



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias
en la infección por *Trypanosoma cruzi* en
ausencia de las moléculas STAT-6/MIF**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
MARCO RODRIGO VELÁZQUEZ GÓMEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA



MÉXICO, D.F. 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"**

**JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICA
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

VELÁZQUEZ GÓMEZ MARCO RODRIGO

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: **Citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en la infección por *Trypanosoma cruzi* en ausencia de las moléculas STAT-6/MIF**

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE	Q.F.B. MA. DE LAS MERCEDES ZAMUDIO DURÁN
VOCAL*	DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
SECRETARIO	DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
SUPLENTE	DRA. MA. TERESA CORONA ORTEGA
SUPLENTE	DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA

m zamudio

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 24 de mayo de 2012.

DRA. MARTHA ASUNCIÓN SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA



c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

ZARAGOZA
JEFATURA DE LA CARRERA
DE Q. F. B.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento:

A los tutores de mi proyecto de tesis:

Dra. Miriam Rodríguez Sosa por todos los recursos humanos, materiales y morales que tuvo la gentileza de facilitarme en todo momento durante la elaboración de este proyecto.

Dr. Rubén Marroquín Segura por haber aceptado ser mi asesor de tesis en la FES Zaragoza.

Por sus valiosos comentarios y sugerencias durante el proceso de investigación y elaboración de ésta tesis, muchas gracias.

A los sinodales de mi proyecto de tesis:

Dra. Ma. Teresa Corona Ortega

Dra. Martha Legorreta Herrera

Q.F.B. Ma. de las Mercedes Zamudio Durán

Por sus valiosos comentarios y sugerencias que tuvieron a bien realizar durante la revisión, corrección y evaluación de este trabajo, muchas gracias.

A la M. en C. Imelda Juárez Avelar por su colaboración en todas las actividades experimentales y operativas para la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis I. Terrazas Valdés por las observaciones oportunas que realizó sobre los pormenores y detalles de este proyecto.

Al equipo del Laboratorio 5 de Inmunología de la UBIMED de la FES Iztacala UNAM por permitirme ser su compañero de batallas todo este tiempo. A la UNAM y a la FES Zaragoza por darme todas las herramientas y la formación para ser un buen profesional. A mis profesores por darme su experiencia y conocimiento para mi aprendizaje en este camino de la ciencia.

A los programas: PAPIIT_2013 IN212412 y CONACYT-152224

DEDICATORIAS

Dedico esta obra a:

Mi padre Ing. Marco Antonio Velázquez Albarrán, muchas gracias papá por todo tu apoyo incondicional que me has brindado durante mi vida y tu ejemplo de salir adelante, es grandioso saber que cuento contigo siempre y que luchaste por mí a pesar de la vicisitudes que pasamos en aquellos años difíciles para ambos. También le agradezco a Irene por acompañarnos en este camino que recorrimos juntos.

Mi hermana Arq. Daniela Esther Velázquez García que ha sido y es la hermana que siempre quise tener, pues me ha dado su entusiasmo y amor sin pedirme nada a cambio, has estado ahí siempre para apoyarme y animarme para seguir adelante a pesar de todo.

Mi esposa Q.F.B. Denis Eurídice Hernández Dávila, gracias por tu amor, cariño, paciencia y comprensión, tu apoyo es la fuerza y la voluntad que me empuja a triunfar, gracias por impulsarme, sin ti no lo hubiera logrado, sabes que eres mi corazón.

Mi tía Ma. Teresa Velázquez Albarrán, mi gran tía, te agradezco todas tus atenciones que me has dado siempre, tu cariño es muy importante para mí, vales oro y deseo compartir esto contigo.

Mi hija Aline y mis futuros hijos, sepan que su mamá y yo los queremos mucho, los esperamos siempre con mucho amor, esta obra es para ustedes.

Mi tío Dr. José Luis Gómez Chávez que ha tenido la atención y el corazón para exhortarme a lograr mis metas.

Mis abuelos Pastor, Esther, Rodrigo y Esther, que aunque físicamente ya no se encuentran en este mundo, sepan siguen vivos en mi corazón. A todos aquellos que directa o indirectamente han influido en mi persona, para ser un hombre de bien y un ser humano íntegro.

En memoria de:
Lic. Silvia F. Velázquez Albarrán

ÍNDICE

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	ii
Índice.....	iv
Tablas y figuras	v
Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
1.1. Respuesta inmune.....	3
1.2. Mecanismo de polarización.....	6
1.3. Eliminación antigénica.....	7
1.4. Importancia de MIF.....	8
1.5. Importancia de STAT6.....	9
1.6. Citocinas involucradas en Th1/Th2.....	12
1.7. Enfermedad de Chagas.....	12
1.8. Patogenia.....	13
1.9. Distribución.....	14
1.10. Ciclo biológico.....	15
1.11. Inmunología de la enfermedad.....	17
1.12. Tratamiento para la enfermedad.....	24
2. Objetivos.....	26
3. Hipótesis.....	27
4. Material y métodos.....	28
4.1. Material biológico.....	28
4.2. Reactivos.....	29
4.3. Equipo.....	30
4.4. Métodos.....	33
5. Resultados.....	39
5.1. Parasitemia.....	39
5.2. Determinación de la sobrevida.....	40
5.3. Peso corporal.....	41
5.4. Citocinas pro-inflamatorias.....	42
5.5. Citocinas anti-inflamatorias.....	45
5.6. Correlación de las concentraciones de citocinas.....	46
5.7. Producción de citocinas de células de bazo.....	48
5.8. Cuantificación de óxido nítrico.....	52
6. Discusión.....	54
7. Conclusiones.....	63
8. Apéndice.....	64
9. Bibliografía.....	68

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Macrófago activado por parásito intracelular.....	5
Figura 2. Mecanismo de polarización Th1/Th2.....	7
Figura 3. Vector de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
Figura 4. Distribución y flujo de la enfermedad de Chagas.....	15
Figura 5. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 6. Tripomastigote metacíclico en torrente sanguíneo.....	17
Figura 7. Ratón singénico de fondo genético BALB/c.....	28
Figura 8. <i>Trypanosoma cruzi</i> cultivado <i>in vitro</i>	29
Figura 9. Placa de ELISA-Sandwich de cuantificación de citocinas.....	36
Figura 10. Placa de cultivo de esplenocitos estimulados con TcAg.....	38
Figura 11. Gráfica de parasitemia.....	39
Figura 12. Gráfica de sobrevida.....	40
Figura 13. Gráfica de peso corporal.....	41
Figura 14. Gráfica de concentración de IL-12 en suero.....	42
Figura 15. Gráfica de concentración de IFN- γ en suero.....	43
Figura 16. Gráfica de concentración de TNF- α en suero.....	44
Figura 17. Gráfica de concentración de IL-4 en suero.....	45
Figura 18. Gráfica de concentración de IL-10 en suero.....	46
Figura 19A. Gráfica de concentración de IL-12 en sobrenadante.....	49
Figura 19B. Gráfica de concentración de IFN- γ en sobrenadante.....	49
Figura 19C. Gráfica de concentración de TNF- α en sobrenadante.....	50
Figura 20A. Gráfica de concentración de IL-4 en sobrenadante.....	51
Figura 20B. Gráfica de concentración de IL-10 en sobrenadante.....	51
Figura 21. Gráfica de concentración de NO en sobrenadante.....	53
Figura 22. Macrófago activado alternativamente por <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
Tabla 1. Cebadores para PCR del gen para MIF, STAT6 y Neo.....	33
Tabla 2. Orden y concentración de reactivos para PCR.....	34
Tabla 3. Comparativo del número de parásitos y concentración de citocinas.....	47
Tabla 4. Comparativo del porcentaje de sobrevida y la concentración de citocinas....	47

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ABTS	Ácido sulfónico 3-etil-benzitiazolino
Ag	Antígeno
APC	Células presentadoras de antígeno
BALB/c	Cepa de ratones albinos experimentales
BSA	Albúmina sérica bovina
CAB	Células adherentes de bazo
CAM	Complejo ataque a la membrana (Calmodulina)
cbp	Cuanto basta para
CD	Cúmulo de diferenciación
CDC	Centro de control de enfermedades
CIEF	Contrainmuno electroforesis
cm	Centímetro
cNOS	Óxido nítrico sintetasa constitutiva
DC	Células dendríticas
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Nucleótidos fosfatados (Desoxinucleótidos trifosfato)
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardía
ELISA	Ensayo inmunológico ligado a enzimas
esp	Espontánea
EV	<i>Ectromelia virus</i>
F	Adelante (Forward)
Fas	Proteína de superficie de membrana citotóxica
FasL	Proteína de superficie de membrana citotóxica Ligando
Fig	Figura
Gal	Galectina
IFI	Inmunofluorecencia indirecta
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inductible
ip	Intraperitoneal
JAK	Cinasa Janu
KO	Bloqueado (Knock-out)
LB	Linfocitos B
L-NAME	N-nitro-L arginina-metil-éster

LPS	Lipopolisacáridos
LT	Linfocitos T
LTc	Linfocito T citotóxico
Mas	Célula cebada
MEC	Matriz extracelular
MHV	Virus de hepatitis de ratón
MIF	Factor inhibidor de migración de macrófagos
MIP	Proteína de macrófago inflamatoria
ml	Mililitro
Mo	Macrófago
MoaA	Macrófago activado alternativamente
MoaC	Macrófago activado clásicamente
MoaT2	Macrófago activado Tipo 2
NK	Asesinas naturales (Natural killer)
nm	Nanómetro
NO	Óxido nítrico
No	Número
pb	Pares de bases
PBS	Solución reguladora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogrammo
pi	Post-infección
PMN	Neutrófilo
R	Regreso (Reverse)
RHA	RNA helicasa A
RNA	Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema nervioso central
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TAD	Activación de la transcripción de dominio
Taq	Polimerasa termoestable (Thermus aquaticus polimerasa)
TcAg	Antígeno total de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TCR	Receptor de células T (Receptor de LT)
TGB	Factor transformador del crecimiento
Th1	Linfocitos cooperadores tipo 1
Th2	Linfocitos cooperadores tipo 2
TNF	Factor de necrosis tumoral
WT	Silvestre (Wild type)
μl	Microlitro
μM	Micromolar

Las leyes son inmutables, por lo mismo son calculables y comprensibles, en consecuencia, el hombre es, mediante su razón, un agente libre capaz de someter las leyes a su servicio y obligarlas a hacer lo que él no podría por sí sólo.

Annie Besant.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito intracelular protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), se transmite a mamíferos de sangre caliente por las heces del insecto vector del género *Triatoma* (chinche besucona). El parásito penetra el tejido epitelial por acción autoinoculante del huésped durante el rascado, alcanza el torrente sanguíneo y se aloja en algunos tejidos, causando daño en órganos como el corazón, el esófago y el colon de forma progresiva por la inducción de respuestas inflamatorias, lesiones celulares y fibrosis. La resistencia a la infección de *T. cruzi* en el hospedero depende tanto de la respuesta inmune innata mediada por macrófagos, células asesinas naturales (del inglés- Natural killers -NK) y linfocitos TCD8⁺, así como de la respuesta inmune adaptativa mediada por los linfocitos TCD4⁺ y linfocitos B. Las citocinas pro-inflamatorias tales como la interleucina (IL)-12, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α y el interferón (IFN)- γ , pertenecientes a la respuesta inmune tipo Th1, desempeñan un papel crítico en la inmunidad protectora contra *T. cruzi*. Mientras que las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 pertenecientes a la respuesta inmune tipo Th2, son necesarias para evitar la hiperreactividad citotóxica de la respuesta Th1, que puede dañar no sólo al parásito sino también a los órganos y tejidos del hospedero. Esto sugiere que las respuestas de tipo Th1 y Th2 deben tener un fino balance para controlar la infección de *T. cruzi* sin dañar al hospedero, sin embargo no es del todo clara esta asociación. Para entender mejor la participación de las dos respuestas inmunes contra *T. cruzi*, en este trabajo de tesis se utilizaron ratones BALB/c (genéticamente modificados) en el gen que codifica para MIF o para STAT6 (moléculas que participan de manera importante en el desarrollo de las respuestas Th1 y Th2 respectivamente), ratones con doble bloqueo en MIF(-/-) y STAT6(-/-), como controles se utilizaron ratones silvestres (WT). Los diferentes grupos de ratones se infectaron con 5×10^3 parásitos de *T. cruzi* de la cepa Querétaro vía intraperitoneal. Se evaluó la carga parasitaria, la sobrevida, citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en suero cada semana hasta 56 días post-infección. Los ratones doble bloqueados MIF/STAT6-/- tuvieron la mayor carga parasitaria en sangre, seguidos de los ratones STAT6-/-, después los ratones MIF-/- y finalmente los ratones WT. La sobrevida no correlacionó en todos los casos con la

parasitemia. La sobrevida de los STAT6^{-/-} fue del 20%; para los MIF/STAT6^{-/-} fue del 33%; para los MIF^{-/-} fue del 88% y para los ratones silvestres fue del 100%. La muerte de los ratones se correlacionó con la presencia de citocinas en suero. Los ratones STAT6^{-/-} presentaron niveles disminuidos de IL-10 e IL-4. Los ratones MIF/STAT6^{-/-} tuvieron niveles disminuidos de TNF- α e IFN- γ . Los ratones MIF^{-/-} tuvieron niveles incrementados de IL-4 e IL-10 y disminuidos de TNF- α . Con estos resultados se puede sugerir que la participación de la respuesta tipo Th1 así como la respuesta tipo Th2 son igualmente importantes, la primera podría eliminar al parásito de forma intracelular y la segunda podría participar en el control de la citotoxicidad generada por la primera respuesta, además podría participar en la restricción del parásito cuando está en la fase extracelular. Por lo tanto sugerimos que las respuestas Th1 inflamatoria y Th2, participan coordinadamente para restringir la persistencia del parásito y la gravedad de la enfermedad, respectivamente.

INTRODUCCIÓN

1.1. Respuesta inmune

La inmunidad de un individuo es uno de los procesos más importantes para la supervivencia de la especie por lo cual su estudio ha sido un hito de las investigaciones científicas en los últimos años, a pesar de eso actualmente aún existen muchos mecanismos que no se han comprendido del todo, hay rutas en las cuales la forma de responder del sistema inmune es poco clara.

Sin embargo la inmunología ha podido descifrar muchos procesos que antes se pensaban eran indescifrables, se han descubierto células, moléculas y mecanismos que participan activamente en procesos inmunes muy específicos, por lo tanto, cada paso en la búsqueda de una nueva ruta de la respuesta inmune en el control eficiente de las enfermedades infecciosas y autoinmunes es prioritaria en el avance de la ciencia médica. Esto depende del mayor entendimiento de la actividad protectora de cada uno de los efectores de la respuesta inmune.

Las células y moléculas que constituyen el sistema inmune del individuo dan protección coordinada a éste, a través de un mecanismo de cooperación. Dentro de este sistema tenemos dos vertientes que confluyen al mismo propósito de protección, la inmunidad celular y la inmunidad humoral. La primera comprende el grupo de células de respuesta inmune adaptativa mediada por linfocitos T (LT) y actúa como mecanismo de ataque en contra de los agentes invasores, tales como virus, bacterias y parásitos que atacan al hospedero; la defensa primaria ante este tipo de agresiones depende de la inmunidad celular, que actúa en la destrucción de los microorganismos invasores produciendo citocinas, los LT reconocen antígenos mediante una estructura de membrana llamada TCR/CD3 [1].

La inmunidad humoral actúa un poco más selectivamente y es mediada por linfocitos B (LB) que producen moléculas glucoproteínicas específicas llamadas anticuerpos que reconocen al antígeno invasor neutralizándolo y marcándolo para su fácil eliminación;

los LB reconocen antígenos mediante inmunoglobulinas de superficie que en conjunto con otras moléculas forman el receptor del antígeno [2].

Dentro de la primera vertiente tenemos a los LT y a los macrófagos (Mo) éstos últimos representan actualmente un grupo de células heterogéneas con múltiples funciones [3]. El primer indicio de la heterogeneidad de los Mo apareció con la caracterización de los "Mo activados alternativamente" (MoaA). La exposición de Mo a IL-4 o glucocorticoides induce una población de células que incrementan la expresión de ciertos receptores fagocíticos, pero que fallan para producir radicales de oxígeno [4], lo cual conduce a una limitada muerte de los patógenos intracelulares.

Si bien a estos Mo se los denominó MoaA, este término no es del todo adecuado, ya que esta denominación estaría señalando que es la única manera, adicional a la clásica, de activar al Mo. Estudios recientes sugieren que éste no es el caso, ya que la exposición de Mo a señales de activación clásicas, como el lipopolisacárido (LPS) o el interferón gamma (IFN- γ), en presencia de complejos inmunes induce la generación de un tipo celular fundamentalmente diferente al "Mo activado clásicamente" (MoaC) [5].

Estas células liberan grandes cantidades de IL-10 y de esta manera son inhibidores potentes de la respuesta inflamatoria inducida por endotoxinas bacterianas [5]. Estos Mo han sido denominados "Mo activados Tipo 2" (MoaT2) [6], debido a su habilidad para inducir respuestas de células Th2 y producción de citocinas.

Dentro de estas dos vertientes en la respuesta inmune podemos encontrar células citotóxicas como las asesinas naturales (NK) que son unas de las principales células productoras de citocinas: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón-gamma (IFN- γ), interleucina (IL)-3 y otros factores. Estas citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular mediadoras de: crecimiento, diferenciación, inflamación y reparación celular, también son el medio de comunicación intercelular cuando inicia la invasión de patógenos regulando la respuesta inmune específica (Fig.1).

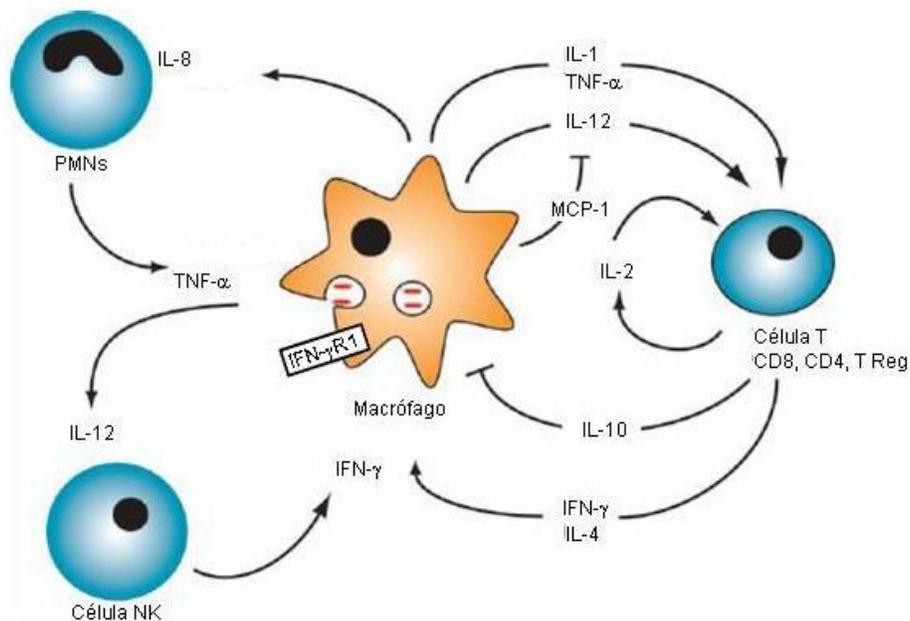


Figura 1.- Macrófago activado por un microorganismo fagocitado y producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, con la participación de células NK, neutrófilos (PMN) y linfocitos T (CD8⁺ y CD4⁺) [7].

También se pueden diferenciar subtipos de linfocitos TCD4⁺ (LTCD4⁺) activados por un antígeno, cuyas respuestas se polarizan dependiendo de las rutas llamadas Th1 y Th2, éstos son identificados por las citocinas que secretan [8].

El mecanismo responsable de esta dicotomía Th1 y Th2 en la respuesta inmune específica no se aclaró hasta 1986, cuando Mosmann [9] y colaboradores dieron evidencias de que la estimulación *in vitro* de LTCD4⁺ de ratones resultaba en el desarrollo de un patrón restringido y estereotipado en la producción de citocinas. Los linfocitos de tipo 1 o Th1 producían IFN- γ , interleucina (IL)-2, TNF- α y factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF) mientras que los linfocitos tipo 2 o Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL9, IL-10 e IL-13.

