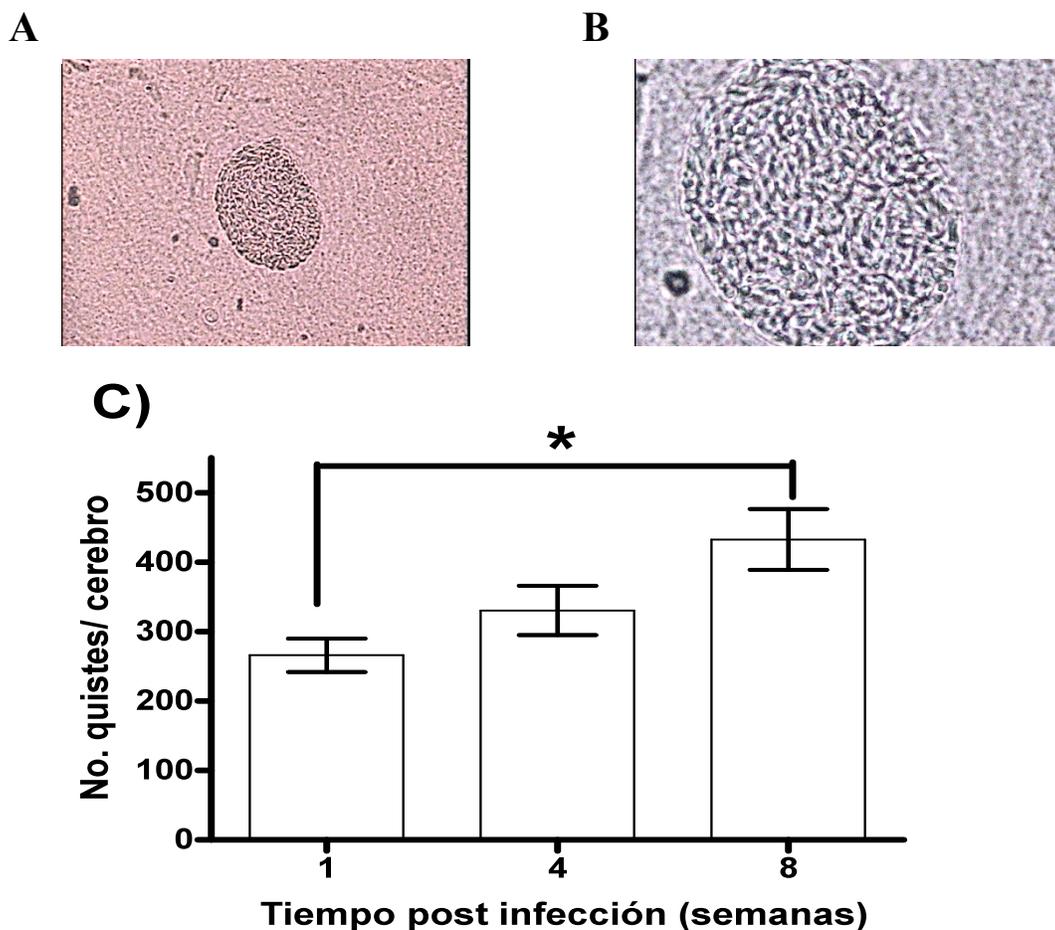


Fig. 9. Quistes de *T. gondii* en macerado de cerebro de ratones BALB/c. A) Fotografía de quiste en cerebro 40X, B) Fotografía de quiste en cerebro 100X, C) Número de quistes en cerebros macerados a la semana 1,4 y 8 post-infección. Los datos ilustrados representan el promedio y error estándar (ES) de 3 experimentos; (n=7) estadísticamente diferente $p \leq 0.05$ prueba de "Mann Whitney t" Graph Prism 5.

6.3. Sobrevida de ratones coinfectados, *T. crassiceps* –*T. gondii*

La sobrevida se monitoreo diariamente hasta el día 40 post co-infección. Como se puede observar en la figura 10, el grupo experimental infectado con *T. crassiceps* y 8 semanas después coinfectado con *T. gondii* fue el grupo que mayor porcentaje de mortalidad presentó con una sobrevida del 27.7%; mientras que el grupo experimental que se infectó únicamente con *T. gondii* fue el grupo que mayor porcentaje de sobrevida registró (75%); cabe mencionar que se observó erizamiento y postramiento clásico asociado a los primeros días de infección con *T. gondii* en los grupos experimentales infectados con *T. crassiceps* y coinfectados 1 semana después *T. gondii*. Los datos son promedio de 4 experimentos independientes (n=4).

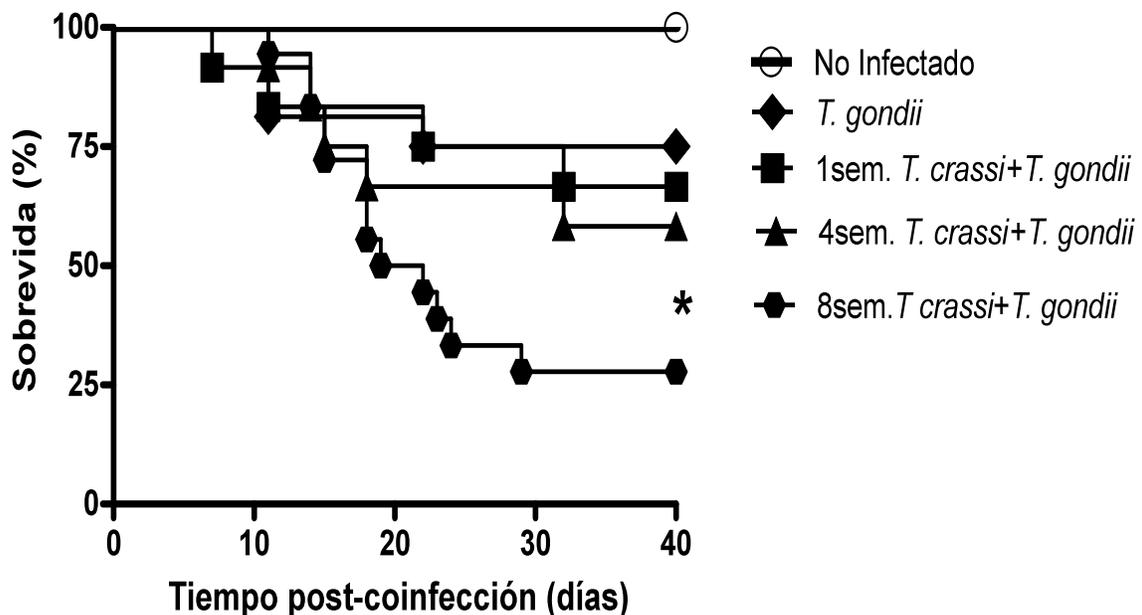


Fig. 10. Porcentaje de sobrevida de ratones BALB/c silvestres coinfectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. y 40 quistes de *T. gondii* de la cepa semi virulenta ME49 vía i.p. El gráfico es el promedio de 4 experimentos cada uno con una n=4. * estadísticamente diferente respecto a *T. gondii*, 1 wk. *T. crassiceps*-*T. gondii* y 4 wks. *T. crassiceps*-*T. gondii*. Log Rank test * 0.05

6.4. Número de quistes de *T. gondii* en la coinfección con *T. crassiceps*

Con el fin de averiguar si una infección persistente de *T. crassiceps* puede alterar el crecimiento de un segundo parásito como *T. gondii* se monitoreo el número de quistes de los diferentes grupos experimentales en el transcurso de la coinfección. En la Fig. 11 se observa que, el grupo que presentó un mayor número de quistes fue el infectado sólo con *T. gondii* encontrándose 377 quistes/cerebro y el de menor numero fue el grupo experimental con 4 semanas de *T. crassiceps*-*T. gondii* (67 quistes/cerebro). Es de mencionarse que se esperaba un mayor número de quistes en el grupo con 8 semanas de infección con *T. crassiceps* previas a la coinfección con *T. gondii* pero al ser los de mayor tasa de mortalidad solo se cuantificaron los que vivieron.

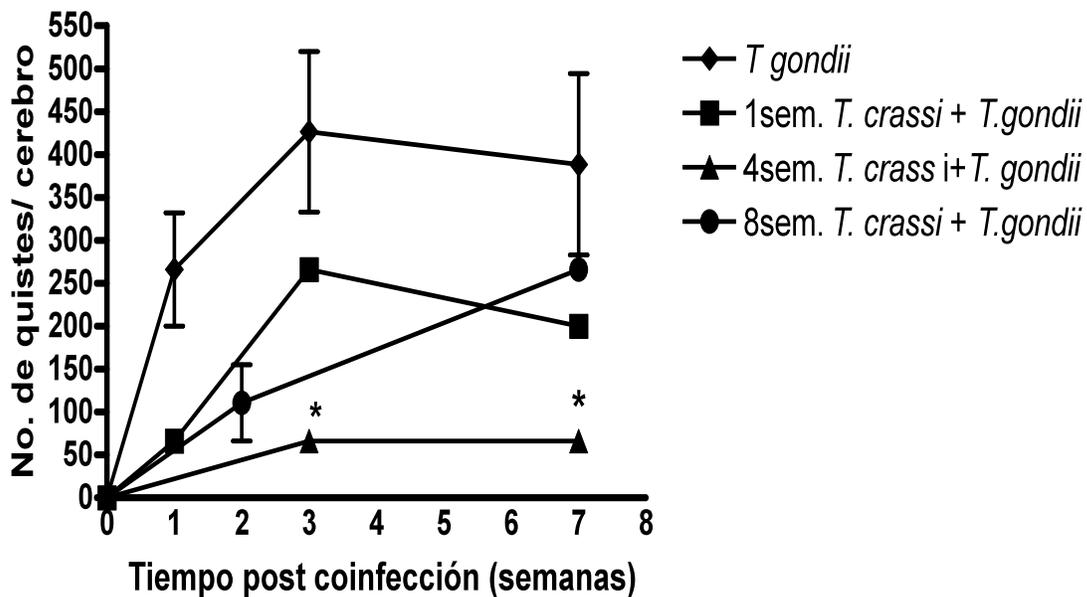


Fig. 11. Quistes de *T. gondii* en macerado de cerebro de ratones BALB/c silvestres coinfectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. y 40 quistes de *T. gondii* ME49 vía i.p. Los datos ilustrados representan el promedio y ES (n. mínima =3) * estadísticamente diferente respecto al grupo infectado únicamente con *T. gondii* $p \leq 0.05$ prueba de "Mann-Whitney test" Graph Prism 5.