A causa de estas peculiares vías, los linfocitos Th1 y Th2 pueden correlacionarse como células efectoras de reacciones características por la prevalencia de respuestas mediadas por células o respuestas mediadas por anticuerpos, respectivamente [9]. A la respuesta

tipo Th1 la podemos catalogar como pro-inflamatoria y a la respuesta de tipo Th2 como anti-inflamatoria [10].

1.2. Mecanismo de polarización

Las células presentadoras de antígeno (CPA) y los Mo que fagocitan una partícula o microorganismo para degradarlo en pequeños péptidos, que después pasan al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) para presentarlos en la membrana y ser reconocidos por los $LTCD4^+$, llamados cooperadores. Los $LTCD4^+$ favorecen la activación de los LB e inician la respuesta humoral; los $LTCD4^+$ reconocen el antígeno gracias al MHC-II y producen IL-2 para estimular la proliferación de los LB [11].

Después de la presentación antigénica por parte del MHC-II, los linfocitos Th proliferan a través del precursor Th0 hacia células Th1 o Th2 que difieren en el perfil restringido y estereotipado de producción de citocinas. De hecho, las células Th1 secretan IL-2, IFN- γ , TNF- α y proteínas inflamatorias de migración (MIP y MIP-1) y el MIF, mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 [12] (Fig.2).

Los linfocitos del subtipo Th1 son responsables de la inmunidad mediada por células, activan Mo, promueven las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH), activan a los linfocitos T citotóxicos (LTc) y a las células NK. Los linfocitos del subtipo Th2 generan y mantienen la respuesta inmune humoral promoviendo la proliferación de los LB, promueven la producción de anticuerpos de tipo IgG e IgE, promueven células cebadas (Mas) e inducen la proliferación y diferenciación de los eosinófilos [13].

Son diversos los factores que determinan la polarización de los $LTCD4^+$ hacia alguno de los subtipos celulares, siendo el principal estímulo para tal diferenciación las citocinas [14]. Tanto para ratones como para humanos la presencia de IL-12 promueve que los $LTCD4^+$ adquieran un perfil de secreción de citocinas tipo Th1 [15]. Los efectores de la respuesta inmune tienen interacción a través de moléculas coestimuladoras capaces de activar a las células para que produzcan más citocinas, que expanden la respuesta inmune. Así, las moléculas coestimuladoras son un grupo de mediadores producidos por células inmunes que actúan sobre receptores en las membranas celulares [16].

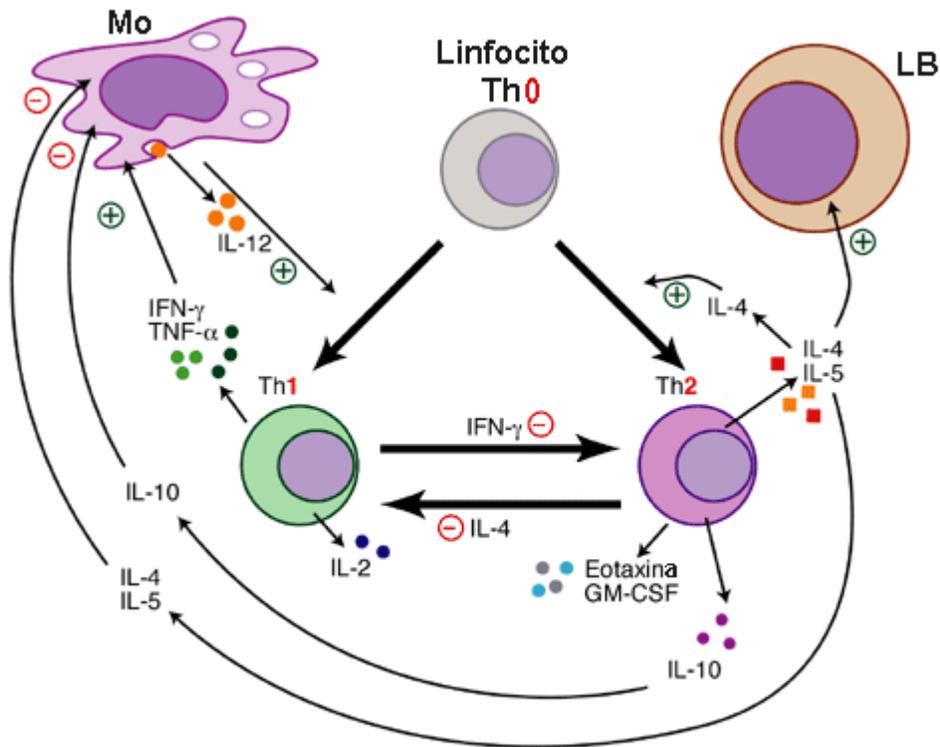


Figura 2.- Mecanismo general de polarización Th1/Th2 responsable de la activación y producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias con la participación de Mo, LT y LB [17].

1.3. Eliminación Antigénica

Los linfocitos actúan por dos mecanismos para provocar la muerte de las células blanco. El primero se observa a los pocos minutos después de establecido el contacto con un LTc, la célula blanco se hincha y pierde moléculas pequeñas. Las macromoléculas logran atravesar la membrana celular después de que han ocurrido cambios secundarios en la célula como consecuencia del trastorno en la regulación osmótica y el ingreso de agua al citoplasma [18].

En el segundo mecanismo, el "efecto letal" consiste, muy probablemente, en la señal mediada por la subunidad β de la linfoxina, que actuando como ligando del antígeno llamado proteína de superficie de membrana citotóxica (Fas), induce el proceso de apoptosis de la célula blanco. Cuando opera este mecanismo, la célula blanco muestra

todas las características morfológicas y bioquímicas de la muerte celular programada [19].

Por otro lado las células NK son susceptibles de activarse por diversas citocinas para participar en la apoptosis sin tener que cumplir el requisito de haberse activado previamente por un antígeno. Así, la actividad lítica de las células NK aumenta en presencia de interferones, IL-2, IL-12, y TNF- α [20].

El IFN- γ de células NK estimuladas por IL-12 de Mo que a su vez también pueden secretar TNF- α como respuesta a la presencia de antígenos fosfolipídicos parasitarios que son necesarios para iniciar la respuesta protectora, después de la infección por parásitos se produce una estimulación de las funciones efectoras de los Mo en presencia de citocinas secretadas por LT como son IFN- γ , IL-3 e IL-4 o vías no dependientes de LT como las NK ya mencionadas [21].

1.4. Importancia de MIF

Uno de los factores importantes en la respuesta inmune del hospedero ante cualquier antígeno es el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). MIF es una linfocina o citocina con características de glucoproteína ácida producida por los LT y algunas otras células inmunes, que bloquea el desplazamiento de los Mo reteniéndolos en el sitio de la lesión, por lo cual esta molécula interrumpe la motilidad del fagocito mononuclear para actuar sobre los microorganismos invasores en el sitio de la lesión y efectúa su poder de reclutamiento para que otras células sean retenidas en los sitios de la inflamación [2].

MIF también participa en la respuesta inmune activando a los Mo para producir antimicrobianos celulares como radicales de oxígeno (O_2) y óxido nítrico (NO), y activa una variedad de moléculas efectoras de otras respuestas [22]. Se sabe que MIF es una citocina presente en procesos pro-inflamatorios que participa en la defensa contra varios patógenos [23] y regula la respuesta inmune inflamatoria activando distintos tipos celulares en la línea de defensa del individuo, como Mo y neutrófilos.

Últimamente se han descrito células dendríticas (CD) que son células blanco para MIF así como células productoras del mismo, que participan en el aumento de los procesos inflamatorios [24]. Por lo tanto MIF también actúa en distintas infecciones parasitarias favoreciendo la producción de citocinas pro-inflamatorias importantes, en algunos casos, para contener la replicación de los parásitos [25].

El receptor específico para MIF se ha identificado como el CD74 [26], el cual es mediador de la inflamación; MIF además de promover la quimiotaxis favoreciendo la acumulación de las células de la respuesta inmune en el sitio de inflamación, activa a los Mo y favorece en otras células la producción de moléculas antimicrobianas [22]. Además, induce la producción de citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-1 y de forma indirecta a la IL-12 que son importantes en la resistencia contra microorganismos patógenos como plasmodium, salmonella, leishmania y otros microorganismos de tipo parasitario [27].

Por otro lado, MIF regula fisiológicamente la acción de los glucocorticoides actuando sobre el sistema inmune al incrementar la producción de fosfolipasa-A2 y a la proliferación celular. Así la participación de MIF sobre la cascada de citocinas relacionada con el control de la respuesta inflamatoria asociada a los glucocorticoides, actúa directamente en los procesos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios de las enfermedades como: choque séptico, artritis reumatoide y glomerulonefritis [28].

1.5. Importancia de STAT6

Otra molécula importante en la respuesta inmune es un receptor que se conoce como factor transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)-6 este tiene características proteicas, es el receptor responsable de regular algunos aspectos celulares de supervivencia, diferenciación celular y factores de transcripción que regulan la inmunotolerancia. La fosforilación en este receptor de citocinas permite la activación de la transcripción de genes para producir IL-4 y IL-13 por los LT cooperadores [29].

El receptor proteínico STAT es un mediador por el cual las señales inmunes de las citocinas pueden transducirse por la membrana al núcleo del fagocito. Se conocen hasta el momento siete tipos de STAT y se dividen en dos subgrupos, largos y cortos, los

primeros tienen 850 aminoácidos (STAT-2 y 6) y los segundos tienen 750 aminoácidos (STAT-1, 3, 4 y 5) [30], en lo particular nosotros investigamos a STAT6.

La capacidad de STAT6 para activar la transcripción depende de la interacción con diversos factores de transcripción y coactivadores; la primera de las proteínas identificadas fue la proteína P100. En los linfocitos Th2, la IL-4 y la IL-13, activan la señal STAT6 expresándose en el músculo externo de las infecciones por nemátodos y es mediador de la hipercontractibilidad muscular. Esto determina el lugar de acción de estas citocinas, pues se ha examinado IL-4 e IL-13 en la hipercontractibilidad de los islotes del músculo con ratones silvestres (WT) y deficientes para STAT6(-/-). Esto se puede observar en los ratones infectados con *Trichinella spiralis* [31].

La presencia de IL-4 promueve el desarrollo de células Th2. Esto sugiere que las diferencias que se pueden manifestar en la expresión de citocinas sobre las células pueden alterar el tipo de respuesta en el individuo, pues éstas alteran diferentes funciones biológicas a través de la interacción con receptores específicos para cada una de ellas, el evento más temprano que podemos ver en los receptores de membrana es la activación de las cinasas Janus (JAK) las cuales fosforilan a STAT asociados con estos receptores. Uno de los más importantes sustratos asociados a los JAK's es el factor citoplasmático STAT, el cual es fosforilado por los JAK's en un residuo de tirosina, entonces se traslocan al núcleo donde inducen la expresión de diversos genes [32].

Se ha caracterizado el mecanismo de regulación de STAT6 mediado por la activación transcripcional del dominio (TAD) con el que interactúan las proteínas nucleares. La RNA helicasa A (RHA) como un nuevo componente de STAT6 transcripcional; no interactúa directamente con STAT6, pero la proteína P100 media el montaje de los complejos ternarios de STAT6-RHA-P100, como también se sabe que interactúan con la modificación de las proteínas de la cromatina, la RHA que contiene complejos de proteínas puede facilitar la entrada de la IL-4 al aparato transcripcional para que responda a promotores intracelulares [33].

En consecuencia STAT6 provoca la producción de IL-4 resultando de la activación de JAK1 y JAK3, lo que a su vez estos fosforilan a STAT6 donde la fosforilación forma

moléculas dímeras que se traslocan en el núcleo y se unen a las secuencias de un reconocimiento específico de genes para producir IL-4 que es la citocina de la respuesta inmune Th2 por excelencia [34].

Por lo tanto STAT6 es esencial para el desarrollo de la respuesta Th2, la vía de señalización STAT6 desempeña un papel fundamental en la promoción de la inmunidad tipo Th2 [35].

Las moléculas STAT6 son esenciales para la inducción de respuestas que son mediadas por IL-4 e IL-13 y como es de esperarse los ratones deficientes de esta molécula pierden muchas funciones fisiológicas asociadas con la IL-4, esta citocina tiene la habilidad para inducir la diferenciación de células TCD4⁺ hacia la respuesta de tipo Th2, el fenotipo más típico es la habilidad de los LB para producir IgE por lo que IL-4 induce la transcripción de esta inmunoglobulina a través de STAT6 [36].

Un ejemplo de la importancia de STAT6 lo encontramos en desórdenes de diarrea alérgica inducida por ovoalbúmina en el modelo murino, donde se utilizaron ratones STAT6^{-/-} con el fin de establecer los mecanismos inmunes involucrados en esta patología, se demostró la participación de STAT6 en los ratones STAT6^{-/-} los cuales fueron protegidos contra este tipo de diarrea tras la administración oral repetida de ovoalbúmina, por lo tanto no presentaron infiltración de eosinófilos en el intestino delgado, cuando se les comparó con el grupo control que presentó diarrea, mostraron ausencia total de IgE y niveles bajos de IgG e IgA. Por lo tanto la diarrea inducida por ovoalbúmina es dependiente de una respuesta de tipo Th2 regulada por la vía de STAT6 [37].

También se ha demostrado la participación STAT6 en la inducción de la expresión del gen de arginasa I en Mo tratados con IL-4 e IL-13 [38] y se ha encontrado que STAT6 induce en el hospedero una respuesta de tipo Th2 en las infecciones de parásitos helmintos, la cual contribuye a la expulsión de estos parásitos de la cavidad intestinal, por lo que IL-4 e IL-13 se han considerado como las llaves maestras en la protección del hospedero contra los nemátodos intestinales [39].

1.6. Citocinas involucradas en Th1/Th2

La interacción de las citocinas en la respuesta inmune Th1/Th2 responde a una cascada citotóxica proveniente de la respuesta primaria y mediada por anticuerpos o por células efectoras determinada por el antígeno. Por ejemplo IL-4 producida por linfocitos Th2, células cebadas y linfocitos TCD4⁺, esta citocina promueve la síntesis de IgE e IgG, pero inhibe la producción IFN- γ de la respuesta Th1. En consecuencia los linfocitos Th2 producen la IL-10, donde su función es inhibir la producción de IFN- γ en los linfocitos Th1 y algunas funciones del macrófago.

Por el contrario la IL-12 promueve la generación de la respuesta Th1 además estimula la producción del IFN- γ y TNF- α , también activa a las células NK, la IL-12 es sustentada por LB y Mo, el IFN- γ producido por las células de la respuesta Th1, activa las células NK y Mo e inhibe la respuesta tipo Th2, el TNF- α producido por Mo y células cebadas el cual está presente en procesos inflamatorios de la respuesta Th1 es un fuerte inductor de fiebre y choque séptico [40].

1.7. Enfermedad de Chagas

En abril del 2010 se cumplió el centenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas conocida también como tripanosomiasis, realizado por el médico brasileño Carlos Chagas, por ser el único investigador que ha descrito una nueva enfermedad infecciosa en todos sus aspectos: el patógeno que la causa, el vector que la transmite (un triatomino hematófago), el ciclo vital del parásito, sus reservorios naturales y la enfermedad en sí misma. Sin embargo, la mayoría de los afectados todavía carecen de acceso a su diagnóstico y tratamiento.

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades tropicales que afectan a un número elevado de personas actualmente, debido a la distribución global del vector (Fig. 3) a zonas no endémicas, por lo cual se ha extendido a países donde la prevalencia era escasa o nula. Este padecimiento afecta aproximadamente a diez millones de personas en América Latina y se estima que los habitantes de las zonas rurales son los más expuestos a contraer la enfermedad [41]. Debido a las migraciones y las

transfusiones de sangre, la enfermedad se ha detectado en lugares del mundo donde no existe el vector [42].



Figura 3.- Triatomino hematófago vector de *T. cruzi* es un insecto perteneciente a la familia *Reduviidae* del orden *Hemiptera*, con diversos nombres comunes en diferentes regiones: vinchuca (desde Ecuador hasta la Patagonia), chipo (Venezuela), besucona (México) y barbeiro (Brasil) entre otros países [43].

1.8. Patogenia

En la enfermedad adquirida se reconocen tres fases: La fase aguda, fase intermedia y la fase crónica. En la enfermedad congénita se presenta la forma grave y fatal. Durante la enfermedad esta afecta al corazón, al hígado, al bazo, a los ganglios linfáticos, al sistema nervioso central (SNC) y al tejido adiposo. Puede observarse hepatomegalia, esplenomegalia, adenomegalia, meningoencefalitis y atriomegalia. La liberación de restos celulares acarrea una respuesta inflamatoria que termina por dañar distintas células y el daño suele circunscribirse al corazón y órganos huecos del tubo digestivo [44] que desencadenan la muerte de la persona afectada.

El individuo infectado desarrolla la enfermedad de manera progresiva, que inicia con una fase aguda que se caracteriza por una respuesta inflamatoria del tejido cutáneo y la presencia del parásito en la sangre, la fase intermedia se caracteriza por ser asintomática y sin presencia del parásito en sangre, finalmente la fase crónica en la que se manifiesta

un aumento del bazo y el corazón pero no hay presencia de parásito en sangre. En la fase crónica las personas pueden presentar afecciones en músculo cardiaco y en sistema digestivo; la miocardiopatía daña permanentemente el músculo cardiaco pues en esta etapa, *T. cruzi* infecta y se multiplica en el citoplasma de células de diferentes tejidos, aunque es en las células musculares cardiacas donde se lo encuentra con mayor frecuencia [45].

1.9. Distribución

Es endémica de Sudamérica, Centroamérica y México, donde la transmisión es principalmente por el vector triatomino. Según la OMS estima que existen diez millones de personas infectadas con el parásito *Trypanosoma cruzi* en el mundo y que cincuenta mil nuevos casos se informan cada año, sin mencionar que millones de personas en condiciones de pobreza se encuentran en riesgo de contraer esta enfermedad [46].

Su epidemiología tiene prevalencia en el continente Americano desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina [44], aunque en los últimos años, la rapidez de los viajes en avión y las migraciones han llevado a la exportación de casos de la enfermedad de Chagas fuera de América, a países como Alemania, Australia, Canadá, España, Francia, Italia y Japón [46].

Actualmente se han reportado casos de tripanosomiasis americana en otras partes del mundo debido principalmente a las migraciones (Fig.4). Las personas están siendo contagiadas por transfusiones sanguíneas pues los bancos de sangre no contemplaban entre sus exámenes rutinarios la detección de la enfermedad de Chagas, por lo tanto la distribución de la enfermedad se ha extendido y existen personas afectadas en diferentes partes del planeta; uno de estos países es España, pues este país cuenta con el mayor número de personas procedentes de América Latina después de Estados Unidos y es el país europeo con más casos confirmados de enfermedad de Chagas. La Fundación Mundo Sano estima que en España existen aproximadamente cuarenta mil personas infectadas de tripanosomiasis y doce mil mueren cada año.

Flujo de migraciones de América Latina hacia regiones no endémicas para la enfermedad de Chagas

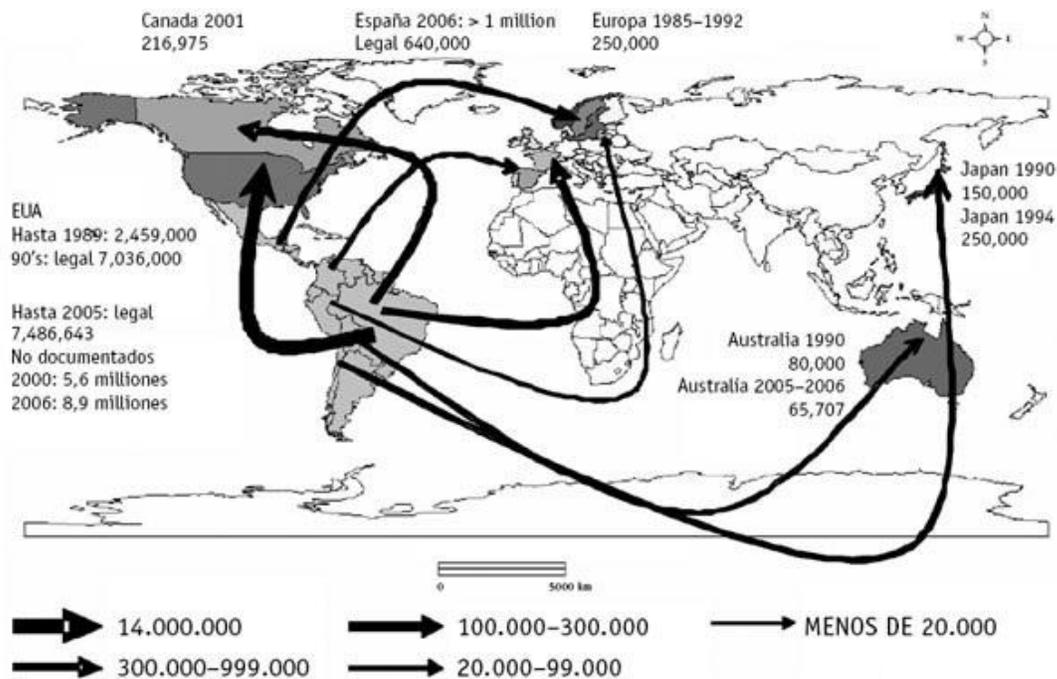


Figura 4.- Distribución mundial de la enfermedad de Chagas y los flujos a nuevos sitios, debido a las migraciones de zonas endémicas a otras que no lo son [42].

1.10. Ciclo biológico

La enfermedad de Chagas se transmite a los seres humanos por un artrópodo triatomino o “chinche besucona” que porta el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico). El ciclo de vida de este parásito da inicio cuando el artrópodo infectado, excreta material fecal sobre la piel del hospedero mientras lo pica en la zona de la cara o boca para succionar su sangre, transmitiéndole el parásito después de defecar en la herida, el prurito causado por la lesión cutánea de la picadura facilita el contacto de los parásitos con la lesión contagiando con la fase infectiva (tripomastigote metacíclico), por vía hematogena entra al epitelio internalizándose y diseminándose por los vasos sanguíneos, hasta las células del sistema inmune (macrófagos) donde se multiplica intracelularmente como amastigote (sin flagelo), el parásito se libera al torrente sanguíneo por lisis de los Mo infectados; en el torrente sanguíneo de los reservorios mamíferos u hospederos lleva a cabo modificaciones morfológicas, originando dos

formas intermedias (promastigote y epimastigote) para finalmente formar la fase de tripomastigote sanguíneo mediante la cual llega a diferentes tejidos (corazón, hígado, cerebro y músculo) después pierden el flagelo y se convierten en amastigotes pequeños y ovalados y se multiplican por fisión binaria y acaban por destruir las células del hospedero [47] (Fig. 5).

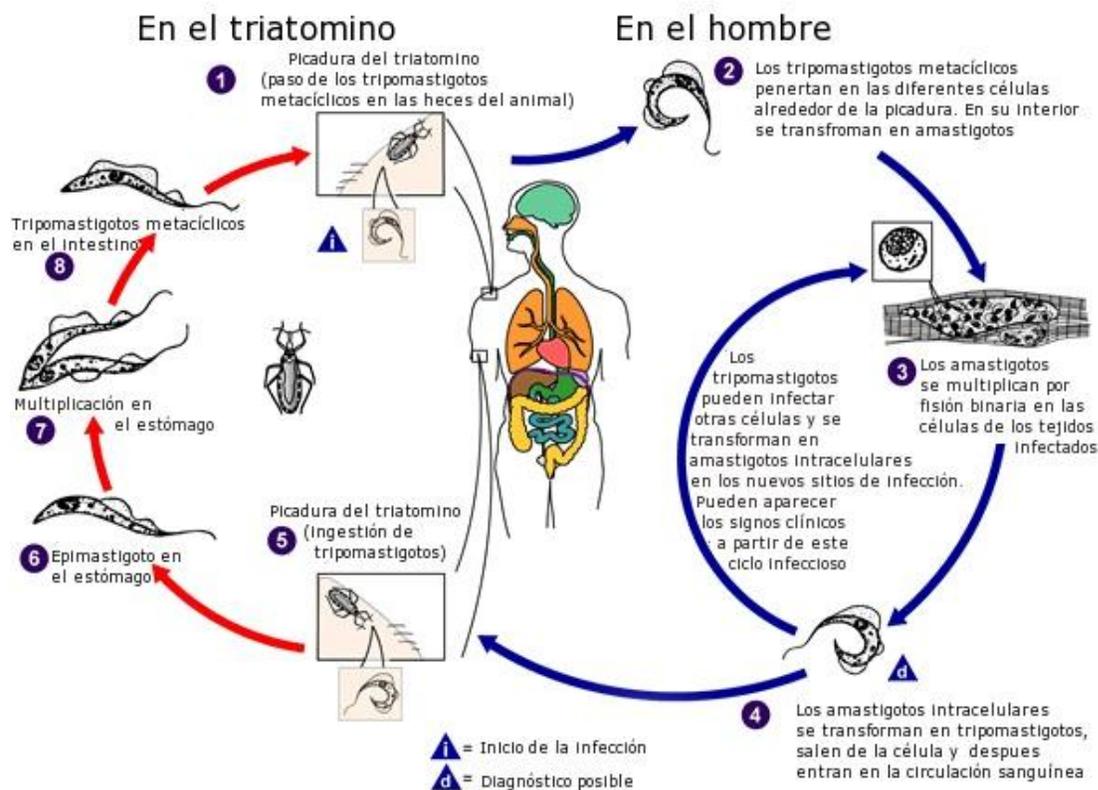


Figura 5.- Ciclo biológico de *T. cruzi* causante de la enfermedad de Chagas, en el que participan el vector triatomino y el hospedero humano [41].

El parásito *T. cruzi* es un protozoo de la clase *Zoomastigophora* y de la familia *Trypanosomatidae* el cual tiene un complejo ciclo biológico y durante su evolución adopta tres aspectos morfológicos: tripomastigote, amastigote y epimastigote. En el ciclo biológico participan como hospederos, mamíferos y como vectores, los insectos triatominos. Esta zoonosis puede hallarse en diferentes tipos de chinches triatominas que ocupan grietas y hendiduras de casas habitación o en los techos de paja u otros materiales de relleno similares de las viviendas rurales.

El último estadio es retomado por el vector hematófago directamente del hospedero, a través de su aparato bucal, cerrando el ciclo de infección, el individuo infectado desarrolla la enfermedad progresiva dando inicio con una etapa aguda que se caracteriza por una respuesta inflamatoria del tejido cutáneo y la presencia del parásito en la sangre (Fig. 6), la fase intermedia caracterizada por ser asintomática y sin presencia del parásito en sangre, finalmente la fase crónica en la que se manifiesta un aumento del bazo y el corazón pero no hay presencia de parásito en sangre pero si hay parásitos en corazón y otros órganos. El 15% al 30% de las personas en la fase crónica presentan afecciones en músculo cardiaco y en sistema digestivo [46].



Figura 6.- Micrografía electrónica de eritrocitos y *T. cruzi* en fase tripomastigote metacíclico en torrente sanguíneo, imagen tomada con un microscopio electrónico de una muestra de sangre humana con tripanosomiasis [48].

1.11. Inmunología de la enfermedad

La tripanosomiasis genera concentraciones elevadas de inmunoglobulinas IgM en sangre, no se sabe si esto se debe a estímulos antigénicos nuevos o por cambios que el parásito puede estar efectuando con influencia directa en las células del sistema inmunitario. Dentro de los mecanismos de defensa que protegen a un individuo de agentes infecciosos, se pueden encontrar dos formas conocidas de protección inmune: la respuesta humoral y la celular, donde a pesar de que cada una es una rama separada de

la otra ambas están íntimamente relacionadas ya que tienen una interacción entre las células efectoras con los anticuerpos (Ab) producidos y sus receptores de acción [49].

Los estudios de la respuesta inmunológica de la enfermedad de Chagas comienzan con la búsqueda de Ab y la fijación de complemento en 1913 por Machado y Guerreiro en Brasil, Freitas y Almeida en 1949 usaron epimastigotes *in vitro* para obtener antígenos, Maekelt en 1960 logró fragmentar los epimastigotes congelando y descongelándolos, posteriormente otros investigadores variaron ligeramente esta técnica, la misma técnica sirvió durante mucho tiempo para fines de laboratorio clínico en la identificación de anticuerpos contra la enfermedad [50].

La obtención de Ab cambia drásticamente cuando Paulone y Segura en 1976 obtienen fracciones subcelulares con ruptura de tripanosomas por presión y descompresión, regulada en ambiente anaeróbico, y el aislamiento por centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa. Con esta técnica lograron fracciones de núcleo, mitocondrias y microsomas. Actualmente se han realizado estudios más especializados con técnicas de inmunodiagnóstico de gran valor para evaluar la infección por *T. cruzi* a través de la detección de anticuerpos séricos (IgG e IgM), se debe recordar que es en la etapa crónica en la cual los parásitos permanecen en los tejidos en estado latente, por lo que la IgG permanecerá positiva por el resto de la vida, motivo por el cual es muy importante considerar el título de IgG. La presencia de IgM, en cambio refleja una etapa aguda y primoinfección de la parasitosis [51].

Para determinar la presencia de anticuerpos (IgG, IgM, IgA, IgE) en la enfermedad de Chagas se pueden emplear una variedad de técnicas, entre ellas contra inmuno-electroforesis (CIEF), ensayo de inmunoanálisis (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Cada una de estas técnicas puede emplear distintos tipos de antígenos del parásito: somáticos (crudos o purificados), metabólicos (secretor-excretor), de superficie (parásito completo o secciones de éste). En clínica es de mucha utilidad el análisis de una curva serológica, que se obtiene evaluando en dos momentos la concentración de inmunoglobulinas para determinar la evolución de la respuesta inmune. Es de especial importancia en infecciones cuando se desea identificar una fase aguda [51].

Titto y Segura en 1983 estudiaron la respuesta a la linfoproliferación y revelaron que en pacientes chagásicos se registraban 79% de respuesta positiva, en voluntarios no chagásicos la respuesta fue de 17%. Los niveles de Ab contra *T. cruzi* se encontraron elevados en todos los estadios de la infección, y se conserva la etapa crónica, la distribución de los isotipos permanece invariable a lo largo de la enfermedad con una predominancia de la IgG2 y en menor medida IgG2b e IgG1. Se cree que la permanencia de los LB estimulados por el parásito puede tener importantes consecuencias cardiacas en la patología de la enfermedad [52].

En la infección por *T. cruzi* no está claramente definida la predominancia de alguno de los dos perfiles de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ya conocidas en otras parasitemias, ya que durante la fase aguda de la infección al igual que en la fase crónica es posible detectar citocinas de ambos tipos, con excepción de que en humanos como en animales de experimentación infectados con *T. cruzi* está disminuida la capacidad para producir IL-2 [53].

La respuesta inmune a *T. cruzi* depende de LTCD4⁺, LTCD8⁺ y células NK. Los LTCD8⁺ confieren protección a ratones deficientes de LTCD4⁺, mediante la producción de IFN- γ con efecto citotóxico sobre los Mo infectados [21].

Existen algunos informes que indican que el IFN- γ es un importante mediador de la resistencia, mientras que la neutralización de la producción endógena del IFN- γ incrementa la susceptibilidad en la fase aguda. Esto está reforzado por estudios donde se ha detectado que las cepas de ratones susceptibles a *T. cruzi* muestran una aparente disminución de citocinas de tipo Th1 después de 45 días y una temprana aparición de TNF- α [54].

También se ha demostrado que la administración de IL-12 y el incremento de IFN- γ reducen la carga parasitaria y alargan el tiempo de sobrevida en los ratones infectados [55]. Durante la fase aguda de la infección experimental con *T. cruzi* se produce activación policlonal de linfocitos conjuntamente con una intensa apoptosis de LB. Diferentes mecanismos apoptóticos controlan la decisión vida y muerte de LB durante la fase aguda de esta infección. La sobrevida de LB activados, secretantes de IgG

específica para antígenos parasitarios, se controla por LB vía Fas-FasL tanto *in vivo* como *in vitro* [56].

Los LB con menor grado de activación, secretan IgM antiparásito y sufren de apoptosis por muerte celular pasiva. Además, los ratones infectados presentan una marcada hipoplasia medular que afecta principalmente a LB inmaduros. Esta hipoplasia no se debe a una mayor migración de LB inmaduros a la periferia ya que los ratones presentan en bazo un porcentaje disminuido de los mismos. Los LB medulares de los ratones presentan un alto porcentaje de células apoptóticas [56].

Por otra parte la galectina-1 (Gal-1) producida por los LB, es capaz de regular la homeostasis inmunológica a través del reconocimiento de estructuras glicosiladas en la superficie de LT y en macromoléculas complejas situadas en las membranas celulares o en la matriz extracelular (MEC), capaces de conducir a los LT a la apoptosis y de disminuir la producción de IFN- γ . En resumen, el parásito induce una respuesta que conduce a un estado de inmunosupresión humoral y celular permitiéndole sobrevivir en el hospedador [57].

En el hospedador infectado con *T. cruzi*, la respuesta inmune protectora involucra principalmente la producción de Ab específicos y la activación de células fagocíticas por interferón- γ (IFN- γ). El efecto central del IFN- γ *in vivo* es la activación de la sintetasa inducible de óxido nítrico de los Mo (iNOS) y la generación de óxido nítrico (NO) que participa en la destrucción intracelular de los parásitos. En la infección aguda, la inducción de la respuesta Th1 es llevada a cabo por la IL-12, que estimula la producción de IFN- γ en células NK. El control de la respuesta Th1, podría ser el resultado de la menor activación de Mo, por la disminución de la carga parasitaria, y de la producción de IL-10 y del factor de transformación del crecimiento β (TGF- β). La respuesta protectora Th1 también juega un papel en el daño tisular y en las alteraciones de la respuesta inmune que se observan durante la infección [58]. La existencia de señales intracelulares que regulan el balance iNOS/arginasa en Mo y que se implican en el control y persistencia de *T. cruzi* en estas células permite controlar al parásito [59].

Además, Stempin y Cerban observaron en 2007 que el tratamiento con inhibidores anti-TK (tirosina cinasas), anti-PKA (proteína cinasa A) y anti-p38MAPK (mitogeno activador de proteínas cinasas) reducía la carga parasitaria de células adherentes de bazo (CAB) provenientes de ratones infectados con *T. cruzi*; de esta manera estas señales son también importantes *in vivo* para favorecer la replicación de *T. cruzi* dentro de Mo. Las señales intracelulares TK, PKA y p38MAPK involucradas en la inducción de arginasa mediada por un antígeno parasitario demuestra la importancia de estas señales para favorecer la proliferación del *T. cruzi* [8].

El papel central del IFN- γ en el control de la infección con *T. cruzi* es de gran importancia en la fase temprana, antes de que se alcancen niveles altos de parasitemias. En esta etapa se pone en evidencia tanto el incremento de susceptibilidad por la administración de anticuerpos anti-IFN- γ , como el retardo en la producción de IFN- γ en el bazo de los ratones BALB/c podría deberse a un nivel insuficiente de IL-12 y a la ausencia de cofactores eventualmente necesarios para la respuesta inmune [58].

También se ha encontrado una relación de la infección con *T. cruzi* con los niveles de IL-10 pues las cepas de ratón, BALB/c susceptibles a *T. cruzi*, mostraron una parasitemia mayor cuando aumentó la producción de IL-10, la tendencia de una mayor susceptibilidad a *T. cruzi* se observó en ratones BALB/c infectados con virus de hepatitis de ratón (MHV⁺) que dio como resultado niveles sanguíneos más altos de la parasitemia. En conjunto, estos datos indican que varias alteraciones de la respuesta inmune se producen debido a la infección crónica por el MHV⁺. El mantenimiento *in vitro* de las tasas de secreción de IFN- γ en presencia de una mayor concentración de IL-10 se ha observado que en la infección con *T. cruzi* los ratones se agravan con la infección de MHV⁺ [60].

Ratones con los genes bloqueados para IL-10(-/-) e infectados con *T. cruzi* tienen bajas parasitemias, pero el IFN- γ y el óxido nítrico (NO) se incrementan en comparación con el bazo de ratones WT. Cuando se les suministra a los ratones IL-10-/- y WT IL-10 recombinante resulta significativo el aumento de la parasitemia. Las células de bazo de ratones WT anti-IL-12 disminuyen la producción de IFN- γ y de NO, sugiriendo que la síntesis IFN- γ son más dependientes de la estimulación de la IL-12 [61].

La IL-10 se denominó, originalmente factor inhibitorio de la secreción de citocinas. Además de inhibir citocinas y bloquear la activación de Mo, puede inhibir la síntesis de TNF- α e IL-12 de los Mo y la IL-2 y el IFN- γ de los linfocitos [62].

Por el contrario, la IL-12 es esencial para la resistencia contra la infección de *T. cruzi*, debido a que estimula la síntesis de IFN- γ que a su vez activa a los macrófagos para que tengan un efecto parasiticida. La investigación de los ratones bloqueados para IL-12(-/-) han confirmado el papel importante de la IL-12 y el IFN- γ en el control de la parasitemia de *T. cruzi*. Sin embargo, no se ha investigado sobre si se ha dado un cambio hacia un tipo de respuesta Th2 en las citocinas producidas en estos ratones lo que podría haber contribuido a la gravedad de la infección de *T. cruzi* causada por la deficiencia de IL-12, esta es esencial para la generación de linfocitos contra el parásito y se produce IFN- γ , que a su vez activa a los mecanismos efectores parasiticidas, y también participa en el reclutamiento de linfocitos a los sitios de infección. La baja producción de IFN- γ en los ratones IL-12(-/-) al parecer se relaciona con la falta de IL-12, por lo que esta no se puede sustituir por cualquier otra citocina [63].

Las citocinas IL-1, IL-3 y TNF- α ejercen un efecto inhibitorio sobre la multiplicación parasitaria intracelular e inducen la liberación progresiva de NO en cultivos de miocitos cardiacos infectados con *T. cruzi in vitro*. Las células musculares cardiacas infectadas por *T. cruzi in vitro* conservan la capacidad de producir NO cuando se estimulan con las citocinas pro-inflamatorias IL-1 IL-3 y TNF- α , de manera similar a lo que se observa en otros sistemas cardiacos experimentales [64].

La liberación local de citocinas puede inducir la expresión de iNOS en miocitos cardiacos durante el rechazo de injerto miocárdico, infarto, miocarditis y miocardiopatías idiopáticas. No obstante que en la literatura existen evidencias de actividad cNOS e iNOS en los miocitos cardiacos, así como del efecto funcional que el NO ejerce sobre ellos, el papel de estas moléculas en la infección por *T. cruzi* aún no se conoce plenamente. Las citocinas IL-1 y TNF- α , producidas localmente por las células inflamatorias durante la infección por *T. cruzi in vivo*, ejercen un efecto modulador sobre la multiplicación del parásito dentro del citoplasma de los miocitos cardiacos *in vitro*. La correlación inversa entre la producción de NO y la carga parasitaria indica que

estas citocinas ejercen su efecto modulador, en parte, a través de la producción de NO [65].

En los Mo, la actividad tripanocida se ejerce a través de la producción de NO, estimulada por el IFN- γ . La importancia del NO en la resistencia natural contra *T. cruzi* se demostró por la exacerbación de la infección murina luego del tratamiento con N-nitro-L arginina-metil-éster (L-NAME), un inhibidor selectivo de la iNOS. El NO es un mediador esencial para una variedad de funciones cardíacas, aunque también se involucra en la disfunción del miocardio y se ha asociado con diferentes patologías. Los miocitos cardíacos expresan la enzima sintasa del NO (NOS), en forma constitutiva (cNOS) e inducida (iNOS) en respuesta al estímulo por diferentes citocinas. El aumento de la expresión de la iNOS en miocitos y en las células de los infiltrados inflamatorios cardíacos durante la infección experimental por *T. cruzi*, en asociación con las citocinas IL-1, IL-3 y TNF- α , lo cual sugiere su participación en la patogenia de la miocarditis chagásica [65].