6.5. Determinación de MIF en suero

6.5.1 Producción de MIF en la infección por *T. crassiceps*

La producción de MIF en suero de ratones infectados con *T. crassiceps* se midió periódicamente hasta la semana 11; siendo esta última semana la de menor producción de MIF a lo largo de toda la parasitemia y a pesar de que en ninguna de las semanas en las que se cuantificó la producción de MIF hubo diferencias estadísticamente significativas, en la semana 5 se observó la mayor producción y el incremento de MIF se presentó a partir de la semana 3 y se mantuvo hasta la semana 7 (Fig. 12).

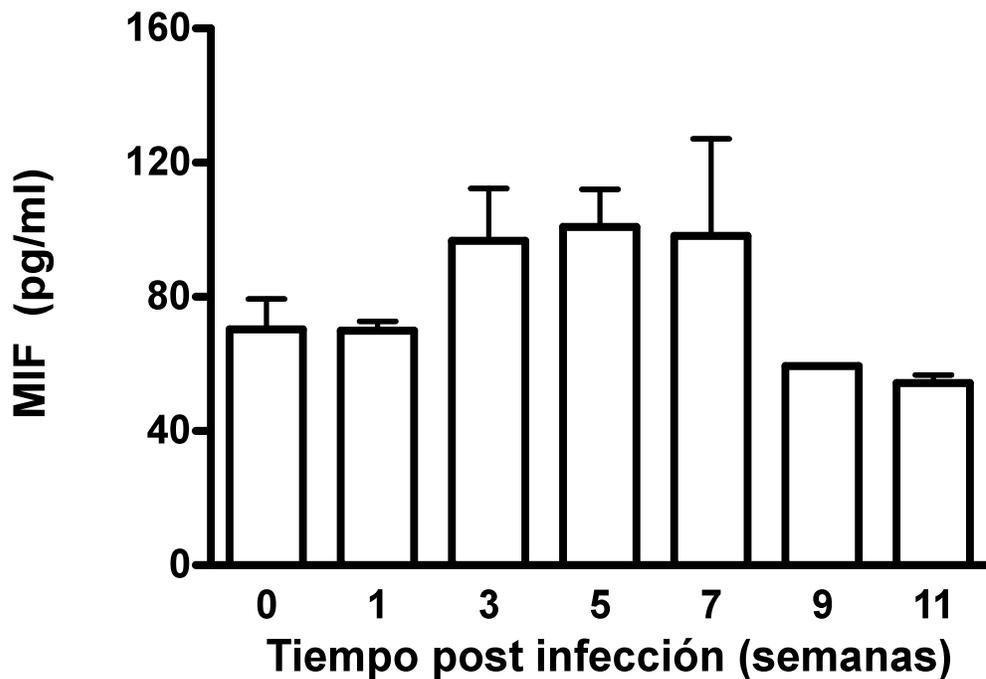


Fig. 12. Concentración de MIF en suero de ratones BALB/c silvestres infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. El análisis se realizó por medio de la técnica ELISA-Sandwich. Los datos ilustrados representan el promedio y ES (n=3) $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism 5.

6.5.2. Producción de MIF en la infección por *T. gondii*

Se observó que la producción de MIF en suero de los ratones infectados con *T. gondii* presentaron un aumento en las semanas 2 y 4, y una disminución en las semanas posteriores (Fig. 13).

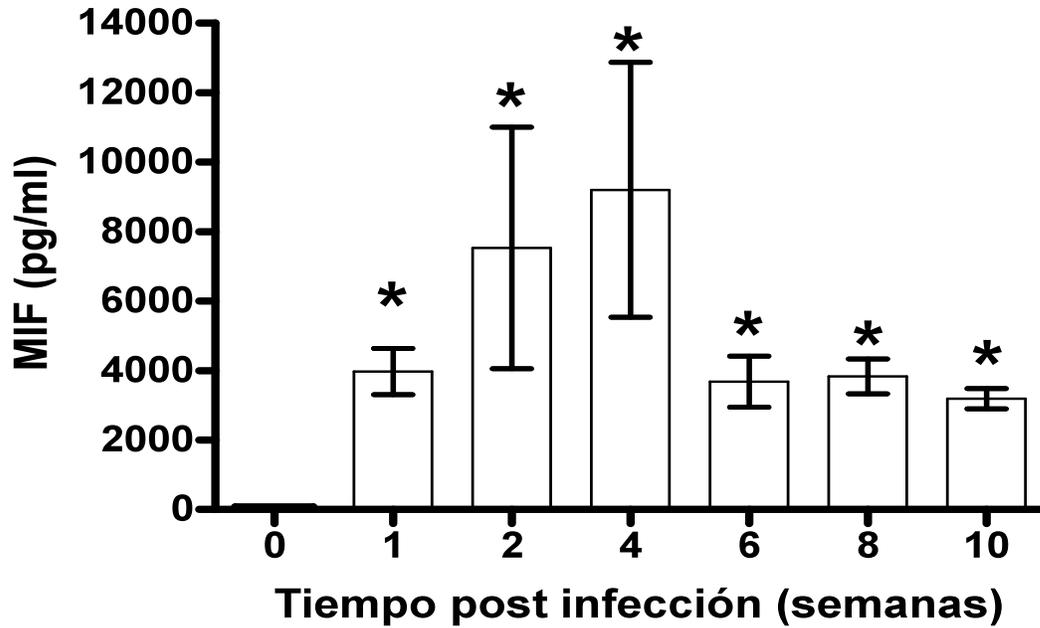


Fig. 13. Concentración de MIF en suero de ratones BALB/c infectados vía i.p. con 40 quistes de *T. gondii* ME49. El análisis se realizó por medio de la técnica ELISA-Sandwich (n=4). Los datos ilustrados representan el promedio y el ES * estadísticamente diferente respecto a la semana 0, $p \leq 0.05$ prueba de "t" de students Graph Prism 5.

6.6. Permeabilidad Hematoencefálica

Debido a que tanto *T. crassiceps* como *T. gondii* presentan tropismo por alojarse en el sistema nervioso central (cerebro), se decidió determinar la permeabilidad hematoencefálica en el transcurso de cada una de estas infecciones.

Para lo cual se les inyectó Azul de Evans al 1% vía intravenosa, obteniéndose los cerebros transcurridos 120 min. y preservándose en una solución de Acetona y PBS. El sobrenadante se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de 620 nm.

6.6.1. Permeabilidad Hematoencefálica en la infección por *T. crassiceps*

En la Fig. 14 se observa que desde la primera semana de infección hubo un incremento en la permeabilidad hematoencefálica obteniendo su mayor aumento en la semana 7

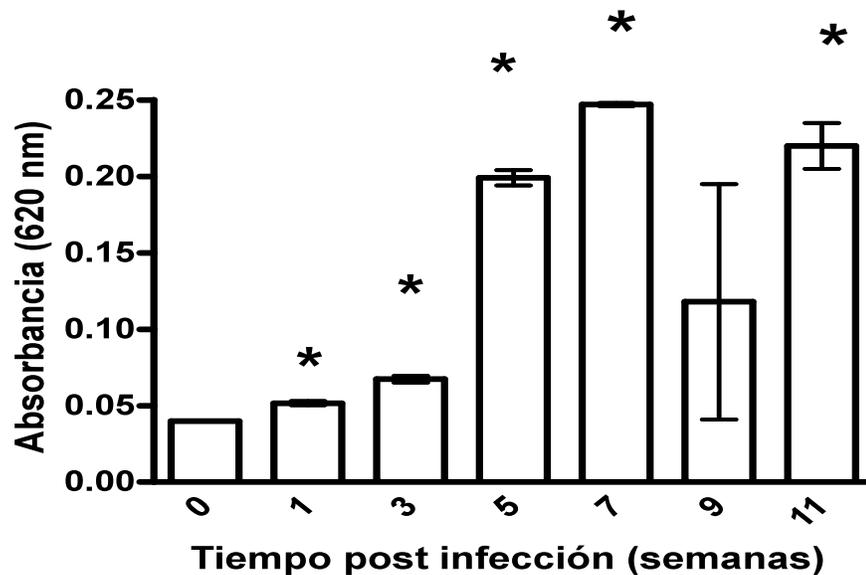


Fig. 14. Permeabilidad hematoencefálica en cerebro de ratones BALB/c infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* vía i.p. (n=3) Los datos ilustrados representan el promedio y el ES. *Estadísticamente diferente con respecto a la semana 0 $p \leq 0.05$ prueba "t" de students, Graph Prism 5.

6.6.2. Permeabilidad Hematoencefálica en *T. gondii*

Después de haber sido inoculado *T. gondii* se presentó un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en las semanas posteriores; siendo estadísticamente diferentes los ratones con una y ocho semanas post infección con *T. gondii* con respecto a los ratones no infectados (Fig. 15).