La inhibición de arginasa condujo a una drástica reducción de la replicación del *T. cruzi* dentro de Mo [59]. El antígeno de *T. cruzi* favoreció *in vitro* la activación alternativa de Mo con una reducción significativa de arginasa, este perfil de activación alternativa se asoció con una capacidad funcional de estas células que permite el crecimiento intracelular del parásito. La inducción de MaaA podría ser un mecanismo de evasión a la respuesta inmune innata usado por *T. cruzi* para favorecer su instalación en el hospedero [66].

Para determinar el papel de MIF endógeno en la regulación de la respuesta inmune de hospedero contra la infección con *T. cruzi* se han utilizado ratones deficientes para el gen de MIF(-/-) los ratones MIF-/- tuvieron altos niveles de parasitemia en sangre y tejidos, desarrollaron daño grave del corazón e inmunopatología de músculo esquelético y murieron por la infección por *T. cruzi* más rápido que los ratones silvestres (MIF+/+) [23].

La mayor susceptibilidad de ratones MIF-/- a *T. cruzi* se asoció con niveles reducidos de citocinas pro-inflamatorias, tales como el TNF- α , IL-12, IL-18, el IFN- γ y el IL-1 β , en

sus sueros y la reducción de la producción de IL-12, IFN- γ y IL-4 por las células del bazo durante la fase temprana de la infección. Tomados en conjunto, los resultados mostraron que el MIF desempeña un papel importante en el control de la infección aguda de *T. cruzi*, el MIF endógeno es necesario tanto para una óptima producción de citocinas pro-inflamatorias y como de NO durante las primeras fases de la infección por *T. cruzi*. Los ratones MIF^{-/-} produjeron significativamente menos activación celular de NK por IL-12 e IL-18, la falta de producción de IFN- γ a principios de la infección en estos ratones puede explicarse por una inadecuada activación de las células NK, que son la fuente más importante de IFN- γ [23].

MIF es una citocina importante, que sirve como mediador durante las respuestas inmunes inflamatorias. Estudios anteriores han demostrado que la ausencia de MIF impide el desarrollo de la inmunidad innata protectora contra diversos parásitos intracelulares, tales como *Leishmania major*, *Leishmania mexicana* y *Toxoplasma gondii* [27].

Por otra parte, recientemente se ha descrito que ratones que carecen de la vía de señalización STAT6 desarrollan una respuesta de tipo Th1 asociada con aumento de macrófagos y citocinas pro-inflamatorias después de la infección de *Taenia crassiceps*, que limita el crecimiento del parásito, sugiriendo que la activación de la respuesta Th1 es necesaria para el desarrollo de la inmunidad protectora contra este parásito [67].

1.12. Tratamiento para la enfermedad de Chagas

Es un poco decepcionante hablar de un posible tratamiento ante la enfermedad de Chagas pues los únicos agentes terapéuticos usados son el benznidazol y el nifurtimox que han estado en uso por más de 40 años y son extremadamente tóxicos provocando anorexia, cefalea, dermatitis, excitación síquica, gastralgia, insomnio, mareos, polineuropatía, depleción medular y vómitos; además sólo en algunos de los casos son efectivos en la etapa aguda de la enfermedad, que por lo regular no se diagnostica correctamente a tiempo y muchos casos se confunden con otras causas hasta que pasan diez o veinte años cuando ya es incurable. Algunas personas infectadas después de muchos años manifiestan graves daños en el corazón (41%), el colon (3%) y el esófago

(11%), en este período de infección crónica es donde se toma conciencia que se padece la enfermedad pues es evidente que el paciente manifiesta una alteración orgánica irreversible cuando se dilata el órgano afectado (megacolon, megaesófago) y el agrandamiento del órgano indica que se está atrofiando por una inflamación crónica [68].

Los dos fármacos suprimen la parasitemia y actúan eficazmente durante las primeras fases de la infección, pero una vez que el parásito migra a órganos es más difícil actuar terapéuticamente. En los casos avanzados puede ser necesario el tratamiento sintomático solamente, ya que no es posible una cura pues la insuficiencia cardíaca responde a la digoxina y a los diuréticos pero no elimina el parásito [69].

También es necesario administrar medicamentos antidisrítmicos, ocasionalmente en situaciones de urgencia, pues están contraindicados los bloqueadores de los β -adrenorreceptores. El bloqueo auriculoventricular completo y el síndrome sinusal responden a la implantación de un marcapasos, mientras que el megaesófago y el megacolon pueden requerir tratamiento quirúrgico; esta ausencia de medicamentos eficaces para el control de la infección ha promovido el desarrollo de nuevas formulaciones. Dentro de estos estudios, destaca el uso de los inhibidores de las proteasas de cisteína con efectos directos sobre la cruzipaina, esencial para el crecimiento del parásito [70].

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación simultánea del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) y el traductor de señal y activador de la transcripción (STAT)-6 en la respuesta inmune en un modelo murino de infección por *Trypanosoma cruzi*.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el curso de la infección mediante el monitoreo de las cargas parasitarias en sangre de ratones silvestres, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 parásitos de *T. cruzi*.
2. Determinar la sobrevida en ratones silvestres (WT), MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados con *T. cruzi*.
3. Determinar la producción de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en el suero de ratones WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados con *T. cruzi*.
4. Establecer una correlación entre la producción de citocinas, la mortalidad y la ausencia de MIF/STAT6 en la infección por *T. cruzi*.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

En la infección por *T. cruzi* se requiere de la participación simultánea de MIF/STAT6 para inducir una respuesta protectora dependiente de una respuesta mixta Th1-innata/Th2.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

4.1.1. Animales

Se utilizaron ratones macho con fondo genético BALB/c (Fig. 7) de 6 a 7 semanas de edad los cuales fueron obtenidos de Harlan Sprague Dawley Inc. USA reproducidos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I), provistas de alimento y agua *ad libitum*, el agua fue tratada con generación de ozono, el alimento y el aserrín fueron esterilizados; los ratones se colocaron en cajas con filtro para evitar alguna contaminación. Se utilizaron los ratones WT así como los que carece de la expresión de un gen en particular: el gen de MIF(-/-), el gen de STAT6(-/-) y los dobles deficientes para los genes MIF/STAT6(-/-).



Figura 7.- Ratón singénico de fondo genético BALB/c tanto WT como las variantes del gen bloqueado para MIF(-/-, STAT6(-/- y MIF/STAT6(-/- en cada grupo experimental.

4.1.2. Parásito

Se utilizaron tripomastigotes sanguíneos del protozooario *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro de infectividad media, donados por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB), sede del tercer circuito exterior edificio "B" 1^{er} piso, laboratorio B-114, que pertenece al Subsistema de la Investigación Científica (SIC) y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Ciudad Universitaria (CU) (Fig. 8).



Figura 8.- *Trypanosoma cruzi* cultivado *in vitro* en medio BHI, amplificado 100X en microscopio óptico (UNICO G308) preparado por citocentrifugación (Hermle Z300 cytospin) con tinción de Wright-Giemsa (ver apéndice).

4.2. Reactivos

ABTS sustrato (2,2'-azino-di [3-etil-benzotiazolin sulfonato) (INC Biomedicals)

Ácido acético glacial (CH_3COOH) (JT Baker)

Ácido bórico (H_3BO_3) (JT Baker)

Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (Tecsiquim)

Ácido clorhídrico (HCl) (JT Baker)

Ácido fosfórico (H_3PO_4) (JT Baker)

Ácido fosfomolibdotungstico ($3\text{H}_2\text{OP}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ $3\text{H}_2\text{OP}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich Co.)

Agar infusión cerebro-corazón (BHI) (Bioxon)

Agar nutritivo (Sigma)

Albúmina sérica bovina (BSA) (INC Biomedicals)

Alcohol isoamílico ($\text{C}_5\text{H}_{11}\text{OH}$) (JT Baker)

Alcohol isopropílico ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) (JT Baker)

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) (JT Baker)

Cloroformo (CHCl_3) (JT Baker)

Cloruro de magnesio (MgCl_2) (Sigma)

Cloruro de potasio (KCl) (ICN Biomedicals Inc.)

Cloruro de sodio (NaCl) (JT Baker)

Colorante de Wright (Sigma)

Colorante Giemsa (Sigma)

Dextrosa ($C_6H_{12}O_6$) (DB Becton Dickson)
Dodecilsulfato sódico (SDS) (JT Baker)
Etanol (CH_3CH_2OH) (JT Baker)
Etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA) (JT Baker)
Fosfato disódico (Na_2HPO_4) (JT Baker)
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) (JT Baker)
Glicerol ($C_3H_8O_3$) (JT Baker)
Heparina ($C_{12}H_{19}NO_{20}S_3$) (MicroLab)
Hidrofosfato disódico ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (JT Baker)
Hidróxido de sodio (NaOH) (Monterrey)
Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (HyClone)
Metanol (CH_3OH) (JT Baker)
Naftiletildiamina dihidroclorhídrica (NED* 2HCl)
Óxido nítrico (NO) (JT Baker)
Penicilina-estreptomicina (Gibco)
Peroxido de Hidrogeno (H_2O_2) (JT Baker)
Streptoavidina/peroxidasa (INC Biomedicals)
Sulfanilamida ($C_6H_8SO_2N_2$) (JT Baker)
Sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) (JT Baker)
Tartrato de sodio y potasio ($KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) (JT Baker)
Tris base, tris(hidroximetil)aminometano ($(HOCH_2)_3CNH_2$) (Sigma Chemicals)
Tween 20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$) (Promega co.)

4.3. Equipo

4.3.1. Peso

Se utilizó una balanza analítica de un plato con sensibilidad de 0,1 mg (Citizen CX220) para medir el peso de los reactivos y una balanza granataria de un plato (Ohaus Triple Beam 700/800) para medir el peso de los ratones.

4.3.2. Microscopía

Se utilizó microscopio óptico (UNICO G308) con luz visible no polarizada con adaptador para cámara fotográfica, enfocando con objetivo de 40X para cinética parasitaria y 100X para el detalle del parásito y microscopio invertido óptico (UNICO IV900) con luz visible no polarizada con adaptador para cámara fotográfica, enfocado con objetivo de 40X para la revisión de las placas de cultivo.

4.3.3. Cinética

Se utilizó una cámara Neubauer (Sigma) para el conteo los parásitos presentes en sangre, en los cuatro cuadrantes secundarios de los bordes superiores e inferiores de la cámara donde se realiza el recuento de leucocitos.

4.3.4. Alícuota

Se utilizaron micropipetas automáticas de volumen variable (Eppendor) de 0.5 μ l – 20 μ l, 10 μ l – 100 μ l y 100 μ l – 1000 μ l con puntas desechables de polipropileno para todos los casos.

4.3.5. Incubación

Se utilizó la incubadora profesional (Sanyo MCO17AC) con inyección de CO₂ al 5% y una temperatura controlada de 37°C, utilizada para los cultivos de esplenocitos.

4.3.6. Centrifugación

Se utilizaron tres tipos de centrifugas la primera (Eppendor 5418) para la obtención del suero de la vena caudal de los ratones y para el PCR, la segunda (Hermle Z383K) para obtener el sobrenadante del cultivo de los esplenocitos y la obtención del antígeno total de *T. cruzi* y la tercera (Hermle Z300 cytospin) para realizar la citocentrifugación del parásito.

4.3.7. Lector

Se utilizó el lector óptico de placas (Mertertech S960) de microtitulación fondo en U de 96 pozos (matriz de 8 por 12) con un rango de volumen promedio comprendido entre 25 μ l y 50 μ l por pozo para la cuantificación por absorbancia de las citocinas por el método

de ELISA y la cuantificación por absorbancia de NO por la reacción de Griess. También se utilizó el espectrofotómetro (Biomate 3) para medir la concentración proteínica por el método de Lowry modificado del antígeno soluble de *T. cruzi*.

4.3.8. Termociclador

Se utilizó el termociclador (Bioer TC-XP) para realizar el método de PCR puntual en la confirmación de la carencia del gen de los ratones utilizados.

4.3.9. Cabina

Se utilizó la cabina de flujo laminar (Telstar BV100) para la preparación del antígeno total de *T. cruzi* y para la producción de los cultivos de esplenocitos de ratón. También se utilizó la cabina cerrada (UVP) para trabajar las muestras con el método de PCR.

4.3.10. pH

Se utilizó el medidor de pH (Hanna instruments pH 211) con intervalo de 0 a 14 y 0.01 resoluciones, para medir los distintos valores de pH de las disoluciones utilizadas en este trabajo experimental.

4.3.11. Fotografía

Se utilizó la cámara fotográfica digital (Canon PowerShot S40) de 4.0 mega píxeles para las fotografías tomadas en este trabajo experimental.

4.3.12. Esterilización

Se utilizó la autoclave vertical (Figursa AV2550) a 15 libras de presión de vapor de agua durante 15 minutos para esterilizar los medios de cultivo y las soluciones que así hayan sido requeridas.

4.3.13. Calentamiento/Agitación

Se utilizó la placa de calentamiento y agitación (Corning PC420) para preparar las disoluciones requeridas durante el trabajo experimental.

4.4. Métodos

4.4.1. Confirmación de la ausencia del gen por PCR

En todos los animales se confirmó de la ausencia del gen de MIF, STAT6 y MIF/STAT6 por PCR puntual siguiendo el protocolo descrito por Lair [71]. Cuando los ratones tuvieron entre 6 y 7 semanas de edad se utilizó material nuevo y limpio libre de DNAsas-RNAsas para cortar 0.5 cm de la parte final de la cola de cada uno de los ratones de cada grupo y esta porción se colocó en tubos Eppendorf de 1.8 ml de capacidad, marcados con el respectivo grupo, a los cuales se les colocó 500 µl de solución de lisis (ver apéndice) [71] y 20 µl de protein K (in vitrogen 100 µg/ µl) se incubó toda la noche a 55° C. Posteriormente, se centrifugó (Eppendor 5418) a 11000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol (JT Baker) frío, invirtiéndolos hasta hacer evidente la precipitación del DNA, nuevamente se centrifugó a 11000 rpm durante 5 segundos para separar con fenol/cloroformo (JT Baker) el DNA, se decantó el sobrenadante para proceder al lavado del botón del DNA con etanol (JT Baker) frío al 75% para después centrifugar (Eppendor 5418) a 11000 rpm durante 5 minutos desechando el sobrenadante y se evaporó el etanol del tubo a temperatura ambiente por 1 hora. Se resuspendió el botón con 200 µl de H₂O mQ. Se utilizaron los cebadores (primers) (Tab. 1) para la amplificación de los genes de MIF y STAT6, así como del gen insertado de neomicina (Neo), que se utiliza comúnmente para la selección de los fagos que acarrean la modificación del gen para la generación de los ratones KO.

Tipo	Dirección de secuencia del primer (5'-3')^a	Pares de bases (pb)	Número de ciclos
MIF	(F) AGACCACGTGCTTAGCTGAG (R)GCATCGCTACCGGTGGATAA	172	40
STAT6	(F) GGAGCCAATCCACTCCTTCC (R)CAGACTCCTCCTATGCTCCC	200	35
Neo	(F) CTGAATGAACTGCAGCAGGACGA (R)ATACTTTCTCGGCAGGAGCA	172	40

^a (F) forward primer, (R) reverse primer

Tabla 1.- Cebadores usados para la amplificación del gen que codifica para MIF, STAT6 y Neo usados en el análisis de PCR puntual para confirmar la ausencia del gen de MIF, STAT6 y MIF/STAT6.

Para llevar a cabo la reacción se utilizaron tubos libres de DNAsas-RNAsas de 0.2 ml con un volumen final de 25 μ l colocando los siguientes reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerasa, Sigma) consecutivamente bajo el siguiente orden (Tab. 2):

Reactivo	MIF	STAT6	Concentración por Rx
Amortiguador	2.5 μ l	2.5 μ l	1x
Mg Cl ₂	0.75 μ l	0.75 μ l	50 mM
dNTP's	1.0 μ l	1.0 μ l	10 mM
F	1.0 μ l	1.0 μ l	15 pM
R	1.0 μ l	1.0 μ l	15 pM
Red-Taq	0.5 μ l	0.5 μ l	2.5 U/ μ l
Muestra	18 μ l	18 μ l	100 pg
H ₂ O (Sigma)	1.0 μ l	1.0 μ l	cbp 25 μ l

Tabla 2.- Orden y concentración de los reactivos para la reacción de la polimerasa en la confirmación de la ausencia del gen MIF, STAT6 y MIF/STAT6 por PCR puntual en los ratones utilizados en los experimentos, usando termociclador (Bioer TC-XP) a 60° C.

4.4.2. Infección

Los ratones de todos los grupos BALB/c: WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} se infectaron vía intraperitoneal (i.p.) con 5×10^3 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* usando como vehículo solución salina 0.9% (Pisa) o amortiguador de fosfatos (PBS) (ver apéndice) y se evaluó el desarrollo de la parasitemia con intervalos de una semana hasta el día 56.

4.4.3. Peso corporal

Los animales fueron pesados (Ohaus Triple Beam 700/800) antes de la infección y posteriormente cada semana., registrando el peso por ratón de cada grupo BALB/c, con el fin de determinar cualquier variación durante el desarrollo de la enfermedad de Chagas.

4.4.4. Cinética de parasitemia

El número de parásitos en sangre de todos los grupos de ratones se evaluó con 5 μ l de sangre obtenida de la cola de cada ratón infectado, donde se diluyó a 1:50 en solución salina 0.9% (Pisa) con heparina (MicroLab) y se tomaron de esta solución 10 μ l para

llenar la cámara Neubauer (Sigma), se contaron los parásitos en cuatro cuadrantes para leucocitos, donde el número de parásitos por ml de sangre se obtuvo desarrollando la fórmula siguiente:

$$\text{[(No. de parásitos) (Dilución) /0.4ml] (1000)= No. de parásitos /ml de sangre}$$

4.4.5. Obtención de suero.

De todos los grupos experimentales se obtuvo sangre de la vena caudal, antes de la infección y posteriormente cada semana. Se mantuvo la sangre en hielo por 15 minutos para la retracción del coagulo y se centrifugo (Eppendorf Z383K) a 2500 rpm por 10 minutos para la separación del suero.

4.4.6. Método de ELISA

Se determinó la concentración de citocinas por método de ELISA-Sandwich tanto para los sueros obtenidos de los ratones BALB/c como para los sobrenadantes del cultivo de esplenocitos. Las placas de 96 pozos (Nunc) se sensibilizaron con 50 μ l del anticuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/ml de solución de Na_2HPO_4 (JT Baker) de pegado (ver apéndice) en cada pozo, se incubaron toda la noche a 4°C, después de la incubación se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% (ver apéndice), posteriormente se bloqueó con PBS-BSA 1% (ver apéndice) en cada pozo con 100 μ l y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente, terminado ese tiempo se lavaron cinco veces las placas con PBS-Tween 0.05%, posterior a ello se colocaron las interleucinas con recombinante murino para realizar las curvas por duplicado en las dos primeras filas de pozos en la placa de ELISA, con una concentración inicial de 2000 pg/ml se hicieron diluciones seriadas 1:2 y se dejó el último pozo como blanco (22 pozos y 2 blancos).

En el mismo proceso en el resto de los pozos se colocaron las muestras tanto de sueros como de sobrenadantes, en cada pozo se colocaron un mínimo de 25 μ l de muestra para cubrir el fondo de dicho pozo, se incubaron toda la noche a 4°C, después de la incubación se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y se procedió a diluir el segundo anticuerpo, anticuerpo-biotinilado con PBS-BSA 1% a una concentración de 1 μ g/ml y se adicionaron 100 μ l en cada pozo y se incubó 1 hora a 37°C, transcurrida la

incubación se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y a cada pozo se le agregaron 100 μ l de cromóforo estreptavidina/peroxidasa (INC Biomedicals) diluida 1:1500 en PBS-BSA 1%, se incubó a temperatura ambiente 30 minutos después se lavaron 5 veces con PBS-Tween 0.05% y se reveló con el sustrato peróxido de hidrogeno ABTS (INC Biomedicals) (ver apéndice) con 100 μ l en cada pozo durante 30 min (Fig. 10). Se leyeron las placas en un lector para ELISA (Mertertech S960) a una absorbancia de 405 nm, todas las muestras se analizaron por duplicado.

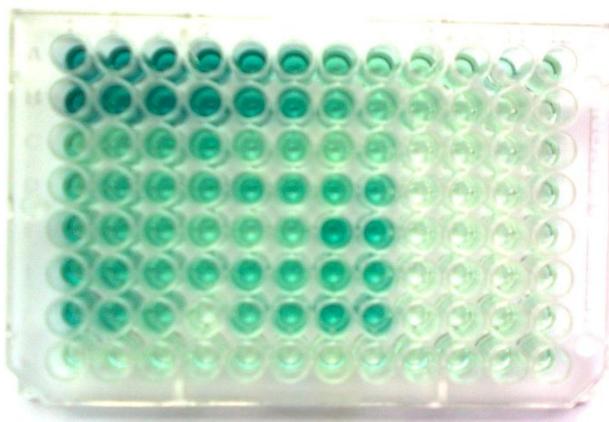


Figura 9.- Placa de ELISA-Sandwich de cuantificación de citocinas que muestra la curva estándar por duplicado y la concentración del análisis de las muestras obtenidas de los ratones WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} durante la infección.

4.4.7. Cuantificación de óxido nítrico

Se prepararon dos disoluciones: A (Naftiletildiamina dihidroclorhídrica 0.1%) y B (Sulfanilamida 5% en H₃PO₄ 3%) (ver apéndice) las cuales se mezclaron media hora antes del ensayo en igual volumen para obtener el reactivo de Griess [72], para cuantificar NO por la concentración de nitrito (NO₂⁻) presente en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos, posteriormente en una placa de 96 pozos (Nunc) se colocó 100 μ l de óxido nítrico (JT Baker) 0.01 M como curva de control y referencia se hicieron diluciones seriadas 1:2 para extrapolar las concentraciones obtenidas de las muestras, inmediatamente después se colocaron las muestras del sobrenadante celular añadiendo en cada pozo 100 μ l y 70 μ l del reactivo de Griess; se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la concentración en un lector de ELISA (Mertertech S960) a una absorbancia de 550 nm, todas las muestras se analizaron por duplicado.

4.4.8. Preparación del antígeno de *T. cruzi*

Para la obtención del antígeno de *T. cruzi* se cultivó el parásito *in vitro* en medio BHI (ver apéndice) a 28°C sin agitación durante dos semanas, después se centrifugó a 2500 rpm para eliminar el medio de cultivo. Se lavaron dos veces con PBS (ver apéndice) estéril. El botón de parásitos se resuspendió en 2 ml de PBS conteniendo inhibidores de proteasas (Sigma). Los parásitos se sometieron a congelamiento inmediato y descongelamiento a 36°C por lo menos diez veces para romperlos, confirmando al microscopio (UNICO G308) su destrucción. Estos se centrifugaron (Hermle Z383K) a 10000 rpm durante 30 minutos para separar el sobrenadante que se utilizó como antígeno soluble. La concentración proteínica se determinó por el método de Lowry modificado [73].

4.4.9. Cuantificación de proteínas

La concentración proteínica se determinó por el método de Lowry modificado. La reacción previa de la proteína en medio alcalino con iones Cu^{2+} en presencia de tartrato para evitar la precipitación, formó un complejo de coordinación entre el cobre y el nitrógeno peptídico. Después se realizó la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotungstico) (Sigma-Aldrich Co.), que se redujo por medio de los grupos fenol (en menor medida imidazol e indol) presentes en la proteína, se obtuvo un complejo de color azul oscuro, se midió la absorbancia colorimétricamente con el espectrofotómetro (Biomate 3) a una longitud de onda de 680 nm y una exactitud de ± 1.0 nm. El complejo coloreado problema o de la concentración proteica desconocida de la muestra estudiada estuvo acompañada de una curva de calibración que se hizo a partir de una disolución de albúmina sérica bovina (INC Biomedicals).

Se ajustó en la pantalla del espectrofotómetro (Biomate 3) la opción de curva estándar para la medición de proteínas por el método de Lowry, posteriormente se colocó la solución blanco (agua destilada) en la celda correspondiente del aparato para comprobar que estaba en cero, inmediatamente después se colocaron los estándares, se realizó la curva estándar y posteriormente se midieron cada una de las muestras problema para obtener la concertación.

4.4.10. Cultivo celular

Se realizó el cultivo celular de esplenocitos de ratón para determinar la producción de citocinas posterior a la infección. En una cabina de flujo laminar (Telstar BV100) se extrajeron las células esplénicas por perfusión del bazo de los ratones con medio DMEM (HyClone) estéril, las células se contaron en cámara de Neubauer (Sigma) y se ajustaron a 5×10^3 células por mililitro, se sembraron 100 μ l en placas de 96 pozos (Costar), 500 células/pozo. Las células se estimularon con 2 μ g/ml de Ag de *T. cruzi* o con 25 μ g de Ag soluble de *T. cruzi* (Fig. 9). Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 5 días, después se realizó un centrifugado (Hermle Z383K) de 2500 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante de cada cultivo, en condiciones estériles los sobrenadantes se congelaron a -70°C (Revco ULT1386SA36) para su posterior análisis por el método de ELISA-Sandwich.

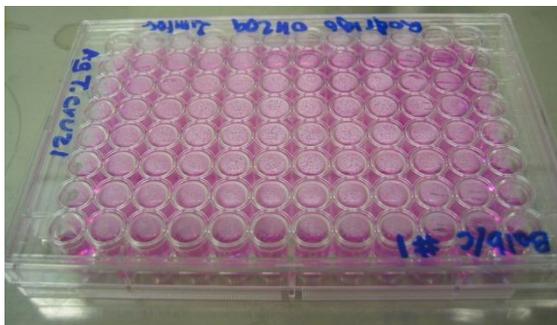


Figura 10.- Placa de cultivo de esplenocitos re-estimulados con Ag total de *T. cruzi* incubada a 37° C con inyección de CO₂ a una concentración del 5% durante 5 días.

4.4.11. Análisis Estadístico

El diseño estadístico se basó en las comparaciones de las citocinas determinadas entre los diferentes grupos considerados en este experimento, y se llevaron a cabo mediante la prueba Log-Rank (Graph Pad Prism 5) para la supervivencia y “t” de student de dos colas no pareada (Graph Pad Prism 5) para las citocinas y la parasitemia. Se utilizó un coeficiente de confiabilidad del 95%, se consideraron significativas las comparaciones con valores de $P < 0.05$ y se graficaron los resultados con el programa Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.).

RESULTADOS

5.1. Parasitemia

Una vez infectados los ratones de los cuatro grupos con *T. cruzi* se siguió el desarrollo de la infección a través de la determinación de la carga parasitaria semanalmente y con cada uno de los cuatro grupos experimentales hasta el día 56 post-infección.

El número de parásitos encontrados en la infección con *T. cruzi* de los ratones BALB/c, tanto silvestres como MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} se puede observar en la gráfica (Fig. 11). A mayor concentración de tripomastigotes presentes en la sangre al día 28 se encontró en los ratones MIF/STAT6^{-/-} una cantidad de 5 a 8 millones de parásitos/ml de sangre (p/ml), le siguieron los ratones STAT6^{-/-} con aproximadamente 3 millones de p/ml, luego los MIF^{-/-} con aproximadamente 2 millones de p/ml y por último los ratones WT con aproximadamente 1 millón de p/ml.

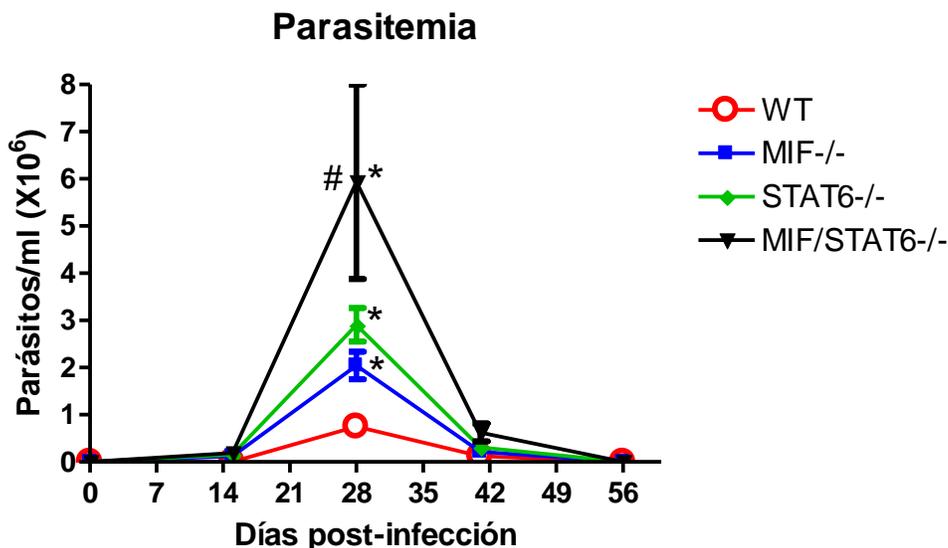


Figura 11.- Número de tripomastigotes sanguíneos. Tripomastigotes por mililitro de sangre en los cuatro grupos de ratones infectados con *T. cruzi*: WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} y monitoreados antes de la infección (día 0) y cada semana hasta el día 56 post-infección. El gráfico es representativo de los resultados observados en tres experimentos, n=5 para cada experimento, *Diferencias con respecto al WT; # diferencias entre MIF/STAT6^{-/-} vs MIF^{-/-} y STAT6^{-/-} (P < 0.05 “t” de student, Graph Pad Prism 5).

Los resultados obtenidos de esta determinación mostraron que la carga parasitaria en el torrente sanguíneo fue incrementándose progresivamente conforme avanzaba la infección, en todos los grupos encontramos que llegó a un pico máximo en el día 28 pero el número de parásitos varió según el grupo analizado.

5.2. Determinación de la sobrevivida

Para poder comparar la susceptibilidad a *T. cruzi* en cada uno de los grupos, se determinó el porcentaje de ratones que sobrevivieron en los días posteriores a la infección, en la gráfica (Fig. 12) se muestran los resultados de la sobrevivida de los ratones de dos experimentos: los ratones WT con el 100% de sobrevivida, los ratones MIF^{-/-} tuvieron una sobrevivida del 88.46%, los dobles KO MIF/STAT6^{-/-} tuvieron una sobrevivida del 33.33%, mientras que los STAT6^{-/-} solo del 19.96% al final del experimento.

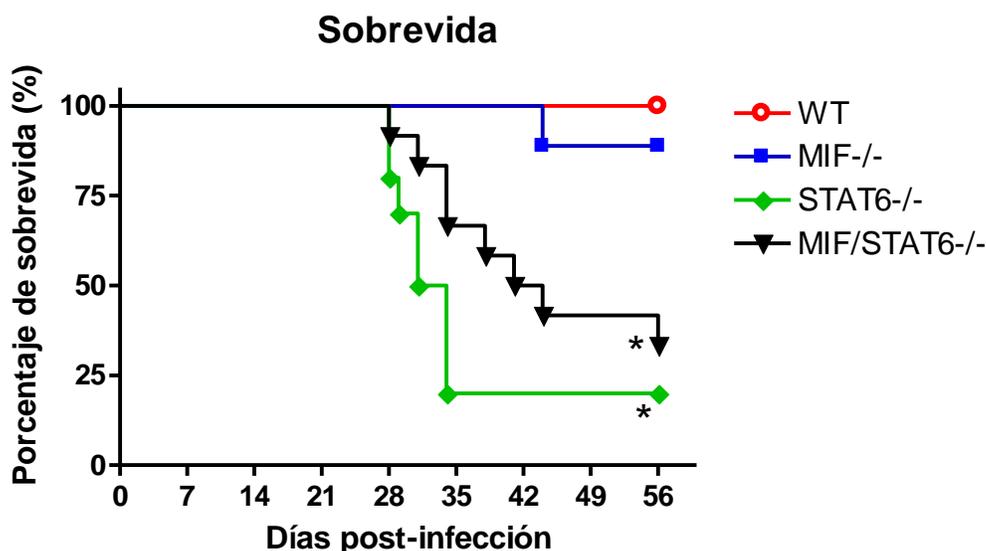


Figura 12.- Porcentaje de sobrevivida. Porcentaje de ratones WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} que sobrevivieron a la infección vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*, determinada en el día 56 post-infección. La gráfica representa el promedio de cada grupo de dos experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT (P < 0.05 Log- Rank, Graph Pad Prism 5).

Los datos anteriores demostraron la importancia de los dos tipos de respuestas Th1-pro-inflamatoria y Th2 anti-inflamatoria para el control de la mortalidad de los ratones

infectados con *T. cruzi*, ya que en los ratones deficientes para STAT6^{-/-} (Th2) ó en los dobles deficientes MIF/STAT6^{-/-} (Th2/Th1-pro-inflamatoria) se pudo observar que el porcentaje de sobrevivencia disminuyó significativamente.

5.3. Peso corporal

La variación de peso porcentual de los ratones de cada grupo experimental se registró conforme avanzó la infección de *T. cruzi*. La pérdida de peso respecto al peso inicial de los ratones (antes de la infección, día 0) fue similar en todos los grupos experimentales. Los cuatro grupos experimentales tuvieron un descenso en el peso posterior al día 14 post-infección. Pero también, todos los grupos experimentales registraron una ganancia de peso después del día 35 post-infección. Sin embargo, el grupo STAT6^{-/-} fue el que mayor peso perdió, seguido de los ratones STAT6^{-/-}/MIF^{-/-} y después los MIF^{-/-}. En la semana 47, la pérdida de peso de estos tres grupos fue estadísticamente significativa con respecto a los ratones WT infectados (Fig. 13), hasta el día 56 post-infección se midió la variación del peso corporal.

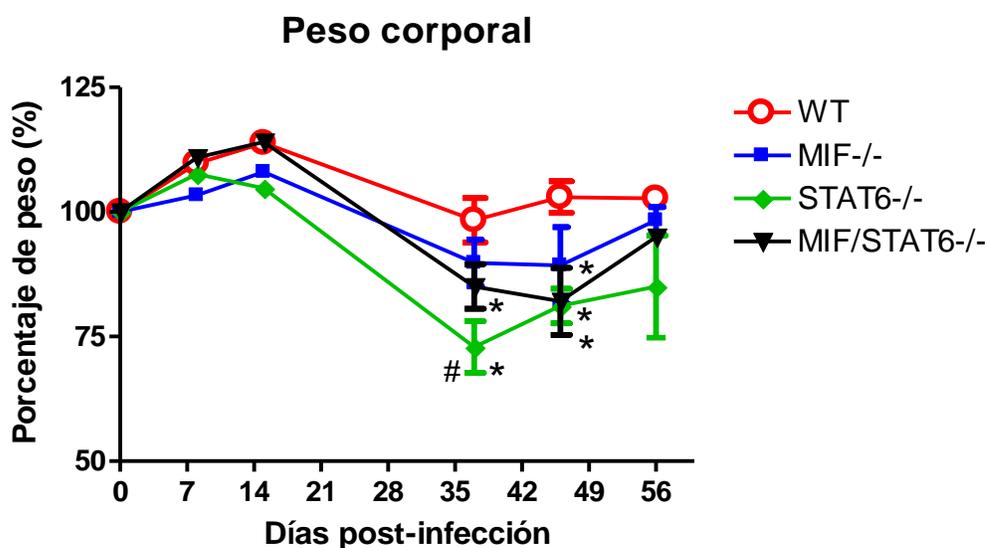


Figura 13.- Peso corporal porcentual post-infección. Cada punto representa la variación de peso porcentual de cada grupo de ratones WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. El gráfico es representativo de los resultados observados en tres experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT; # diferencias entre MIF/STAT6^{-/-} vs MIF^{-/-} ($P < 0.05$ “t” de student, Grad Pad Prism 5).

5.4. Citocinas pro-inflamatorias

En las siguientes gráficas se presentan los datos de las concentraciones de las citocinas pro-inflamatorias IL-12, IFN- γ y TNF- α obtenidas durante la evolución de la enfermedad de Chagas en el suero de los ratones BALB/c de cada uno de los cuatro grupos experimentales.

5.4.1. IL-12

La interleucina 12 es la citocina pro-inflamatoria que estimula a algunas células del sistema inmune para que secreten otras citocinas (IFN- γ) y favorece la proliferación de los linfocitos T. En la gráfica (Fig. 14) se puede apreciar que los ratones WT infectados con *T. cruzi* presentaron niveles incrementados de IL-12 en suero, con dos picos claros de éste incremento en el día 28 y 49 post-infección. El grupo de los ratones MIF^{-/-} también presentó un incremento de IL-12 en suero pero en menor medida con respecto a los WT. Mientras que en los ratones STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} la concentración de IL-12 en suero estuvo por debajo de los niveles de los WT y MIF^{-/-} después del día 14 post-infección.

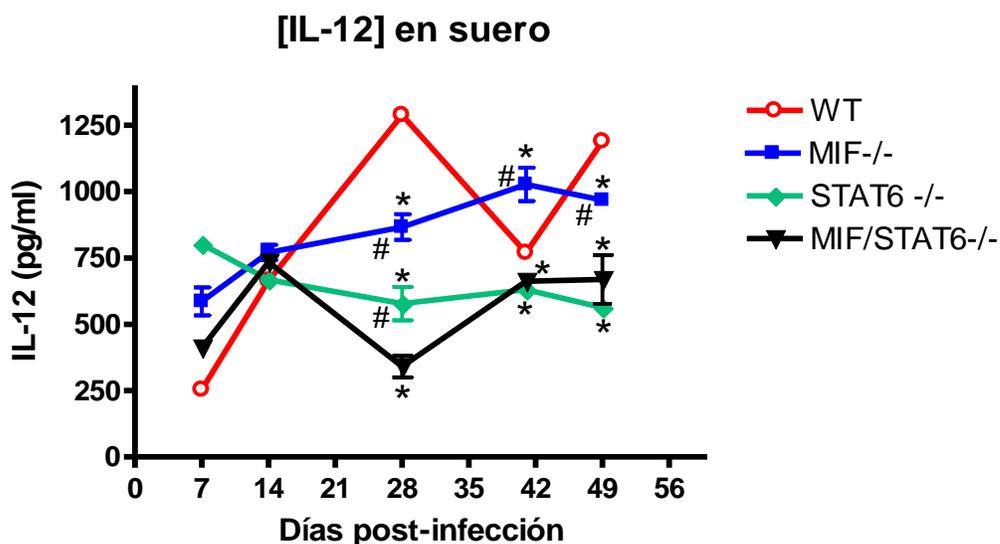


Figura 14.- Niveles de IL-12 en suero. Concentración de IL-12 expresada en picogramos por mililitro para cada uno de los cuatro grupos de ratones WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. Promedio de dos experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT, # diferencias entre MIF^{-/-} vs STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} (P < 0.05 “t” de student, Grad Pad Prism 5).

5.4.2 IFN- γ

En la gráfica (Fig. 15) se muestra la concentración de IFN- γ en suero de los cuatro grupos experimentales, WT, STAT6^{-/-}, MIF/STAT6^{-/-} y MIF^{-/-}. Como se puede apreciar en la gráfica los cuatro grupos experimentales incrementaron sus niveles de IFN- γ al inicio de la infección, hasta el día 14 pos-infección. Sin embargo para el día 28 la producción de IFN- γ disminuyó significativamente en los ratones MIF^{-/-}, en menor medida disminuyó en los ratones WT y STAT6/MIF^{-/-}, pero en los ratones STAT6^{-/-} el IFN- γ siguió incrementándose hasta el día 28 cuando todos los ratones de éste grupo murieron.

Con estos resultados podríamos inferir que los niveles incrementados de IFN- γ observados en el grupo STAT6^{-/-} podría haber contribuido a la mayor mortalidad observada en este grupo.