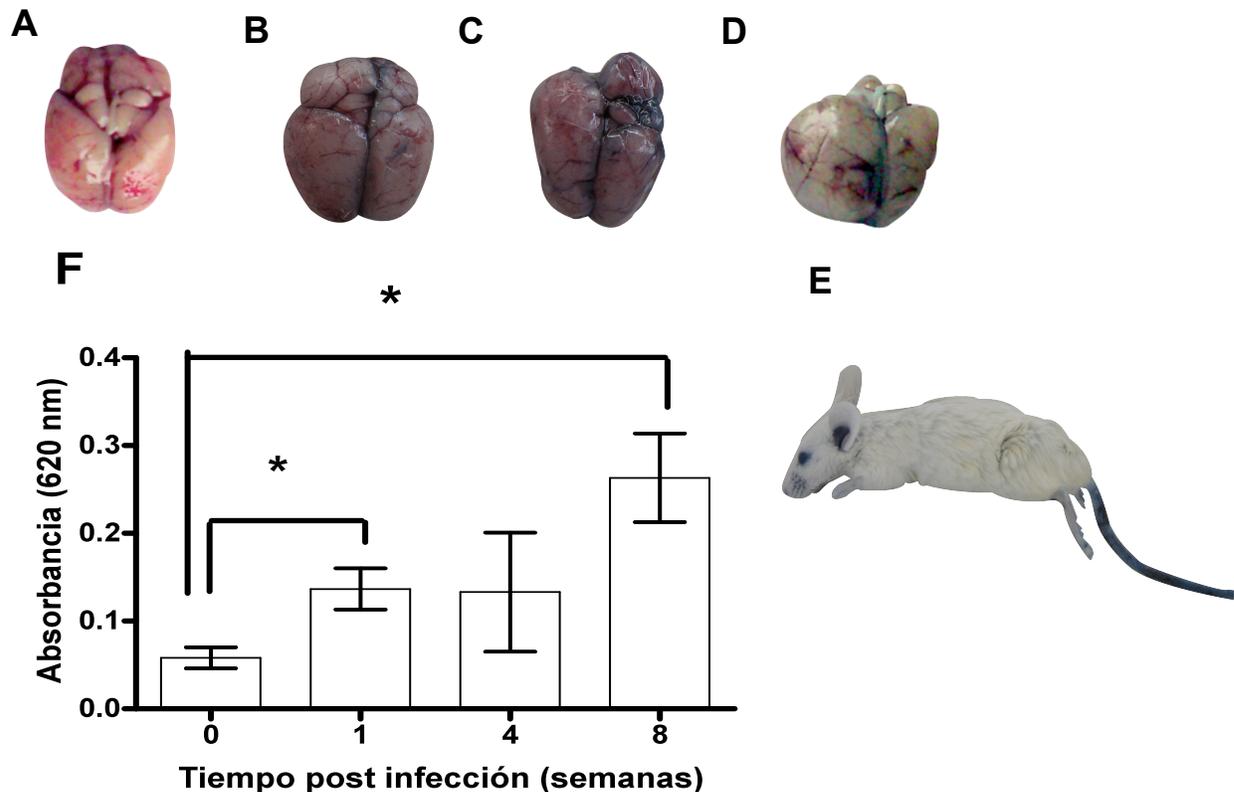


Fig. 15. Permeabilidad hematoencefálica en cerebro de ratones BALB/c infectados con 40 quistes de *T. gondii* ME49 vía i.p. Los datos ilustrados representan el promedio y ES (n=4) * estadísticamente diferente $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism5. A) Cerebro de ratón BALB/c silvestre no infectado, B) Cerebro de ratón BALB/c silvestre con 1 semana de infección con *T. gondii*, C) Cerebro de ratón BALB/c silvestre con 4 semana de infección con *T. gondii*, D) Cerebro de ratón BALB/c silvestre con 8 semana de infección con *T. gondii*, E) Ratón BALB/c silvestre tratado con azul de Evans, F) Absorbancia observada en cerebros de ratones tratados con Azul de Evans a la semana 0, 1, 4 y 8 post infección.

6.7. Producción de citocinas en la infección con *T. crassiceps*

Se sabe que la infección con helmintos pueden sesgar a la producción de citocinas no relacionadas hacia un perfil Th2; con el fin de investigar si esta capacidad también se presenta en una infección con *T. crassiceps* se analizó la secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias mediante la técnica de ELISA.

6.7.1. Citocinas Pro inflamatorias

Mientras la infección progresa, la respuesta Th1 inicial se reguló negativamente. Al mismo tiempo se observó un incremento paulatino de la respuesta de tipo Th2, como se aprecia en la fig. 16 en donde la producción de IL-12 e IFN- γ disminuyó paulatinamente (Fig. 16 A y B, respectivamente). Estos datos demuestran que la producción de éstas citocinas, características de una respuesta tipo Th1 fueron significativamente inhibidas conforme la infección con *T. crassiceps* progresó.

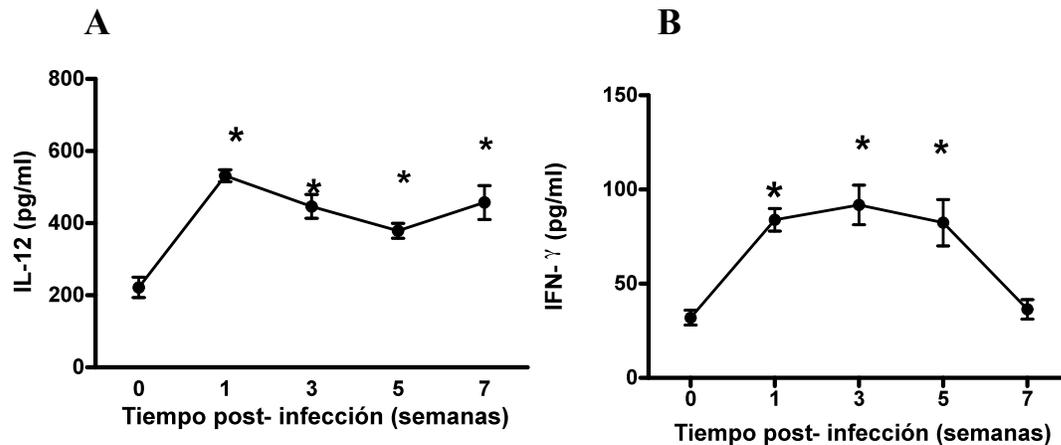


Fig. 16 Concentraciones de citocinas proinflamatorias en suero de ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps*. A) Concentración de IL-12 en suero; B) Concentración de IFN- γ en suero. El análisis se realizó por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados representados y ES de 4 experimentos con resultados muy similares * estadísticamente diferente con respecto a semana 0; $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism 5.

6.7.2. Citocinas Anti inflamatorias

La infección por *T. crassiceps* indujo una fuerte polarización hacia las citocinas Th2, como lo muestra el incremento en la producción de IL-4 e IL-10, la cual es conocida por ser una de las citocinas que polarizan la respuesta hacia un perfil Th2; se presentó este incremento desde la semana 1 p.i. (Fig. 17 A y B respectivamente).

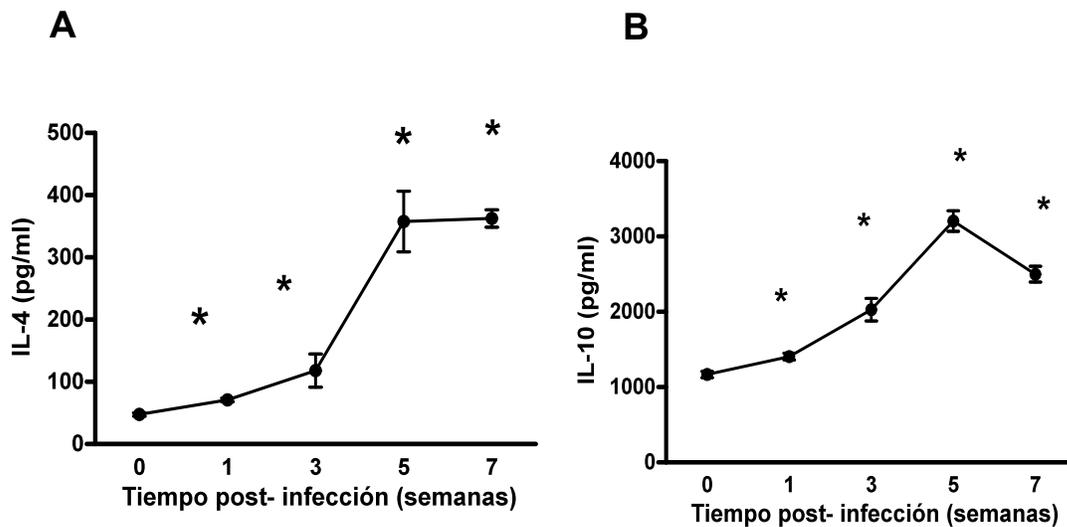


Fig. 17 Concentraciones de citocinas antiinflamatorias en suero de ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps*. A) Producción de IL-4: B) Producción de IL-10. El análisis se realizó por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados representados y ES de 4 experimentos con resultados muy similares * estadísticamente diferente con respecto a semana 0. $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism 5.

6.8. Producción de citocinas durante la coinfección *T. crassiceps*-*T. gondii*

Se ha indicado que el incremento de la producción de citocinas Th2 causada por una infección previa con helmintos ocasiona una regulación de la respuesta de tipo Th1. Para examinar el impacto de *T. crassiceps* en la respuesta del hospedero sobre la coinfección con *T. gondii*, se monitoreo la producción de citocinas en suero a las semanas 1, 2, 3 y 5 post coinfección comparando a los animales individuales y coinfectados durante el curso del experimento.

6.8.1. Citocinas Pro-inflamatorias

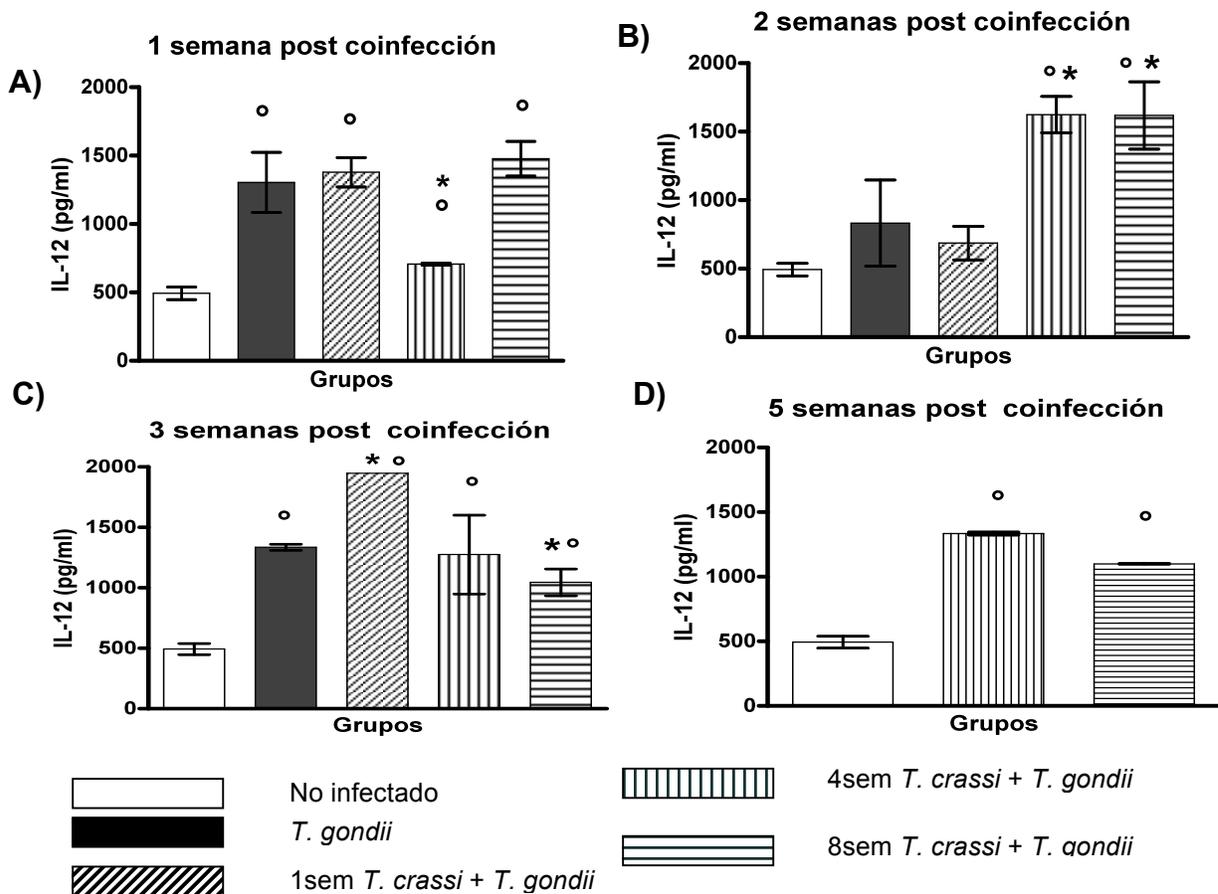


Fig. 18 Concentración de IL-12 en suero de ratones BALB/c coinfectados con *T. gondii*. El análisis se realizó por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados representados y ES de 4 experimentos con resultados muy similares. ° Estadísticamente diferente con respecto al control, * Estadísticamente diferente con respecto al grupo infectado con *T. gondii* $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism5. Determinación a la semana 1(A), 2 (B), 3 (C) y 5 (D) después de la coinfección *T. crassiceps* + *T. gondii*.

Los análisis en el suero de los niveles de IL-12 muestran que a la semana 1, después de haber sido coinfectados con *T. gondii* todos los grupos experimentales aumentaron la producción de esta citocina (Fig. 18 A). En lo que se refiere a los dos grupos con coinfecciones tardías (4 y 8 semanas con *T. crassiceps* + *T. gondii*) se mantuvieron constante en la producción de esta citocina durante el transcurso de toda la coinfección, mientras que en el grupo de coinfección temprana (1sem *T. crassiceps* + *T. gondii*) fluctuar en la producción de la misma, con una disminución (Fig. 18 B) para una recuperación en las semanas siguientes (Fig. 18 C-D).

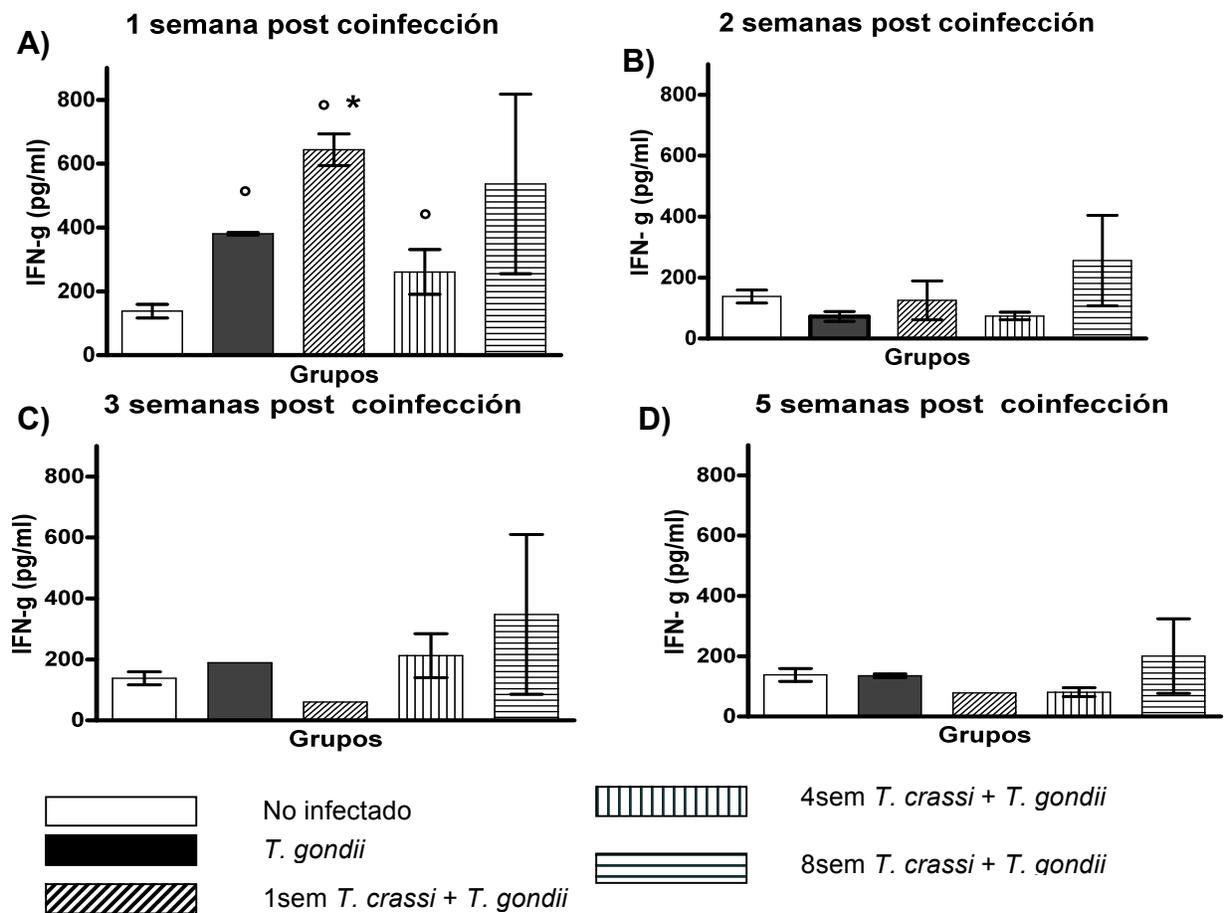


Fig. 19 Secreción de IFN- γ en suero de ratones BALB/c coinfectados con *T. gondii*. El análisis se realizó por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados representados y ES de 4 experimentos con resultados muy similares. ° Estadísticamente diferente con respecto al control, * Estadísticamente diferente con respecto al grupo infectado con *T. gondii* $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism 5. Determinación a la semana 1(A), 2 (B), 3 (C) y 5 (D) después de la coinfección *T. crassiceps* + *T. gondii*.

En la producción de IFN- γ en suero de animales coinfectado con *T. gondii* a sólo una semana después de haber sido infectados con *T. crassiceps* presenta aumento en la producción mientras que en los demás grupos es menor (Fig. 19 A), pero a medida que la infección con *T. gondii* va progresando, cada grupo experimental presenta fluctuaciones en la secreción de IFN- γ (Fig. 19 B-C- D) el cual se ha visto que juega un papel primordial en la eliminación de *T. gondii*.

6.8.2. Citocinas Anti inflamatorias

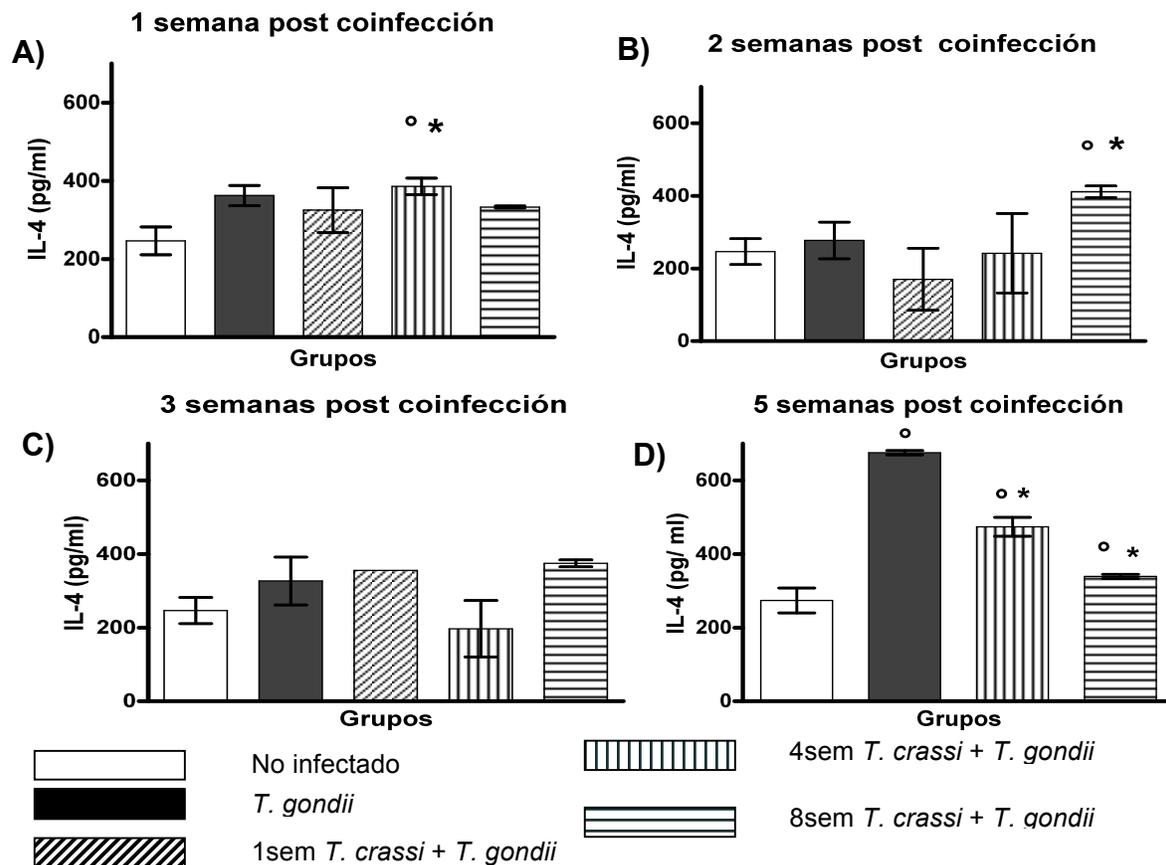


Fig. 20 Producción de IL-4 en suero de ratones BALB/c coinfectados con *T. gondii*. El análisis se realizó por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados representados y ES de 4 experimentos con resultados muy similares. ° Estadísticamente diferente con respecto al control, * Estadísticamente diferente con respecto al grupo infectado con *T. gondii* $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism 5. Determinación a la semana 1(A), 2 (B), 3 (C) y 5 (D) después de la coinfección *T. crassiceps* + *T. gondii*.

Los resultados (Fig. 20) muestran que al haber una segunda infección con *T. gondii* no afecta la producción en los niveles de IL-4 en un periodo de tiempo corto (Fig. 20 A-B-C); al haber transcurrido 5 semanas con la coinfección parece incrementar moderadamente en todos los grupos experimentales resaltando el infectado únicamente con *T. gondii* (Fig. 20 D).