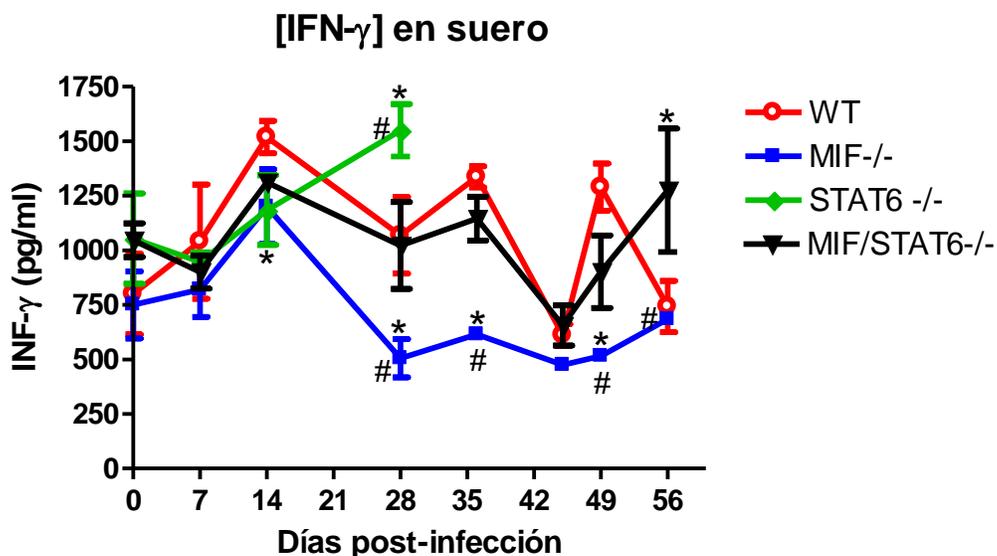


Figura 15.- Niveles de IFN- γ en suero. Concentración de IFN- γ expresada en picogramos por mililitro para cada uno de los cuatro grupos WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. Promedio de dos experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT, # diferencias entre MIF/STAT6^{-/-} vs MIF^{-/-} y STAT6^{-/-} (P < 0.05 “t” de student, Graph Pad Prism 5).

5.4.3. TNF- α

La concentración de TNF- α se incrementó significativamente en el grupo de ratones STAT6 $^{-/-}$ desde las primeras semanas post-infección hasta el día 28 cuando sucumbió el grupo. Este comportamiento no nos sorprendió, pues la ruta pro-inflamatoria está intacta y en consecuencia la producción de esta citocina se incrementó notablemente en comparación con los ratones WT y STAT6/MIF $^{-/-}$.

El grupo de ratones MIF $^{-/-}$ presentó niveles incrementados de TNF- α en el inicio de la infección y alcanzó su pico máximo en el día 28, seguida de una disminución drástica en el día 35 que se mantuvo hasta el final del experimento (Fig.16). El comportamiento inicial observado fue inesperado dado que la inhibición de MIF sugería una inhibición de TNF- α , pues está reportado que MIF favorece la producción de TNF- α [27].

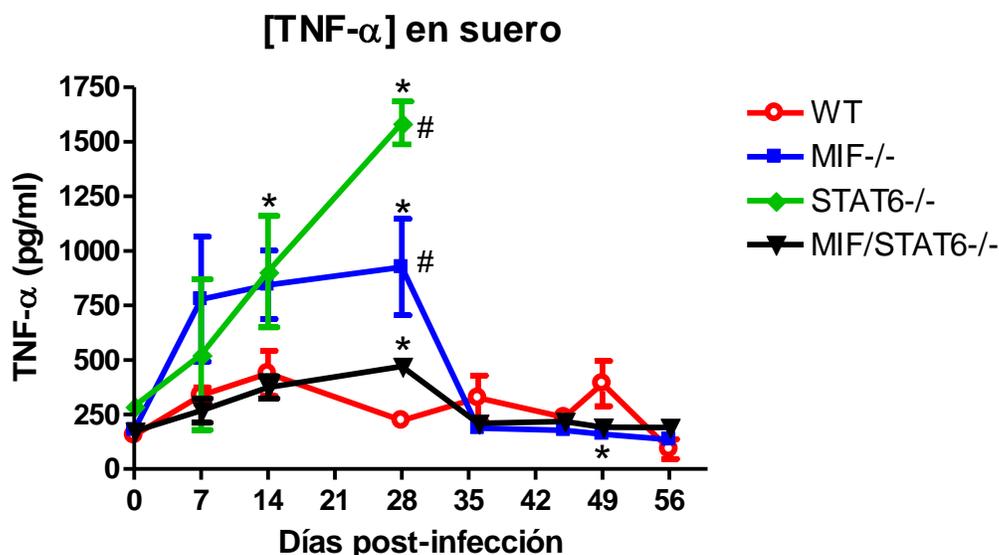


Figura 16.-Niveles de TNF- α en suero. Concentración de TNF- α expresada en picogramos por mililitro para cada uno de los cuatro grupos WT, MIF $^{-/-}$, STAT6 $^{-/-}$ y MIF/STAT6 $^{-/-}$ infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. Promedio de dos experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT, # diferencias entre MIF/STAT6 $^{-/-}$ vs MIF $^{-/-}$ y STAT6 $^{-/-}$ ($P < 0.05$ "t" de student, Graph Pad Prism 5).

Los ratones WT y STAT6/MIF $^{-/-}$ tuvieron niveles de TNF- α por debajo de los otros grupos dos grupos experimentales, STAT6 $^{-/-}$ y MIF $^{-/-}$. Aún cuando en los días 14 y 28 se observó un incremento en WT y STAT6/MIF $^{-/-}$ respectivamente, TNF- α disminuyó

en los tiempos posteriores de la infección, incluso por debajo de los niveles iniciales, aunque estas tendencias no fueron estadísticamente significativas.

5.5. Citocinas anti-inflamatorias

Se determinaron las concentraciones de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 que se analizaron durante la evolución de la enfermedad en el suero de los ratones de cada uno de los cuatro grupos.

5.5.1. IL-4

En la gráfica (Fig. 17) se puede observar la concentración de IL-4 en intervalos de 7 días en el transcurso de la infección. Los ratones WT infectados con *T. cruzi* presentaron dos incrementos significativos de IL-4, uno en el día 7 y otro en el día 35. Los STAT6^{-/-} tuvieron un incremento significativo de IL-4 únicamente en el día 35. Mientras que los ratones MIF^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} no observamos ningún incremento de IL-4 durante el transcurso de la infección.

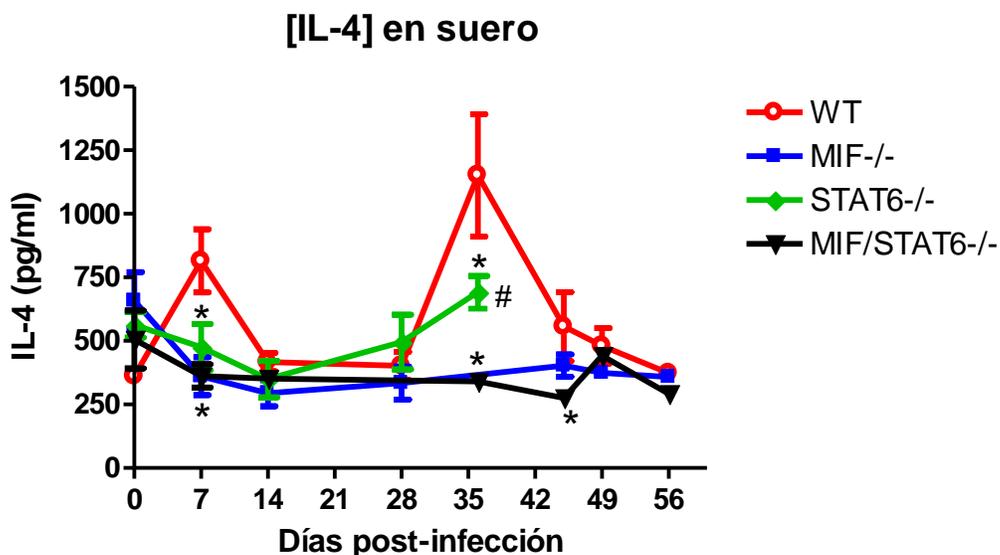


Figura 17.- Niveles de IL-4 en suero. Concentración de IL-4 expresada en picogramos por mililitro para cada uno de los cuatro grupos WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. Promedio de dos experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT (P < 0.05 "t" de student, Graph pad Prism 5).

5.5.2. IL-10

La concentración de IL-10 en suero fue igualmente determinada durante el curso de la infección en los mismos intervalos de tiempo que la IL-4. En la gráfica (Fig. 18) se puede observar que los niveles de IL-10, en los ratones MIF^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-}, disminuyeron desde el día 7 post-infección y alcanzaron sus niveles más bajos en el día 28 post- infección, para MIF^{-/-} con diferencias significativas con respecto a WT.

Los ratones STAT6^{-/-} y MIF^{-/-} mantuvieron los niveles iniciales de IL-10 hasta el 14 y 28 post-infección (respectivamente), pero para los días posteriores también se observó una reducción significativa de ésta citocina.

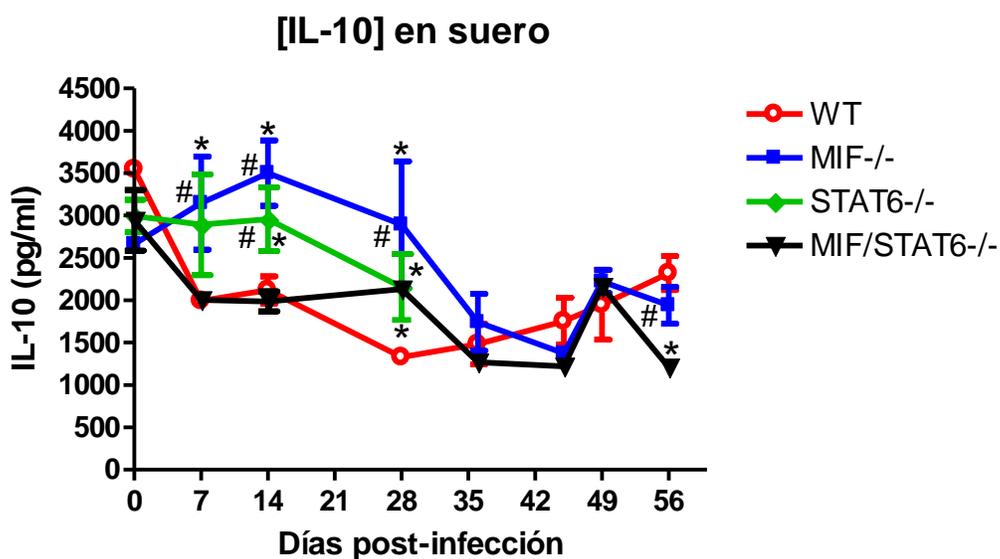


Figura 18.- Niveles de IL-10 en suero. Concentración de IL-10 expresada en picogramos por mililitro para cada uno de los cuatro grupos de ratones WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-} infectados vía intraperitoneal con 5×10^3 tripomastigotes de *T. cruzi*. Promedio de dos experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias con respecto a WT, # diferencias entre MIF/STAT6^{-/-} vs MIF^{-/-} (P < 0.05 “t” de student, Gradh Pad Prism 5).

5.6. Correlación de la concentración de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias

Con la finalidad de resumir los datos mostrados en las figuras anteriores se diseñaron las siguientes tablas comparativas de la concentración de citocinas en suero con la carga parasitaria o la sobrevivencia en los días 28 y 56 post-infección de los grupos de ratones

WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-}: en la tabla 3 se observó el número de parásitos y las concentraciones de citocinas en suero determinadas en el pico de la parasitemia; en la tabla 4 se observó la sobrevivida de los ratones con las concentraciones de citocinas en suero en el día 56 post-infección.

Tabla comparativa del número de parásitos y citocinas al día 28 post-infección

Grupo Experimental	No. de parásitos	IL-12 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
WT	1x10 ⁶	1250	1000	240	400	1400
MIF ^{-/-}	2x10 ⁶	800	500	750	380	3000
STAT6 ^{-/-}	3x10 ⁶	600	1400	ND	390	2000
MIF/STAT6 ^{-/-}	5.8x10 ⁶	250	1000	300	380	2000

Tabla 3.- Comparativo del número de parásitos y concentración de citocinas observado en el día 28 post-infección de cada uno de los cuatro grupos de ratones: WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-}. Representativa de dos experimentos.

Tabla comparativa de porcentaje de sobrevivida y citocinas al final del experimento

Grupo Experimental	Sobrevivida	IL-12 (pg/ml)	IFN- γ (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	IL-4 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)
WT	100%	1100	700	50	300	1900
MIF ^{-/-}	88.4%	1000	600	50	300	1800
STAT6 ^{-/-}	19.96%	500	ND	ND	300	ND
MIF/STAT6 ^{-/-}	33.3%	500	1200	50	300	1100

Tabla 4.- Comparativo del porcentaje de sobrevivida y la concentración de citocinas, observado al final del experimento, posterior a la infección de *T. cruzi* de cada uno de los cuatro grupos de ratones BALB/c: WT, MIF^{-/-}, STAT6^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-}. Representativa de dos experimentos.

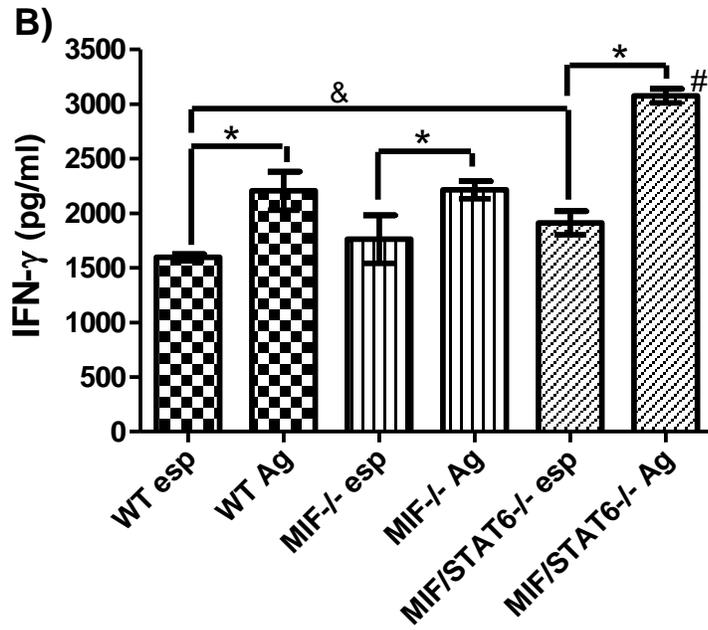
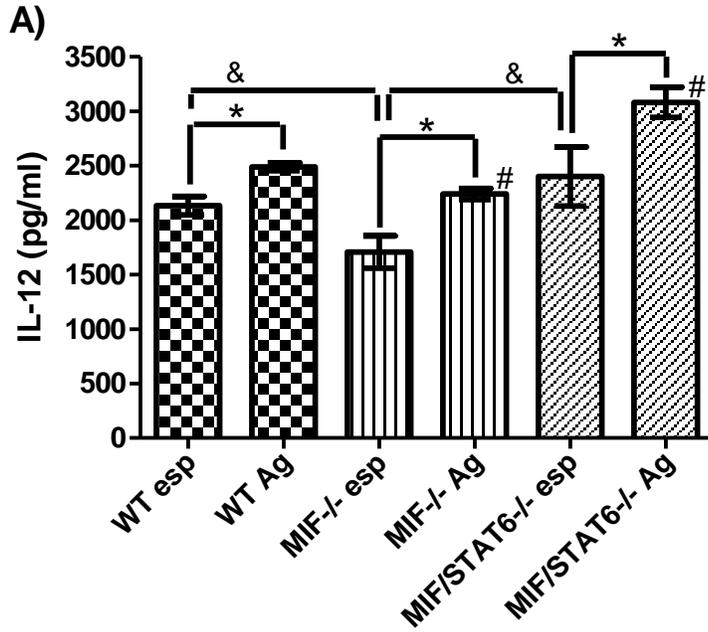
5.7. Producción de citocinas de células de bazo ante una re-estimulación *in-vitro* con antígeno total de *T. cruzi*

Con la finalidad de observar el impacto, a nivel de la respuesta inmune celular, de la deficiencia de MIF(-/-) y de STAT6/MIF(-/-), en el día 63 post-infección de *T. cruzi* se sacrificaron los ratones sobrevivientes para realizar cultivos de esplenocitos. Los esplenocitos de los ratones WT, MIF-/- y MIF/STAT6-/- (no se incluyó el grupo de ratones STAT6-/- debido a que murieron antes) fueron ajustados a 5×10^5 /ml y re-estimulado por 5 días con antígeno total de *T. cruzi* (TcAg), el sobrenadante de los esplenocitos sin estímulo se consideró como la producción espontánea (esp). La concentración de las citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10 se realizó por el método de ELISA-Sandwich mientras que la determinación de óxido nítrico (NO) por la reacción colorimétrica de Greiss [72].

5.7.1. Citocinas pro-inflamatorias

Se determinó la concentración de IL-12, IFN- γ y TNF- α en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos (Fig. 19A, 19B y 19C; respectivamente). Se observó una producción espontánea disminuida de IL-12 en el grupo de los ratones MIF-/- comparada con la respuesta espontánea de los ratones WT y los MIF/STAT6-/- (Fig. 19A), también se presentó una diferencia con respecto al re-estímulo de los tres grupos y entre sus mismos grupos con la respuesta espontánea.

Hubo diferencias en la producción de IFN- γ y TNF- α entre las respuestas espontáneas para WT y MIF/STAT6-/- (Fig. 19B, 19C). Con el re-estímulo del TcAg los esplenocitos produjeron más de las tres citocinas IL-12, IFN- γ y TNF- α en comparación con la producción espontánea. Los esplenocitos de los ratones MIF-/- presentaron niveles disminuidos de IL-12 en comparación con los ratones WT y los MIF/STAT6-/- re-estimulados (Fig. 19A).



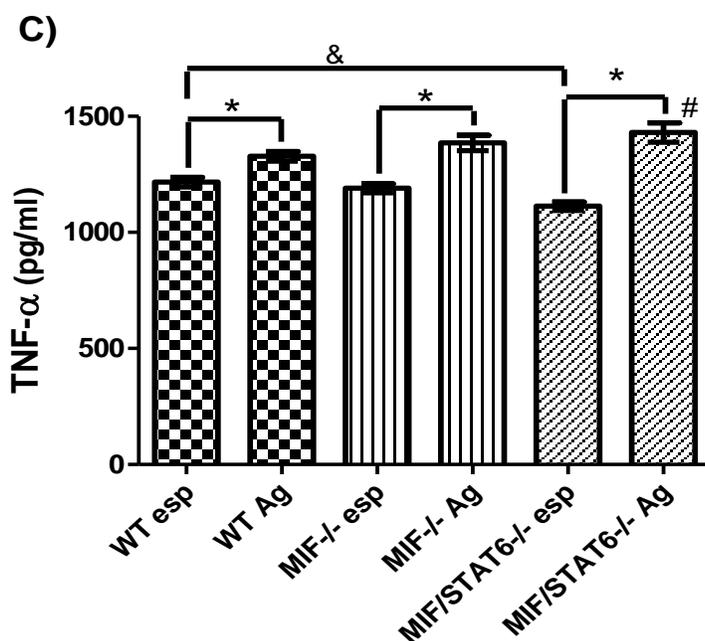


Figura 19. Citocinas Pro-inflamatorias. Concentración expresada en picogramos por mililitro de IL-12 (A), IFN- γ (B) y TNF- α (C) en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos estimulados con TcAg, a los 63 días posteriores a la infección con *T. cruzi* de los tres grupos de ratones WT, MIF^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-}. El gráfico representativo de los resultados observados en tres experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias estadísticamente significativas entre espontáneos vs Ag, #diferencias entre WT Ag vs MIF^{-/-} Ag y MIF/STAT6^{-/-} Ag, &diferencias entre WT espontáneo vs MIF^{-/-} espontáneo y MIF/STAT6^{-/-} espontáneo (P < 0.05 “t” de student, Gradp Pad Prism 5).