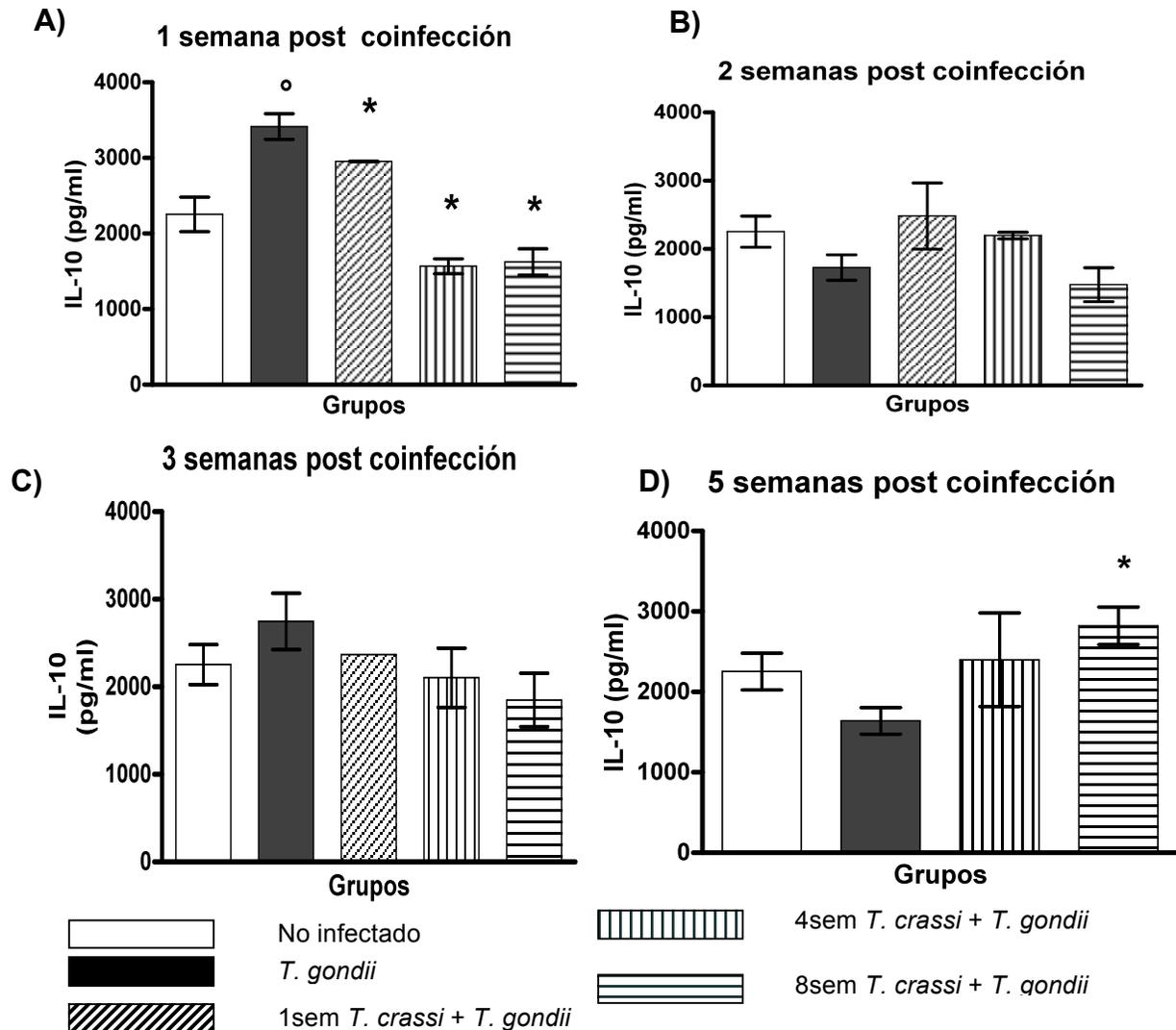


Fig. 21 Producción de IL-10 en suero de ratones BALB/c coinfectados con *T. gondii*. El análisis se realizó por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Los resultados representados y ES de 4 experimentos con resultados muy similares. ° Estadísticamente diferente con respecto al control, * Estadísticamente diferente con respecto al grupo infectado con *T. gondii* $p \leq 0.05$ prueba de "t" Graph Prism 5. Determinación a la semana 1(A), 2 (B), 3 (C) y 5 (D) después de la coinfección *T. crassiceps* + *T. gondii*.

Durante la semana 1 post coinfección con *T. gondii* se genera un leve aumento en la producción de esta citocina en los grupos de 1sem. con *T. crassiceps-T. gondii* y una disminución en los de 4 y 8 sem. con *T. crassiceps-T. gondii* (Fig. 21 A), para posteriormente pasar por un periodo de mantenimiento en su producción (Fig. 21 B-C).

Su comportamiento cambia en la semana 5 donde se muestra que la coinfección con *T. gondii* generan una alta producción de IL-10, siendo mínimo en ratones sanos e infectados sólo con *T. gondii* sugiriendo que la infección de *T. crassiceps* influyó el desarrollo de una respuesta inmune (Fig. 21 D).

6.9. Cortes Histológicos

Con el fin de conocer si la coinfección se había propagado a otros tejidos dentro del cuerpo y qué daños había causado, se realizaron cortes histológicos de bazo e hígado de los diferentes grupos experimentales.

6.9.1. Histología de Bazo

Los cortes mostraron la presencia de daño celular mayor en todos los grupos experimentales coinfectados al de los grupos infectados únicamente con *T. crassiceps* y *T. gondii* (Fig. 22). El más notable dentro de los grupos coinfectados fue el de 8 semanas *T. crassiceps- T. gondii* que presentó una mayor severidad (Fig. 22 F), mientras que los grupos experimentales de 1 y 4 semanas con *T. crassiceps - T. gondii* presentaron un leve daño (Fig. 22 D-E).

6.9.2. Histología de Hígado

El infiltrado celular presente en el hígado en todos los grupos experimentales coinfectados fue menor que el infiltrado celular observado en los ratones infectados únicamente con *T. gondii* (Fig. 23). Los grupos coinfectados con 1 y 4 semanas *T. crassiceps –T. gondii* presentaron un leve aumento en el infiltrado celular (Fig. 23 C-D) mientras que el grupo coinfectado con 8 semanas de *T. crassiceps–T. gondii* fue el que presentó muy poco infiltrado casi ausente, similar con el grupo no infectado (Fig. 23 A-E).

Bazo

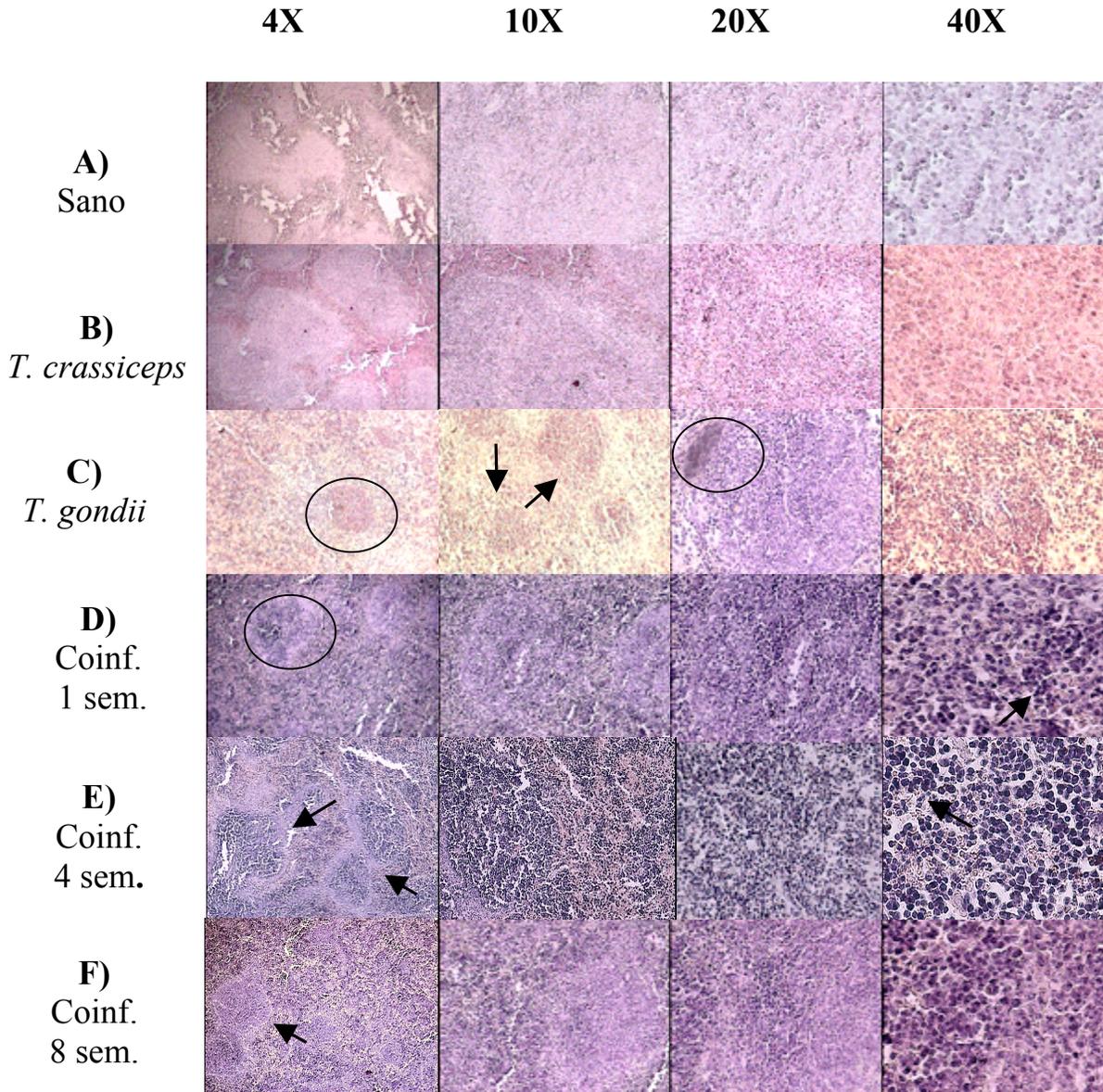


Fig. 22 Cuadro comparativo de cortes histológicos de bazo observado a diferentes objetivos en microscopio óptico de los diferentes grupos experimentales A) bazos de ratones no infectados, B) bazo de ratones infectados con *T. crassiceps*, C) bazo de ratones infectados con *T. gondii*, D) bazo de ratones coinfectados con 1 sem. *T. crassiceps* – *T. gondii*, E) bazo de ratones coinfectados con 4 sem *T. crassiceps* – *T. gondii*, F) bazo de ratones coinfectados con 8 sem. *T. crassiceps* – *T. gondii*.

Hígado

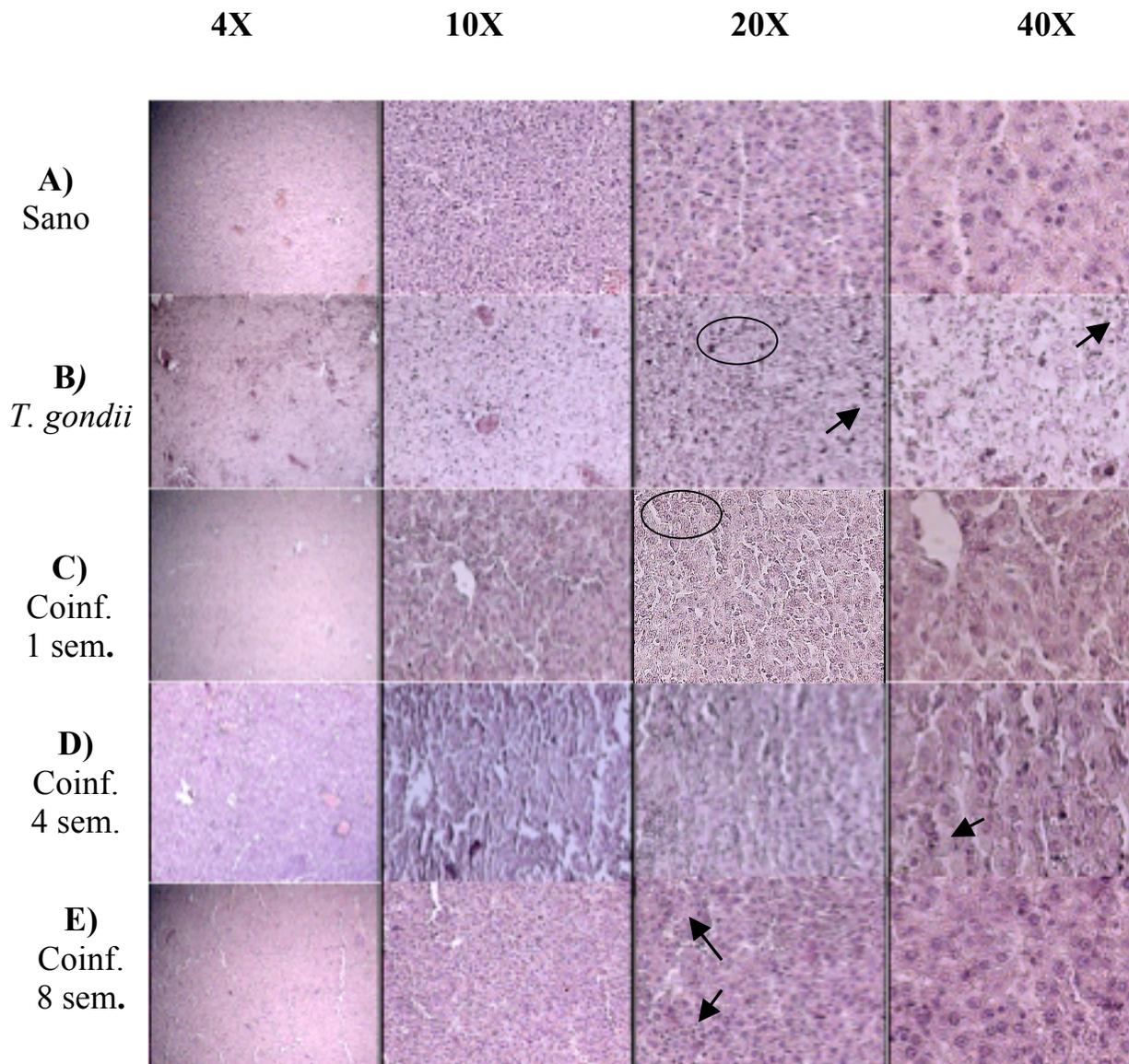


Fig. 23 Cuadro comparativo de cortes histológicos de hígado observado a diferentes objetivos en microscopio óptico de los diferentes grupos experimentales A) hígado de ratones no infectados, B) hígado de ratones infectados con *T. gondii*, C) hígado de ratones infectados con 1 sem. *T. crassiceps* -*T. gondii*, D) hígado de ratones coinfectados con 4 sem. *T. crassiceps* - *T. gondii*, E) hígado de ratones coinfectados con 8 sem. *T. crassiceps* -*T. gondii*.

7. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que la infección con *T. crassiceps* puede modificar el curso de una infección intracelular no relacionada como *T. gondii* en ratones BALB/c. La presencia de *T. crassiceps* influyó en función del tiempo; los ratones infectados crónicamente con *T. crassiceps* y coinfectados con *T. gondii* presentaron un aumento en la mortalidad en comparación con los ratones que fueron co-infectados en la etapa temprana de la infección con *T. crassiceps*. Esto demuestra que los factores que afectan la sobrevivencia del segundo parásito (*T. gondii*) son diferentes durante la infección aguda a los de la infección crónica por *T. crassiceps* [45]. Estas diferencias inciden en la tasa de mortalidad de *T. gondii*. Ésta observación está apoyada por otros estudios de coinfecciones, donde la mortalidad se ve modificada cuando le precede otra infección [46, 47]. Por ejemplo, en coinfecciones de helmintos con *Plasmodium* se ha demostrado que los helmintos no sólo influyen en la gravedad de *Plasmodium* en los individuos, si no que también afectan el daño que se ocasiona en el cerebro [9]. De igual manera, aquí observamos la influencia del helminto *T. crassiceps* sobre el curso de la infección por *T. gondii*. Cuando los ratones fueron coinfectados con *T. gondii* una ó cuatro semanas después de la infección con *T. crassiceps* (coinfección temprana) se observó un retraso y disminución en el número de quistes de *T. gondii* en el cerebro de los ratones, pero cuando la coinfección se realizó a la semana ocho posterior a la infección de *T. crassiceps* (coinfección tardía), el número de quistes en el cerebro aumentó significativamente (Fig. 11). La restricción en el número de quistes en las coinfecciones tempranas podría deberse al ambiente inmunológico tipo Th1 generado por *T. crassiceps* en la etapa temprana de la infección, ya que es bien sabido que ésta respuesta induce protección en la toxoplasmosis [48]. Por el contrario, el ambiente inmunológico tipo Th2 generado por la infección crónica de *T. crassiceps* favoreció el enquistamiento de *T. gondii* en el cerebro esto se puede deber por una replicación de los taquizoitos elevada la cual se reflejaría con un mayor arribo de parásitos en el SNC y en consecuencia mayor enquistamiento o por la formación

de quistes nuevos como resultado del rompimiento de quistes viejos durante una infección crónica por *T. gondii* [49].

El hecho de que a pesar de exhibir una respuesta de tipo Th1 protectora contra *T. gondii* en las coinfecciones tempranas no resolviera esta segunda infección podría explicarse en el contexto de que los niveles de las citocinas tipo Th1, particularmente los niveles de IL-12 e IFN- γ así como MIF no fueron lo suficientemente altos o persistentes para eliminar a *T. gondii* [40, 39].

Estas observaciones son congruentes con los niveles de MIF detectados en el transcurso de la infección por *T. crassiceps*. MIF es una molécula del sistema inmune innato asociada con funciones pro inflamatorias y por su influencia positiva sobre la actividad microbicida de los macrófagos [50] y en consecuencia con la resistencia inicial contra diversas infecciones parasitarias como *L. major*, *T. cruzi*, *T. crassiceps* y *S. japonicum* [51, 50]. En este mismo contexto se pudo apreciar niveles incrementados de MIF en tiempos tempranos de la infección por *T. crassiceps*, coincidiendo con el crecimiento restrictivo del parásito, pero los niveles de MIF estuvieron significativamente disminuidos cuando la infección por éste helminto se hizo crónica y masiva. De igual manera que la Th1 inicial, los niveles incrementados de MIF en las coinfecciones tempranas pudo influir en el menor número de quistes observados en el SNC. Mientras que los niveles disminuidos de MIF, junto con una clara respuesta Th2, en las coinfecciones tardías pudo influir en el aumento del número de quistes encontrados en el SNC.

Sin lugar a dudas el éxito del enquistamiento y el número de quistes en el SNC no sólo está favorecido por las condiciones inmunológicas permisibles de sobrevivencia y el número de taquizoitos en el hospedero, también depende de la capacidad del parásito para modificar la barrera hematoencefálica que le permita alcanzar el SNC para enquistarse.

Las uniones estrechas del cerebro de las células endoteliales microvasculares (BMEC), que constituyen la microvasculatura, forman la base anatómica de la barrera hematoencefálica (BBB). Las BMEC están unidas por uniones estrechas, con alta resistencia eléctrica entre las células; en condiciones fisiológicas, un número limitado de células inmunes cruzan la barrera hematoencefálica y entrar en el sistema nervioso central en un proceso llamado "vigilancia inmune" [52]

La barrera hematoencefálica en los ratones infectados con *T. gondii* mostró cambios desde el comienzo de la infección (Fig. 15), con un incremento en la permeabilidad de está en la octava semana en la cual hubo una mayor cantidad de quistes alojados en el cerebro por lo que es evidente la correlación entre la integridad de la barrera y la infección, conociéndose la preferencia de *T. gondii* por diseminarse en el cerebro y su habilidad de cruzar barreras biológicas [30, 26].

Aun cuando en estudios recientes no se ha visto cambios en la alteración de la BBB se sabe que el mecanismo para la prevención de la encefalitis toxoplásmica (ET) es dependiente de IFN- γ [52]. De igual forma se ha observado que en otras infecciones como la malaria cerebral se observan alteraciones vasculares proponiéndose la contribución de las células T CD8 para el desarrollo de esta patogénesis sin conocer los mecanismos por los se promueve el rompimiento de la BBB [53].

Los datos obtenidos en este trabajo revelan una clara alteración en la BBB durante el desarrollo de la infección con *T. crassiceps* siendo el primer reporte en describir la modificación de la BBB que se presenta en el curso de esta infección (Fig. 14). Es posible que el incremento en la permeabilidad hematoencefálica esté relacionada con la actividad inmunomoduladora característica de los helmintos [12] pues se ha reportado que en la mayoría de los casos donde se han presentado alteraciones en la permeabilidad vascular del cerebro han sido influenciadas por la liberación de citocinas que desestabilizan la permeabilidad de la barrera. Del mismo modo, en investigaciones sobre la permeabilidad vascular

en la fiebre viral hemorrágica, el exceso de una respuesta proinflamatoria condujo a una hiperpermeabilidad vascular [54] y aun cuando en el caso de la infección con *T. crassiceps* la barrera hematoencefálica se encontraba comprometida demostrando un aumento en la permeabilidad de la misma, esta alteración fue menor a la presentada en el mismo lapso de tiempo en la infección con *T. gondii*.

Una efectiva respuesta inmune contra un parásito que requiere de una fuerte respuesta de tipo Th1 puede ser afectada por el decremento del desarrollo de esta inmunidad protectora debido a la inducción de una respuesta Th2 provocada por una infección de helmintos [55].