5.7.2. Citocinas anti-inflamatorias

También a los 63 días post-infección se determinaron las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 en el sobrenadante del cultivo de esplénicos anteriormente descritos. Se observó la producción espontánea de IL-4 e IL-10 y el re-estimulo con TcAg entre los tres grupos experimentales donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas (“t” de student, Gradh Pad Prism 5) (Fig. 20A y 20B, respectivamente).

Hubo diferencias en la concentración de IL-4 con el re-estímulo de TcAg en el sobrenadante de los esplenocitos pues tuvieron un incremento significativamente mayor de IL-4 en los ratones MIF^{-/-} y los MIF/STAT6^{-/-} con respecto a los ratones WT, posiblemente como consecuencia de la baja producción de la IL-12 descrita anteriormente para el grupo MIF^{-/-}.

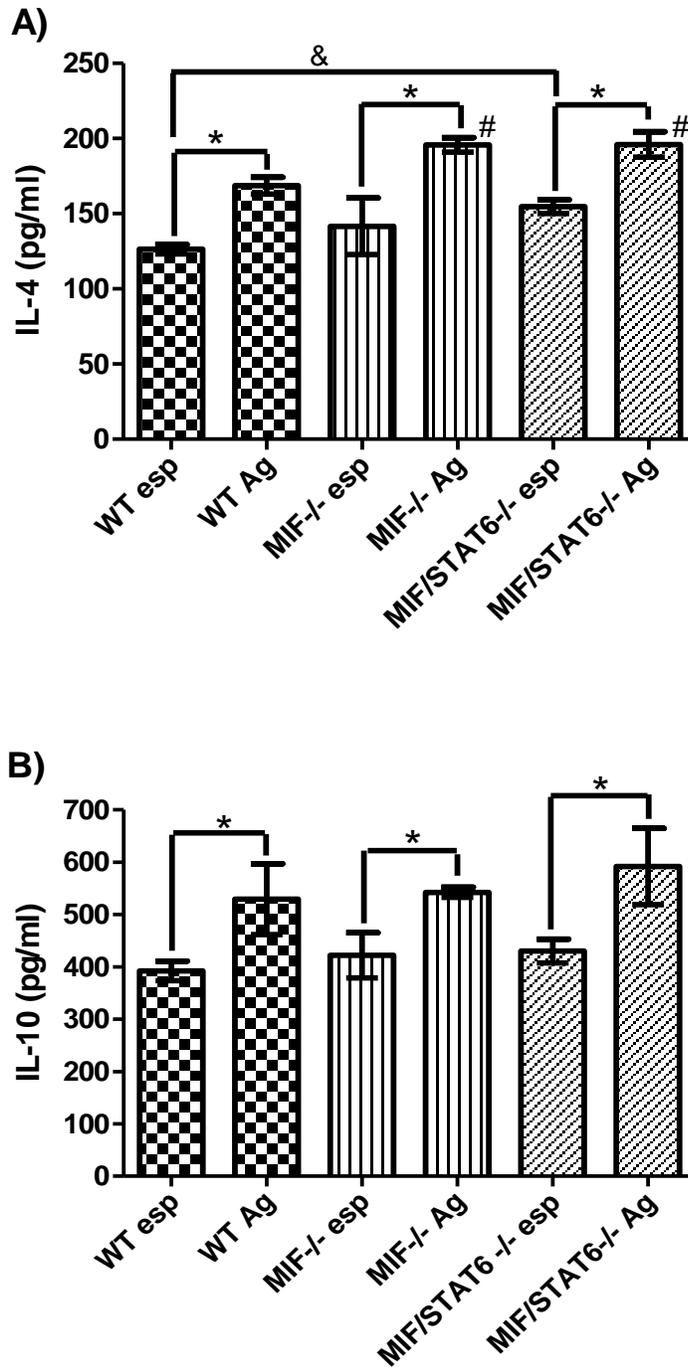


Figura 20.- Citocinas anti-inflamatorias. Concentración expresada en picogramos por mililitro de IL-4 (A) e IL-10 (B) en sobrenadante de cultivo de linfocitos estimulados con antígeno de *T. cruzi*, a los 63 días posteriores a la infección con *T. cruzi* de los tres grupos de ratones WT, MIF^{-/-} y MIF/STAT6^{-/-}. El gráfico es representativo de los resultados observados en tres experimentos, n=5 para cada experimento. *Diferencias estadísticamente significativas entre espontáneos y Ag, #diferencias entre WT Ag vs MIF^{-/-} Ag y MIF/STAT6^{-/-} Ag, &diferencias entre WT espontáneo vs MIF^{-/-} espontáneo y MIF/STAT6^{-/-} espontáneo (P < 0.05 “t” de student, Gradp Pad Prism 5).

Se observó un incremento en la producción de IL-4 en los esplenocitos espontáneos de los ratones MIF/STAT6^{-/-} respecto al sobrenadante de los esplenocitos espontáneos WT y en la producción de IL-10 no se observó diferencias significativas entre los tres grupos, sólo que ambas citocinas IL-4 e IL-10 tuvieron una diferencia significativa entre los grupos espontáneos con respecto a los Ag donde este último se incrementó (Fig. 20A y 20B).

5.8. Cuantificación de óxido nítrico

También se realizó de forma complementaria la cuantificación de la concentración de óxido nítrico (Fig. 21) determinado por el método de Griess en los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de los ratones WT, MIF^{-/-} STAT6/MIF^{-/-} infectados con *T. cruzi* a los 63 días post-infección (no se incluyó el grupo de ratones STAT6^{-/-} debido a que murieron antes), no estimulados (producción espontánea) esplenocitos re-estimulados con 25 µg/ml de TcAg.

Los niveles de óxido nítrico (NO) se determinaron por la concentración de nitrito (NO₂⁻) presente en el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos utilizando la reacción de Griess que detecta específicamente nitrito (NO₂⁻) y no nitrato (NO₃⁻) en el día 63 post-infección con *T. cruzi* expresados en µM por mililitro donde se observó la producción espontánea y la producción con el re-estimulo al final del experimento (Fig. 21).

La producción de NO únicamente se observó incrementada en los esplenocitos provenientes del grupo MIF^{-/-} re-estimulados con TcAg respecto a la producción espontánea de los esplenocitos de los ratones WT y STAT6/MIF^{-/-} re-estimulado con TcAg (Fig. 21). Pero en general los demás grupos estudiados presentaron niveles bajos de NO y no se encontraron diferencias significativas en la concentración de NO entre los sobrenadantes de cultivos de esplenocitos restantes.

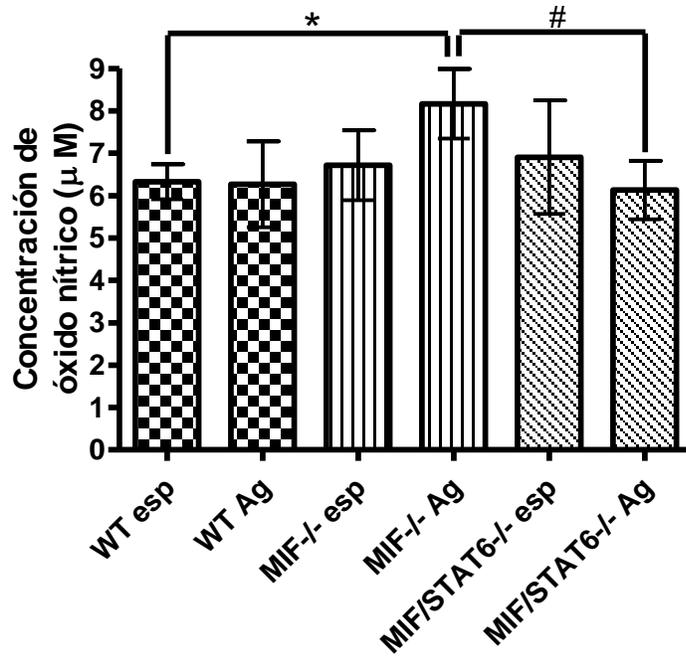


Figura 21.- Niveles de óxido nítrico. Concentración de óxido nítrico expresada en μM por mililitro en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos en el día 63 post-infección con *T. cruzi*. Producción espontánea y re-estimulados con 25 $\mu\text{g/ml}$ antígeno total de *T. cruzi*. El gráfico es representativo de los resultados observados en tres experimentos, $n=5$ para cada experimento. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al WT espontánea, #diferencias entre MIF-/- Ag vs MIF/STAT6-/- Ag ($P < 0.05$ “t” de student, Gradp Pad Prism 5).

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos se realizó un análisis detallado de todos los datos para las diferentes determinaciones con el fin de explicar su comportamiento.

Una vez infectados con *T. cruzi* los ratones de los cuatros grupos, se analizó la pérdida de peso y el desarrollo de la parasitemia (Fig. 11 y 13) a través de la determinación del número de parásitos en sangre cada semana hasta los 56 días post-infección, cuando los parásitos dejan el sistema circulatorio para invadir otros órganos.

En todos los grupos experimentales se observó una pérdida de peso similar y el número de parásitos en el torrente sanguíneo fue incrementándose progresivamente conforme avanzaba la infección, en cualquiera de los casos la carga de parásitos llegó a un pico máximo en el día 28 (Fig. 11). Sin embargo, el número de parásitos en circulación fue diferente para cada grupo de ratones.

En el día 28 p.i. los ratones WT tuvieron alrededor de 1×10^6 parásitos/ml, la sobrevida del 100% fue congruente con la carga parasitaria reducida, probablemente debido a que su sistema inmunológico intacto respondió adecuadamente a la invasión y proliferación del parásito. Mientras que la concentración de parásitos observada en el grupo de ratones MIF^{-/-} fue alrededor de 2×10^6 parásitos/ml. Este incremento del doble en el número de parásitos redujo la sobrevida al 88% (Fig. 12).

Tal parece que cuando MIF se encuentra ausente el ratón tiene cierta incompetencia para controlar la replicación del parásito. Esto fue congruente con las características inmunes que se atribuyen al MIF, ya que MIF promueve un perfil inflamatorio-Th1 de la respuesta inmune innata que se ha asociado con la restricción de la multiplicación del parásito [23].

En ausencia de MIF los ratones infectados con *T. cruzi* en el día 28 p.i. tuvieron en suero menores niveles de las citocinas pro-inflamatorias-Th1, IL-12 (800 pg/ml) e IFN- γ (500 pg/ml), mientras que los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10 se incrementó significativamente 3000 (pg/ml) en comparación con los ratones WT infectados (IL-12 1250 pg/ml; IFN- γ 1000 pg/ml; IL-10 1400 pg/ml). Este perfil de

citocinas inflamatorias disminuidas podría explicar porque los ratones deficientes para MIF tuvieron más parásitos en comparación con los WT (Tab. 3). Es de llamar la atención que los niveles de IL-4 no se modificaron en ausencia de MIF (Fig. 17), esto fue congruente con el trabajo de Reyes y colaboradores [23] quienes no detectaron diferencias significativas en los niveles séricos de IL-4 e IL-10 en ratones WT y el ratones MIF^{-/-} infectados con *T. cruzi* y en la mayoría de los puntos examinados en el curso de la infección por *T. cruzi* [23].

Los ratones STAT6^{-/-} tuvieron más parásitos en sangre (alrededor de 3×10^6) que los ratones WT y MIF^{-/-} (1×10^6 y 2×10^6 , respectivamente) (Fig. 11). Este resultado fue inesperado, dado que la deficiencia de la molécula de señalización STAT6 limita una adecuada producción de IL-4, una de las principales citocinas anti-inflamatorias y como consecuencia debería exacerbarse la respuesta pro-inflamatoria-Th1 que se ha asociado al control del crecimiento parasitario [35].

Trabajos previos utilizando ratones BALB/c STAT6^{-/-} infectados con *T. cruzi*, cepa Brasil describieron mayor sobrevida de los ratones STAT6^{-/-} asociada a la ausencia de STAT6 [74], sin embargo en este trabajo no pudimos reproducir la sobrevida (Fig. 13), posiblemente debido a que se utilizó una cepa del parásito de *T. cruzi* (cepa mexicana, Querétaro) diferente a la utilizada por Tarleton [74]. Sin embargo, aunque no reproducimos la sobrevida de los ratones, si observamos el perfil pro-inflamatorio-Th1 exacerbado como era de esperarse (Tab. 4).

Los ratones STAT6^{-/-} infectados con *T. cruzi* en el día 28 p.i. desarrollaron niveles más elevados de IFN- γ (1400 pg/ml) y TNF- α en comparación con los ratones WT y MIF^{-/-} (WT IFN- γ 1000 pg/ml, TNF- α 240 pg/ml; MIF^{-/-} IFN- γ 500 pg/ml y TNF- α 750 pg/ml) (Tab. 3). Los ratones STAT6^{-/-} tuvieron una respuesta Th1 exacerbada en los días agudos de la enfermedad en comparación al resto de los grupos, pues no hubo una respuesta Th2 que regulara las citocinas pro-inflamatorias (IL-4 Tab. 3). Esta respuesta Th1 puede elevar la temperatura corporal (ratones erizados) e inclusive producir anemia que desencadena en la muerte [40], esto podría explicar la mayor mortalidad observada en este grupo (Fig. 12).

Los ratones doblemente deficientes MIF/STAT6^{-/-} tenían las dos rutas disminuidas, la respuesta innata pro-inflamatoria-Th1 y la de IL-4-Th2, respectivamente. Los ratones MIF/STAT6^{-/-} infectados con *T. cruzi* en el día 28 p.i. tuvieron niveles muy bajos en suero tanto para las citocinas pro-inflamatorias IL-12 (250 pg/ml) y TNF- α (100 pg/ml) como para las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 en comparación con los ratones WT y MIF^{-/-} y STAT6^{-/-}.

Por lo anterior se sugiere que la protección se encontraba disminuida y este parásito tuvo la libertad de proliferar e invadir nuevas células sin ningún obstáculo competente. Esto lo comprobamos al observar que la carga de parásitos se elevó a más de 6×10^6 parásitos/ml superando en mucho el número observado en los ratones WT, MIF^{-/-} y STAT6^{-/-} (Fig. 11).

Los ratones bloqueados MIF/STAT6^{-/-} murieron pues no fue competente su sistema inmune debido a que los mecanismos de defensa como IFN- γ y TNF- α estuvieron desactivados al igual que IL-4 (Tab. 4), por lo que el parásito encontró todas las condiciones favorables para proliferar y atacar a su huésped.

Fue curioso observar que los ratones MIF/STAT6^{-/-} tuvieron un comportamiento semejante en la concentración de IFN- γ y TNF- α con respecto a los ratones WT (Fig. 15 y 16), por lo que la elevación brusca de estas citocinas no ocurrió para justificar la muerte de los ratones doblemente KO MIF/STAT6^{-/-}, en los ratones STAT6^{-/-} al no existir el promotor de la citocina IL-4 no existió un regulador para disminuir la producción de IFN- γ y este siguió con tendencia al incremento durante la infección (Tab. 4). IFN- γ induce la activación de los Mo que podrían contribuir a la eliminación de *T. cruzi* intracelular [75].

Los resultados también nos permiten sugerir que los ratones más susceptibles a la enfermedad son aquellos a los cuales se les han limitado las dos rutas Th1/Th2 llamados MIF/STAT6^{-/-} y los STAT6^{-/-} fueron los segundos susceptibles a la enfermedad, por lo que podemos decir que estos se ven más afectados por las citocinas pro-inflamatorias que a la misma invasión del parásito y los terceros en susceptibilidad fueron los MIF^{-/-}

pues estos presentaron menor concentración de parásitos y alto porcentaje de supervivencia (Fig. 11 y 12).

Con respecto al peso corporal a partir del día 14 cuando avanzó la infección, los ratones perdieron peso, como teóricamente se esperaba [76], a partir del día 35 comenzaron a recuperar peso aunque no regresaron a los niveles iniciales (Fig. 13), los ratones STAT6^{-/-} tuvieron una recuperación de su peso menor al resto de los ratones posiblemente a la alta concentración de TNF- α (Fig. 16) ya que esta citocina acentúa la pérdida de masa corporal severa llamada “caquexia” por falta de apetito en los ratones afectados por TNF- α [77], independientemente de la infección que también provoca pérdida de peso.

Por otro lado, la determinación de citocinas en los esplenocitos re-estimulados con antígeno de *T. cruzi* a los 63 días posteriores a la infección, no contribuyó mucho para dilucidar la participación de las moléculas estudiadas. Sin embargo podemos sugerir que la producción disminuida de IL-12 (Fig. 19A) de los esplenocitos MIF^{-/-} re-estimulados y espontáneos se puede atribuir a la ausencia de MIF ya que esta molécula es un inductor de IL-12 [27].

La poca diferencia observada para las otras citocinas pro-inflamatorias entre los grupos con el re-estimulo puede atribuirse a que los cultivos de esplenocitos vienen de tiempos de infección tardíos (63 días p.i.) y como ya ha sido reportado previamente por Reyes y colaboradores [23] en estos tiempos se pierden las diferencias significativas, al parecer porque la resistencia a la infección radica en la respuesta inmune temprana más que en la tardía (Fig. 19).

Lo mismo ocurre al determinar la concentración de óxido nítrico en los cultivos de esplenocitos, pues este fue liberado previamente en la etapa temprana de la actividad anti-parasitaria y después el NO tienen una liberación lenta al ser re-estimulados con Ag de *T. cruzi* [64] en los tiempos tardíos en los que se midió por lo tanto la única diferencia que se observa es con respecto a MIF^{-/-} Ag contra WT espontánea y los MIF/STAT6^{-/-} (Fig. 21) por lo que puede deberse al incremento de la IL-12 [61].

En la infección con *T. cruzi* la respuesta mixta Th1 y Th2 es importante para la protección contra el parásito, ya que se pudo observar que los ratones más susceptibles a la infección del parásito fueron los doblemente bloqueados MIF/STAT6^{-/-} los cuales tuvieron deficientes las dos rutas inmunológicas tanto la Th1 como la Th2, la respuesta mixta en la tripanosomiasis es extremadamente importante en comparación con otras parasitemias, la enfermedad de Chagas se contrarresta por rutas inmunológicas complementarias que funcionan de manera mixta ante una infección de *T. cruzi*, ya que el ciclo del parásito en el hospedero tiene dos etapas, la primera que se considera intracelular una vez que se ha internalizado en el macrófago para proliferar (Fig. 22) y la segunda cuando el macrófago libera los nuevos parásitos al torrente sanguíneo para que estos a su vez busquen nuevos macrófagos que invadir o un insecto vector triatomino sea infectado [47].