Los datos presentados referentes a los niveles de IL-12 muestran un aumento en su producción en todos los grupos experimentales en las primeras semanas post coinfección con *T. gondii* (Fig. 16 B, C y D) pero para la quinta semana en donde la coinfección con *T. gondii* se considera crónica hay un decremento en sus niveles (Fig. 16 E) tratándose quizás porque IL-12 parece ser crucial en la fase inicial de la infección y menos importante durante la crónica [56], siendo mediador en la síntesis de IFN- γ [57] y el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 [32] haciendo más susceptible a la infección al hospedero cuando IL-12 o IFN- γ han sido neutralizados [58]

Es notable que la producción de IFN- γ post- coinfección fue mayor en todos los grupos experimentales sobre el control (Fig 19 B) ya que el estallido inicial de IFN- γ es crucial en la confirmación de la respuesta inmune que se desarrolla frente a *T. gondii* [58], siendo más notable en el grupo experimental con una semana de infección con *T. crassiceps* previa a la infección con *T. gondii* pero a medida que la coinfección se vuelve crónica la producción en los grupos experimentales va disminuyendo (Fig. 19 C, D y E). Esto se puede deber a una sinergia entre las dos infecciones pues en el caso de los grupos coinfectados *T. crassiceps* al ser un helminto podría ser capaz de disminuir la respuesta Th1 con una actividad inmunomoduladora [9].

También se ha presentado en otras infecciones con helmintos y *T. gondii* en donde la respuesta se ha polarizado a Th2 bloqueando la producción de IFN- γ y ON [43] y por el lado de *T. gondii* podría estar activando mecanismos evasivos bloqueando la respuesta de esta citocina [37] explicando también la disminución de la producción de IFN- γ en el grupo infectado sólo con este parásito. Sin olvidar otros mecanismos que podrían estar influyendo directamente en la producción de IFN- γ como la producción de IL-12 potente estimulador en su producción [59]

Referente a la producción de IL-4 (Fig. 20) se ha indicado que esta tiene un papel protector en infecciones con *T. gondii* al evitar una abrumadora respuesta Th1 [43] además de contribuir contra el desarrollo de la TE por prevenir la formación de quistes y proliferación de taquizoitos en el cerebro [32]; se ha visto mermada la producción de IL-4 en las primeras semanas de la infección con *T. gondii* (Fig. 20 B) como efecto de la producción de IFN- γ ya que esta se produce antes que IL-4 teniendo una ausencia o baja producción de la misma durante las primeras etapas de la infección [32]. Estas observaciones son congruentes con las respuestas observadas con los grupos en los que la coinfección fue iniciada en una infección temprana comparada con los que fue iniciada con una infección crónica con *T. crassiceps* (Fig. 20 C)

Los datos sugieren que la preexistente infección de *T. crassiceps* domina la respuesta de las citocinas durante la coinfección, por lo que los niveles de IL-10 inducido por esta pueden ser los responsables de la supresión de los niveles de IL-12 e IFN- γ [9, 39, 60], postulándose que esta supresión temporal de *T. gondii* ofrece una ventaja en el establecimiento de una enfermedad crónica en el huésped, y similares respuestas represivas se han asociado con otras enfermedades infecciosas [61] de hecho IL-10 al igual que IL-12 parecen ser cruciales en la fase inicial de la infección con *T. gondii* y menos importante durante la toxoplasmosis crónica [58]. Por consiguiente el aumento de niveles de esta

citocina en todos los grupos experimentales es evidente siendo más notable este efecto en el grupo infectado sólo con *T. gondii* (Fig. 21)

La ausencia de formas parasitarias intracelulares sin estructura quística en los cortes de los órganos evaluados difieren a los reportes que señalan la predilección de *T. gondii* por el bazo e hígado [25]; se puede atribuir al desarrollo de inmunidad mediada por células T,

La patología producida en los ratones coinfectados presenta una propagación sistémica, como se evidencia en el infiltrado en el bazo sugiriendo que la coinfección con *T. gondii* deterioró los mecanismos de defensa locales (Fig. 22), aunado a la patología producida por helmintiasis la cual es generalmente compleja, con componentes derivados de las lesiones directas y cambios ocasionados por el parásito y de la respuesta inmune hacia la infección [11]; por lo que respecta a la infección con *T. gondii* se sabe que limita el desarrollo de ciertos tumores [58] y en ratones C57BL/6 desarrolla una inmunopatología caracterizada por graves necrosis en el intestino delgado [43].

El daño observado en el hígado manifiesta el desarrollo de una severa patología (Fig. 23), aun que a nivel hepático no se observaron formas parasitarias de *T. gondii* se presentaron hallazgos patológicos; previas investigaciones han detectado un aumento en daño tisular en ratones coinfectados con un helminto y una bacteria o parásito intracelular [39]. En lo que se refiere a infecciones por helmintos se ha observado el aumento de granulomas en este órgano como resultado de la respuesta inflamatoria pues depende de la producción de citocinas inflamatorias aunque se ha sugerido que la formación de granulomas, particularmente en sus fases de crecimiento y mantenimiento se asocian con citocinas Th2 [11].

La previa presencia de *T. crassiceps* en el transcurso de la coinfección indica que a medida que se desarrolla el mecanismo de defensa del hospedero infectado, se producen paulatinamente cambios histológicos en los tejidos comprometidos.

8. CONCLUSIONES

- 1.- La infección previa con *T. crassiceps* incrementa la susceptibilidad a *T. gondii*.
- 2.- La infección por *T. crassiceps* incrementó la permeabilidad hematoencefálica permitiendo una mayor instalación de quistes de *T. gondii* en los cerebros de los ratones coinfectados de la semana 8.
- 3.- La infección previa por el Helminto *T. crassiceps* puede alterar el curso de la infección de otro parásito no relacionado.
- 4.- Las alteraciones histopatológicas de bazo e hígado no son concluyentes y exclusivas a alguna de las dos infecciones por separado, pero permiten asociarlas con los resultados obtenidos de la coinfección, mostrando cambios histológicos característicos en infecciones crónicas.

9. BIBLIOGRAFIA

1. L. Abbas A, *Cellular and molecular immunology*, Cellular and Molecular Immunology (2007), 560-580.
2. B. D. Male D. J, Roth . I, Roitt, *Inmunología*, (2007), 535.
3. U. Welsch, *Histologia*, (2009).
4. G. R. M. Castellanos M. R, Robinson R. R, Vázquez R. L, *Respuesta inmune innata y adaptativa*, MEDISAN **4** (2000), no. 2, 64-74.
5. A. Serrano, *Células colaboradoras(th1,th2,th17)yreguladoras(treg,th3,nkt) en la artritis reumatoide*, Reumatología Clínica **5** (2009), no. 51, 1-5.
6. M. G. Roncarolo and M. Battaglia, *Regulatory t-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans*, Nature reviews **7** (2007), no. 8, 585-598.
7. D. Vignali, Collison, L, Workman C, *How regulatory t cells work*, Nature Reviews Immunology **8** (2008), 523-532.
8. W. Frederick, *Advance in immunology* **108** (2010), 22-37.
9. E. Moreau and A. Chauvin, *Immunity against helminths: Interactions with the host and the intercurrent infections*, Journal of biomedicine & biotechnology **2010**, 428593.
10. P. J. Hotez, P. J. Brindley, J. M. Bethony, C. H. King, E. J. Pearce and J. Jacobson, *Helminth infections: The great neglected tropical diseases*, The Journal of clinical investigation **118** (2008), no. 4, 1311-1321.
11. L. M. C. Soto, *Inmunología de la infección por helmintos*, Rev. Esp. Alergol Inmunol Clín, **13** (1998), no. 6, 297-313.
12. R. M. Maizels, A. Balic, N. Gomez-Escobar, M. Nair, M. D. Taylor and J. E. Allen, *Helminth parasites--masters of regulation*, Immunological reviews **201** (2004), 89-116.
13. O.-J. P. Ostoa-Saloma P, Esquivel-Velázquez M, Bazúa S, Larralde C, *Budding of taenia crassiceps cysticerci in vitro is promoted by crowding in addition to hormonal, stress, and energy-related signals*, Journal of Biomedicine and Biotechnology **2010** (2009).
14. E. Scitutto, G. Fragozo, M. Baca, V. De la Cruz, L. Lemus and E. Lamoyi, *Depressed t-cell proliferation associated with susceptibility to experimental taenia crassiceps infection*, Infection and immunity **63** (1995), no. 6, 2277-2281.
15. K. Heldwein, H. G. Biedermann, W. D. Hamperl, G. Bretzel, T. Loscher, D. Laregina, M. Frosch, D. W. Buttner and D. Tappe, *Subcutaneous taenia crassiceps infection in a patient with non-hodgkin's lymphoma*, The American journal of tropical medicine and hygiene **75** (2006), no. 1, 108-111.
16. G. Fragozo, E. Lamoyi, A. Mellor, C. Lomeli, M. Hernandez and E. Scitutto, *Increased resistance to taenia crassiceps murine cysticercosis in qa-2 transgenic mice*, Infection and immunity **66** (1998), no. 2, 760-764.
17. K. A. Mooney, R. J. Spolski, E. J. See and R. E. Kuhn, *Immune destruction of larval taenia crassiceps in mice*, Infection and immunity **68** (2000), no. 5, 2393-2401.
18. K. E. R. Everhart E. M, Zelmer A. D, *Infrapopulation dynamics of a wild strain of taenia crassiceps (wfu) (cestoda: Taeniidae) in balb/cj mice*, Journal Parasitology **90** (2004), no. 1, 79-84.

19. A. E. J. Jenkins J. S, *Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes*, Biomedicine and Biotechnology **2010** (2010).
20. D. Soldati, Warien, J, *Toxoplasma molelular and cellular biology*, Gran Bretaña, 2007.
21. A. Pumarola, *Microbiología y parasitología médica*, España, 1999.
22. H. H. T. Beena J, Tait D. E, Wilson H. E, Gregg B, Ng G. L, Mrass P, Roos S. D, Dzierszynski F, Weninger W, Hunter A. C, *Dynamic imaging of cd8+ t cells and dendritic cells during infection with toxoplasma gondii*, pLOS Pathogens **5** (2009), no. 7.
23. A. M. Tenter, A. R. Heckeroth and L. M. Weiss, *Toxoplasma gondii: From animals to humans*, Int J Parasitol **30** (2000), no. 12-13, 1217-1258.
24. I. Blader, Saei, J, *Communication between toxoplasma gondii and its host: Impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence*, National Institutes of Health NIH Public Access **117** (2010), no. 5-6, 458-476.
25. T. Evering and L. M. Weiss, *The immunology of parasite infections in immunocompromised hosts*, Parasite Immunol **28** (2006), no. 11, 549-565.
26. J. P. Dubey., *Advances in the life cycle of toxoplasma gondii*, International Journal for Parasitology **28** (1998.), :1019-1024.
27. R. S. Goldszmid, I. Coppens, A. Lev, P. Caspar, I. Mellman and A. Sher, *Host er-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in toxoplasma gondii-infected dendritic cells*, The Journal of experimental medicine **206** (2009), no. 2, 399-410.
28. S. C. N. Miller M. D.C, Ikin R.J, BoulterR. N, Dalton P. J, Donnelly S, *Immunological interactions between 2 common pathogens, th1-inducing protozoan toxoplasma gondii and the th2-inducing helminth fasciola hepatica*, PLoS ONE | www.plosone.org **4** (2009), no. 5.
29. D.-P. V. Matowicka-Karna J, Kemono H., *Does toxoplasma gondii infection affect the levels of ige and cytokines (il-5, il-6, il-10, il-12, and tnf-alpha)?*, Clinical and Developmental Immunology (2009), 1-4.
30. C. Lang, Groß U, Lüder, C, *Subversion of innate and adaptive immune responses by toxoplasma gondii*, Parasitol Res **100** (2007), 191-203.
31. J. Alexander, T. M. Scharton-Kersten, G. Yap, C. W. Roberts, F. Y. Liew and A. Sher, *Mechanisms of innate resistance to toxoplasma gondii infection*, Philosophical transactions of the Royal Society of London **352** (1997), no. 1359, 1355-1359.
32. Y. Suzuki, *Host resistance in the brain against toxoplasma gondii*, J Infect Dis **185 Suppl 1** (2002), S58-65.
33. S. T. A. Sullivan J. W Jr, Joyce R. B, *Understanding mechanisms and the role of differentiation in pathogenesis of toxoplasma gondii - a review*, Mem Inst Oswaldo Cruz. **104** (2009), no. 2.
34. R. T. Mesquita, A. P. Ziegler, R. M. Hiramoto, J. E. Vidal and V. L. Pereira-Chiocola, *Real-time quantitative pcr in cerebral toxoplasmosis diagnosis of brazilian human immunodeficiency virus-infected patients*, Journal of medical microbiology **59**, no. Pt 6, 641-647.
35. D. Filisetti and E. Candolfi, *Immune response to toxoplasma gondii*, Annali dell'Istituto superiore di sanita **40** (2004), no. 1, 71-80.
36. I. Fenoy, M. Giovannoni, E. Batalla, V. Martin, F. M. Frank, I. Piazzon and A. Goldman, *Toxoplasma gondii infection blocks the development of allergic airway*

- inflammation in balb/c mice*, Clinical and experimental immunology **155** (2009), no. 2, 275-284.
37. D. Rosales-Borjas, Ortiz-Ortiz, L, *Infecciones parasitarias: Mecanismos de evasión de la respuesta inmune*, Revista Médica de la Extensión Portuguesa **2** (2008), no. 2, 89-98.
 38. S. J. Bickle D. Q, Helmbly H, *Chronic intestinal nematode infection exacerbates experimental schistosoma mansoni infection*, Infection and immunity **76** (2008), no. 12, 5802-5809.
 39. C. C. Chen, S. Louie, B. McCormick, W. A. Walker and H. N. Shi, *Concurrent infection with an intestinal helminth parasite impairs host resistance to enteric citrobacter rodentium and enhances citrobacter-induced colitis in mice*, Infection and immunity **73** (2005), no. 9, 5468-5481.
 40. M. Rodríguez, Terrazas, L, I., Márquez, R., Bojalil, R, *Susceptibility to trypanosoma cruzi is modified by a previous non-related infection*, Parasite Immunology **21** (199), 177-185.
 41. H. Helmbly, *Helminths and our immune system: Friend or foe?*, Parasitology international **58** (2009), no. 2, 121-127.
 42. M. Araujo, I., Bliss, S, K., Yasuhiro, S., Alcaraz, A., and E. Denkers, Y., Pearce, E, J, *Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfectd with schistosoma mansoni and toxoplasma gondii*, INFECTION AND IMMUNITY, **69** (2001), no. 3, 1454–1462.
 43. O. Liesenfeld, I. R. Dunay and K. J. Erb, *Infection with toxoplasma gondii reduces established and developing th2 responses induced by nipstrongylus brasiliensis infection*, Infection and immunity **72** (2004), no. 7, 3812-3822.
 44. I. A. Khan, R. Hakak, K. Eberle, P. Sayles, L. M. Weiss and J. F. Urban, Jr., *Coinfection with heligmosomoides polygyrus fails to establish cd8+ t-cell immunity against toxoplasma gondii*, Infection and immunity **76** (2008), no. 3, 1305-1313.
 45. S. Haque, Franck,J, Dumon,H, Kasper,L, Haque A, *Protection against lethal toxoplasmosis in mice by an avirulent strain of toxoplasma gondii: Stimulation of ifn- gand tnf- aresponse*, Experimental Parasitology **93** (1999), 231-240.
 46. V. Christodoulou, I. Messaritakis, E. Svirinaki, C. Tsatsanis and M. Antoniou, *Leishmania infantum and toxoplasma gondii: Mixed infection of macrophages in vitro and in vivo*, Exp Parasitol **128**, no. 3, 279-284.
 47. A. Welter, Mineo, J, de Oliveira, D, Lourenco, E, Vieira, E, Roque, M, da Silva, N, *Balb/c mice resistant to toxoplasma gondii infection proved to be highly susceptible when previously infected with myocoptes musculinus fur mites*, Experimental Parasitology **88** (2007), 325-335.
 48. E. Y. Denkers, *From cells to signaling cascades: Manipulation of innate immunity by toxoplasma gondii*, FEMS immunology and medical microbiology **39** (2003), no. 3, 193-203.
 49. F. Dzierszynski, Nishi, M, Ouko, L, Roos, D, *Dynamics of toxoplasma gondii differentiation†*, Eukaryotic Cell **3** (2004), no. 4, 992-1003.
 50. M. Rodriguez-Sosa, L. E. Rosas, J. R. David, R. Bojalil, A. R. Satoskar and L. I. Terrazas, *Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite taenia crassiceps*, Infection and immunity **71** (2003), no. 3, 1247-1254.

51. M. Flores, Saavedra, R, Bautista, R, Viedma, R, Tenorio, E, Leng, L, Sánchez, Y, Juárez, I, Satoskar, A, Shenoy, A, Terrazas, L, Bucala, R, Barbi, J, Satoskar, A, Rodriguez, M, *Macrophage migration inhibitory factor (mif) is critical for the host resistance against toxoplasma gondii*, The FASEB Journal **22** (2008), 3661-3671.
52. N. M. Silva, R. M. Manzan, W. P. Carneiro, C. M. Milanezi, J. S. Silva, E. A. Ferro and J. R. Mineo, *Toxoplasma gondii: The severity of toxoplasmic encephalitis in c57bl/6 mice is associated with increased alcam and vcam-1 expression in the central nervous system and higher blood-brain barrier permeability*, Exp Parasitol **126**, no. 2, 167-177.
53. G. L. Suidan, J. W. Dickerson, Y. Chen, J. R. McDole, P. Tripathi, I. Pirko, K. B. Seroogy and A. J. Johnson, *Cd8 t cell-initiated vascular endothelial growth factor expression promotes central nervous system vascular permeability under neuroinflammatory conditions*, J Immunol **184**, no. 2, 1031-1040.
54. B. B. Gowen, J. G. Julander, N. R. London, M. H. Wong, D. Larson, J. D. Morrey, D. Y. Li and M. Bray, *Assessing changes in vascular permeability in a hamster model of viral hemorrhagic fever*, Virology journal **7**, 240.
55. E. Riet, Hartgers, F, Yazdanbakhsh, M, *Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms*, Immunobiology **212** (2007), 475-490.
56. D. Aldebert, F. Durand, C. Mercier, M. P. Brenier-Pinchart, M. F. Cesbron-Delauw and H. Pelloux, *Toxoplasma gondii triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the thp-1 human monocytic cell line*, Cytokine **37** (2007), no. 3, 206-211.
57. J. C. Boothroyd, *Toxoplasma gondii: 25 years and 25 major advances for the field*, Int J Parasitol **39** (2009), no. 8, 935-946.
58. E. Y. Denkers and R. T. Gazzinelli, *Regulation and function of t-cell-mediated immunity during toxoplasma gondii infection*, Clinical microbiology reviews **11** (1998), no. 4, 569-588.
59. C. A. Hunter, E. Candolfi, C. Subauste, V. Van Cleave and J. S. Remington, *Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis*, Immunology **84** (1995), no. 1, 16-20.
60. Q. D. Bickle, J. Solum and H. Helmbj, *Chronic intestinal nematode infection exacerbates experimental schistosoma mansoni infection*, Infection and immunity **76** (2008), no. 12, 5802-5809.
61. L. E. Neyer, G. Grunig, M. Fort, J. S. Remington, D. Rennick and C. A. Hunter, *Role of interleukin-10 in regulation of t-cell-dependent and t-cell-independent mechanisms of resistance to toxoplasma gondii*, Infection and immunity **65** (1997), no. 5, 1675-1682.

APENDICE

- Buffer de Fosfatos (PBS) para 10 ltrs. a un pH 7.4

80 gr. NaCl	(J.T. Baker)
11.6 gr Na ₂ HPO ₄	(J.T. Baker)
2 gr KH ₂ PO ₄	(J.T. Baker)
2 gr KCl	(ICN Biomedicals Inc.)

- Solución de lavado (ELISA)

A 1000 ml. de PBS se le colocan 0.5% de Tween 20 (Promega co.)

- Solución de Bloqueo (ELISA)

100 ml. de PBS más 1% de albumina serica bovina (ICN Biomedicals Inc.)

- Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg. de ABTS (ICN Biomedicals Inc.) en 500 ml. de Acido cítrico (tecsiquim) al 0.1 M en H₂O destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a pH 4. 53 realizar alícuotas de 11 ml. en tubos y mantener en congelación a -70° C hasta su uso.

- Preparación de Azul de Evans al 1%

Por cada 10 ml de Solución Salina se coloca 0.1 g. de Azul de Evans (Hycel de México)

- Paraformaldehido al 4%

A 1000 ml. de H₂O destilada se le agregan 50 gr. de paraformaldehido (Fluka) Mantener en agitación y calentar hata llegar a una temperatura de 60°C al haber alcanzado esta temperatura adicionar una gota de NaOH al 1M acuosi hasta que se disuelva

- Rutina de tinción Hematoxilina-Eosina de Harris

Paso	Solución	Tiempo (min)
1	Xilol 1	5
2	Xilol 2	5
3	Xilol-OH	3
4	OH-100%	3
5	OH-90%	3
6	OH-80%	3
7	OH-70%	3
8	Hematoxilina	1
9	H ₂ O	1
10	Eosina alcohólica	5
11	OH- 70%	1
12	OH-80%	2
13	OH-90%	3
14	OH-100%	5
15	Xilol 1	3
16	Xilol 2	5
17	Montaje en resina	