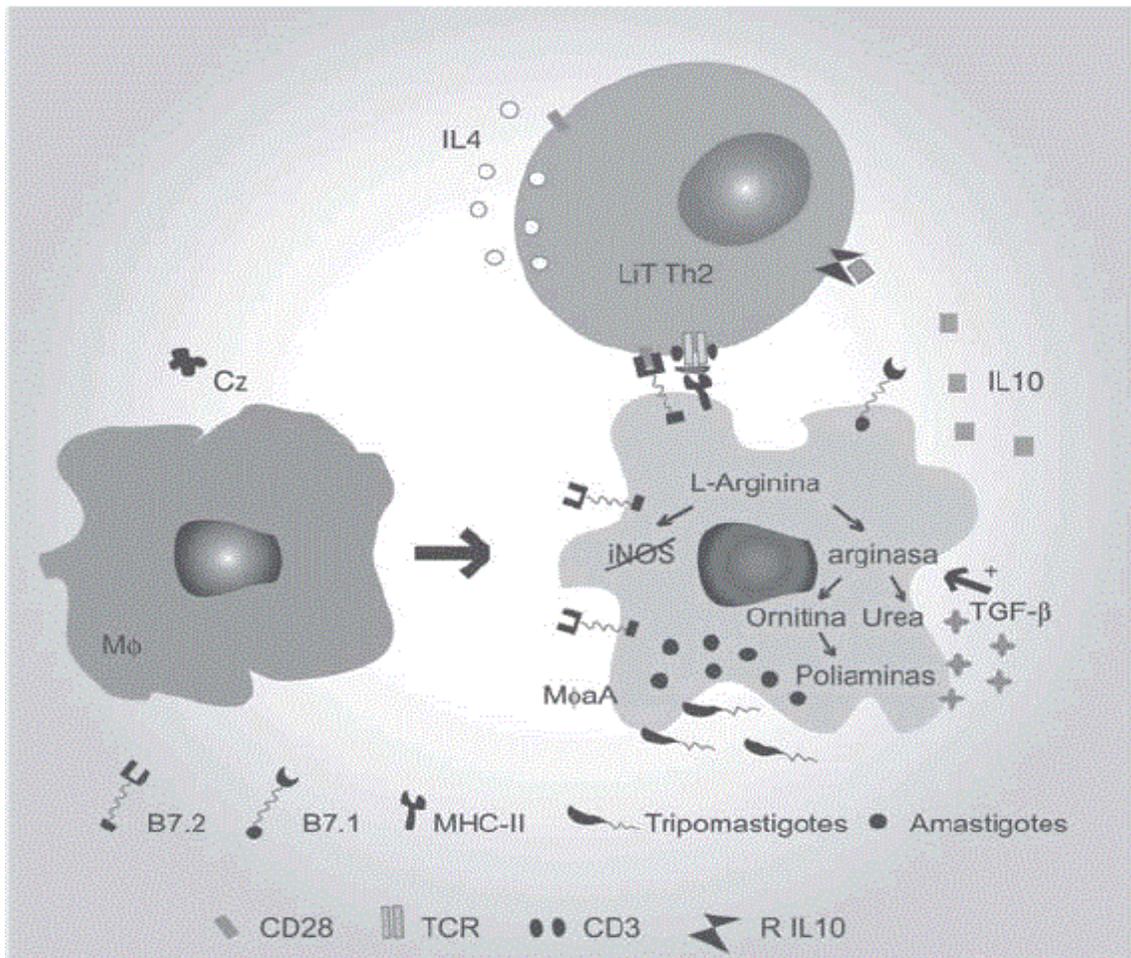


Figura 22.- Macrófago activado alternativamente por *T. cruzi*, capacidad de un antígeno parasitario de inducir la activación alternativa y mecanismo que reconoce al parásito intracelular [8]

Las citocinas pro-inflamatorias IL-12, IFN- γ , TNF- α son tan importantes como las anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 en la defensa contra el parásito durante la evolución de la enfermedad. *T. cruzi* activa la vía Th1 tanto como la Th2 a lo largo las diferentes etapas de la infección inducen activación y diferenciación de los linfocitos Th0 hacia los linajes Th1 y Th2 requiere de la invasión de este parásito en los macrófagos producen IL-12 induciendo la polarización de las células Th0 hacia el linaje Th1 pero si este parásito sale del macrófago estimula la producción de IL-4 como los Mo colaboran con las TCD4⁺, los LTh serán polarizados hacia un tipo Th2, el equilibrio en la producción de citocinas pro-inflamatorias con respecto a las anti-inflamatorias es una prioridad en esta infección [8].

Mientras el macrófago produce IL-12 para activar a los linfocitos que a su vez pueden producir MIF para reclutar más células Th1 secretoras de IFN- γ en respuesta a la invasión intracelular en el macrófago, el IFN- γ activa las células NK para identificar a estos macrófagos infectados e iniciar la apoptosis [63], otro efecto de la ruta Th1 es que el IFN- γ promueve al MHC-II, TNF- α y al óxido nítrico que son formas para combatir a *T. cruzi* [58] aunque este sistema Th1 es muy eficiente contra el parásito en su etapa intracelular como amastigote.

El parásito tiene la habilidad de transformar su estadio y pasar a tripomastigote al ser liberados a la circulación, entonces en continuidad con este mecanismo el sistema inmune activa la secuencia Th2 para hacer frente a la forma parasitaria extracelular en presencia de la IL4 los Th2 se estimulan para fosforilar STAT6 [36] y producir IL-4 (Fig. 17) junto con IL-10 (Fig. 18) que son antagónicos de IFN- γ para apagar la respuesta citotóxica [78] (Fig. 15).

El bloquear selectivamente cada una de las dos vías pro-inflamatorias y anti-inflamatorias a través de MIF^{-/-} y STAT6^{-/-} respectivamente nos permitió observar con detalle la función de cada una de ellas durante la infección con *T. cruzi* por lo tanto se puede atribuir que la infección de *T. cruzi* en la enfermedad de Chagas activa las dos vías inmunológicas Th1 y Th2 en forma secuencial; aunque se activan las dos rutas

éstas no lo hacen al mismo tiempo sino que lo hacen de forma consecutiva pues primero se activa la Th1 y después la Th2 por lo tanto la protección contra este parásito es mixta.

Las moléculas MIF y STAT6 son igualmente importantes en la respuesta contra *T. cruzi* debido a esto las dos rutas inmunológicas Th1 y Th2 son esencialmente importantes en la evolución de la enfermedad, pues el trabajo de Reyes y colaboradores [23] ya había hecho notar una predominante afectación en la susceptibilidad del hospedero cuando se restringía la ruta Th1 al bloquear la molécula MIF en ratones infectados con *T. cruzi*, pues MIF juega un papel importante en la defensa del hospedero contra *T. cruzi* en la etapa aguda de la enfermedad favoreciendo la producción de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ durante la primera fase de la infección.

Sin embargo al ampliar nuestro trabajo con la misma infección hasta una etapa crónica e incluyendo la ruta Th2 al bloquear STAT6 se logró evidenciar que no sólo la Th1 es importante contra este parásito sino que Th2 tiene un rol igualmente activo en la respuesta contra el agente invasor en la segunda fase de la infección según nuestro modelo.

MIF y STAT6 no actúan simultáneamente en la infección por *T. cruzi* pues las citocinas producidas por células Th1 y Th2 son mutuamente inhibitorias para las funciones efectoras de una forma recíproca en las infecciones [17], esta regulación cruzada ocasiona el predominio de una u otra respuesta, pero en el caso de la enfermedad de Chagas se pudo observar una interacción prácticamente consecutiva de las dos rutas inmunológicas para lograr un equilibrio dinámico contra el parásito, sin afectar en su momento una a la otra, ambas tienen su momento y efecto dentro del hospedero.

Los esplenocitos de los ratones MIF^{-/-} presentaron niveles disminuidos de IL-12 en comparación con los ratones WT y los MIF/STAT6^{-/-} re-estimulados (Fig. 19A). Las citocinas pro-inflamatorias tales como la IL-12, TNF- α y IFN- γ pertenecientes a la ruta Th1, desempeñaron un papel crítico en la inmunidad protectora contra *T. cruzi*, ya que los ratones modificados genéticamente que carecieron de cualquiera de estas citocinas no lograron controlar la parasitemia y rápidamente sucumbieron a la infección [58],

La IL-12 intervino en la infección de *T. cruzi* induciendo la producción de IFN- γ por las células NK [21], que se requiere para la inducción de los macrófagos para activar el mecanismo implacable del NO (Fig. 21), así como la posterior secuencia de la respuesta Th1.

Por otro lado, el mecanismo regulador de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 pertenecientes a la ruta Th2 permite controlar la proliferación de *T. cruzi* y en particular la IL-10 también es necesaria para evitar la hiperreactividad citotóxica de la Th1 que puede dañar no sólo al parásito sino también a los órganos y tejidos del hospedero [79], se puede decir con nuestros resultados que las respuestas de tipo Th1 y Th2 tienden a estar asociadas inmunológicamente con la protección del *T. cruzi* durante la infección de la enfermedad, tanto en ratones susceptibles y como en aquellos resistentes a esta infección.

También se ha observado una importancia de la respuesta Th2 poco después de que Th1 fue activada [10], esto es relevante pues una actividad combinada de las dos respuestas permite una mayor eficiencia al combatir a un parásito que se sabe tiene un comportamiento dual pues en su afán por colonizar al hospedero pasa de una invasión intracelular en los Mo a una distribución extracelular después de utilizar esta célula para sus propósitos de proliferación.

Por lo tanto la respuesta inmunitaria contra un el parásito intracelular *T. cruzi* requiere de la participación mínimo de cuatro células, la primera en este caso es un macrófago que procese y presente el Ag del parásito, segundo un mediador de la inmunidad celular un linfocito de la ruta Th1 que permita activar celularmente a las otras células y destruir al parásito de forma intracelular, mientras este se encuentre todavía dentro del Mo, tercero un cooperador de la ruta Th2 que se encargue de activar la respuesta humoral a través de los LB, de regular la respuesta Th1 para que ésta no dañe a las células propias del hospedero y cuarto una célula productora de Ab, como los LB para que a su vez produzca anticuerpos contra el parásito [17]; aunque también hay células complementarias como las NK, Mas y PMN que permiten regular y reforzar el mecanismo de la inmunidad tanto celular como humoral [40].

Para finalizar podemos decir que gracias a nuestro estudio pudimos conocer el papel fundamental que tienen las dos respuestas inmunológicas Th1/Th2 en la protección contra el parásito *T. cruzi*, ya que la respuesta total es una suma integral de la respuesta celular continuada con la respuesta humoral y que una sin la otra provoca una deficiencia en la protección del hospedero durante el curso de la infección, pues la mancuerna que realizan las dos rutas inmunológicas es un mecanismo sincronizado en la inducción, mantenimiento y regulación de la protección del organismo contra el parásito, logrando actuar en equilibrio hasta frenar a éste en su proceso de invasión.

CONCLUSIONES

Podemos sugerir que la infección de *T. cruzi* en la enfermedad de Chagas activa las dos vías inmunes, inflamatoria-Th1 y Th2. Al bloquear selectivamente cada una de las dos vías a través de MIF^{-/-} y STAT6^{-/-} respectivamente esto nos permitió observar la función de cada una de ellas:

- 1) En la infección con *T. cruzi* la respuesta mixta Th1 y Th2 es importante para la protección contra el parásito, ya que se pudo observar que los ratones más susceptibles a la infección del parásito fueron los doblemente bloqueados MIF/STAT6^{-/-} los cuales tuvieron deficientes las dos rutas inmunológicas tanto la del tipo Th1 como la Th2.
- 2) Al bloquear una de las dos respuestas inmunes, inflamatoria-Th1 o Th2 (con MIF^{-/-} o STAT6^{-/-}, respectivamente), por separado se tuvo una susceptibilidad disminuida pero no al grado de los doblemente bloqueados MIF/STAT6^{-/-}, confirmando que la respuesta mixta es importante para el control de la parasitemia.
- 3) El equilibrio en la producción de citocinas pro-inflamatorias con respecto a las anti-inflamatorias es una prioridad en esta infección. Si la producción de citocinas inflamatoria-Th1 (TNF- α e IFN- γ) es exacerbada o está ausente la respuesta Th2 (IL-4, IL-10) habrá restricción del parásito y la muerte del hospedero por citotoxicidad. Si la producción de la respuesta Th2 es exacerbada o está ausente la respuesta Th1, habrá replicación y establecimiento del parásito con la consecuente patología en órganos como colon y corazón con mal pronóstico para el hospedero.

APÉNDICE

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS)

Para 1 litro pH 7.4:

8 g (137 mM) NaCl (JT Baker)

0.2 g (2.7 mM) KCl (ICN Biomedicals Inc.)

1.44 g (10 mM) Na₂HPO₄ (JT Baker)

0.2 g (2mM) KH₂PO₄ (JT Baker)

Ajustar pH a 7.4 con HCl (JT Baker)

Solución de EDTA

Para 100 ml a 0.1 M pH 7.5:

18.61g de EDTA (JT Baker)

Disolver en 70 ml agua destilada

Ajustar el pH con NaOH (Monterrey)

-Hasta llegar a pH de 6 o 7, y aquí ajustar hasta pH 7.5 con solución de NaOH 10 M

Aforar a 100 ml.

Solución de lisis

Para 1 litro pH 8.5:

200 mM NaCl (JT Baker)

5 mM EDTA (JT Baker)

0.2% SDS (JT Baker)

100 mM Tris HCl (ICN Biomedicals Inc.)

Solución Tris borato EDTA (TBE) 10x

Para 500 ml pH 8.0:

890 mM Tris base (Sigma Chemicals)

890 mM Ácido bórico (JT Baker)

20 mM EDTA (JT Baker)

Solución de pegado

Para 1 litro:

100mM de Na_2HPO_4 (JT Baker)

Solución PBS-Tween 20 de lavado

Para 1 litro pH 7.4:

1 l de PBS

0.5 ml de Tween 20 (Promega co.)

Solución PBS-BSA de bloqueo al 1%

Para 100 ml pH 7.4:

100 ml de PBS

1% de BSA (INC Biomedicals)

Sustrato ABTS para revelado

Para 500 ml pH 4.35:

150 mg de ABTS (INC Biomedicals)

9.6 g Ácido cítrico (Tecsiquim)

Ajustar el pH con NaOH (Monterrey)

Soluciones para determinación de proteínas (Lowry modificado)

Para 250 ml, pH 7.4:

Solución A:

Sulfato de cobre CuSO_4 1% (JT Baker)

Tartrato de sodio y potasio 2% (JT Baker)

Solución B:

Carbonato de sodio Na_2CO_3 2% (JT Baker)

Hidróxido de sodio NaOH 0.1 N (Monterrey)

Mezclar ambas soluciones 30 minutos antes de realizar la prueba.

Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml.

Reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotungstico) este reactivo viene preparado comercialmente y se debe mantener en refrigeración. Para su uso el reactivo se diluye inmediatamente antes, en la relación de 1:2 de agua destilada.

Medio de cultivo BHI para *Trypanosoma cruzi*

Para 200 ml, estéril, pH 7.4:

7.4 g de agar infusión cerebro-corazón (Bioxon)

4.6 g de agar nutritivo (Sigma)

2 g de dextrosa (DB Becton Dickson)

45 ml de solución NaCl 0.9% (JT Baker)

1.7 ml de penicilina-estreptomicina (Gibco)

Esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Tinción de Wright-Giemsa

Para preparar 100 mL colorante de Wright, pH 6.8-7.2:

0.3 g colorante de Wright (Sigma)

97.0 ml metanol (JT Baker)

3.0 ml glicerol (JT Baker)

Guardar en frasco oscuro

Solución amortiguadora tampón para 1 litro de agua destilada:

3.76 g de hidrofosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (JT Baker)

2.10 g de fosfato de potasio dihidrogenado (KH_2PO_4) (JT Baker)

Para preparar 100 ml Colorante de Giemsa:

1 g de colorante de Giemsa (Sigma)

66 mL de metanol (JT Baker)

66 mL de glicerol. (JT Baker)

Madurar a temperatura ambiente de 14 días en frasco color ámbar

Soluciones para determinación de NO (Reacción de Greiss)

Para 250 ml:

Solución A:

65 mg de Naftiletildiamina dihidroclorhídrica 0.1% (NED* 2HCl) (JT Baker)

Solución B:

430 mg Sulfanilamida 1% ($C_6H_8SO_2N_2$) en Ácido fosfórico 5% (H_3PO_4) (JT Baker)

Guardar a 4°C y protegidas de la luz.

Mezclar 30 minutos antes de realizar la reacción colorimétrica.

Colocar 100 μ l de óxido nítrico de concentración inicial 0.01M para hacer una curva estándar por duplicado como control y referencia, en cada pozo de la placa con diluciones seriadas 1:2 dejando el último pozo como blanco (22 pozos y 2 blancos).

BIBLIOGRAFÍA

- 1 **Rivas-Santiago, B., Vieyra-Reyes, P. and Araujo, Z.**, [Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]. *Invest Clin* 2005;**46**:391-412.
- 2 **Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pillai, S.**, *Cellular and Molecular Immunology*, 4th Edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia: 2000.
- 3 **Gordon, S.**, Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:23-35.
- 4 **Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G. and Eichmann, K.**, Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol* 1995;**25**:1101-1104.
- 5 **Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. and Mosser, D. M.**, Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 2006;**80**:1298-1307.
- 6 **Anderson, C. F. and Mosser, D. M.**, A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol* 2002;**72**:101-106.
- 7 **Berrington, W. R. and Hawn, T. R.**, Mycobacterium tuberculosis, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* 2007;**219**:167-186.
- 8 **Stempin, C. C. and Cerban, F. M.**, [Macrophages and arginase induction as a mechanism for parasite escape]. *Medicina (B Aires)* 2007;**67**:737-746.
- 9 **Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L.**, Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;**136**:2348-2357.
- 10 **Berger, A.**, Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ* 2000;**321**:424.
- 11 **Salinas, M. C.**, *Inmunología médica*, 1a Edn. Mc Graw Hill/ Interamericana de México, México D.F. : 2007.

- 12 **Lohoff, M., Gessner, A., Bogdan, C. and Rollinghoff, M.,** The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;**115**:191-202.
- 13 **Mosmann, T. R. and Coffman, R. L.,** TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;**7**:145-173.
- 14 **Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W. E. and Sher, A.,** Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J Immunol* 2000;**164**:3047-3055.
- 15 **Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T. and Grusby, M. J.,** Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996;**382**:174-177.
- 16 **Guerrero, R. J.,** Moléculas coestimuladoras y artritis reumatoide. *Revista colombiana de reumatología* 2005;**12**:44-52.
- 17 **Harber, M., Sundstedt, A. and Wraith, D.,** The role of cytokines in immunological tolerance: potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 2000;**2**:1-20.
- 18 **Yu, C. R., Ortaldo, J. R., Curiel, R. E., Young, H. A., Anderson, S. K. and Gosselin, P.,** Role of a STAT binding site in the regulation of the human perforin promoter. *J Immunol* 1999;**162**:2785-2790.
- 19 **Moser, B. and Willmann, K.,** Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis* 2004;**63**(2):ii84-ii89.
- 20 **Ramírez, J. L. and Ruiz-Argüelles, A.,** *Inmunopatología*, 1a Edn. Intersistemas, S.A. de C.V. Educación Médica Continua., México D.F.: 1996.
- 21 **Roitt, I., Male, D. and Brostoff, J.,** *Immunology*, 5th Edn. Mosby, Incorporated, London: 1998.
- 22 **Pathak, S. and Palan, U.,** *Immunology: essential and fundamental.* , 2nd Edn. Science Publishers Inc., New Hampshire: 2005.
- 23 **Reyes, J. L., Terrazas, L. I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A. R. and Rodriguez-**

- Sosa, M.**, Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2006;**74**:3170-3179.
- 24 **Murakami, H., Akbar, S. M., Matsui, H., Horiike, N. and Onji, M.**, Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 2002;**128**:504-510.
- 25 **Rodriguez-Sosa, M., Rosas, L. E., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R. and Terrazas, L. I.**, Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 2003;**71**:1247-1254.
- 26 **Calandra, T. and Roger, T.**, Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:791-800.
- 27 **Flores, M., Saavedra, R., Bautista, R., Viedma, R., Tenorio, E. P., Leng, L., Sanchez, Y., Juarez, I., Satoskar, A. A., Shenoy, A. S., Terrazas, L. I., Bucala, R., Barbi, J., Satoskar, A. R. and Rodriguez-Sosa, M.**, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J* 2008;**22**:3661-3671.
- 28 **Baugh, J. A. and Bucala, R.**, Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 2002;**30**:S27-S35.
- 29 **Goenka, S. and Kaplan, M. H.**, Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res* 2011;**50**:87-96.
- 30 **Zambrano, S.**, *Inmunología básica y clínica.*, 1a Edn. Mc Graw-Hill, México D.F.: 2007.
- 31 **Akiho, H., Blennerhassett, P., Deng, Y. and Collins, S. M.**, Role of IL-4, IL-13, and STAT6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;**282**:G226-232.
- 32 **Takeda, K. and Akira, S.**, STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;**11**:199-207.
- 33 **Valineva, T., Yang, J. and Silvennoinen, O.**, Characterization of RNA helicase A as component of STAT6-dependent enhanceosome. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**:3938-3946.

- 34 **Kuperman, D., Schofield, B., Wills-Karp, M. and Grusby, M. J.,** Signal transducer and activator of transcription factor 6 (Stat6)-deficient mice are protected from antigen-induced airway hyperresponsiveness and mucus production. *J Exp Med* 1998;**187**:939-948.
- 35 **Mahalingam, S., Karupiah, G., Takeda, K., Akira, S., Matthaei, K. I. and Foster, P. S.,** Enhanced resistance in STAT6-deficient mice to infection with ectromelia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;**98**:6812-6817.
- 36 **Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E. and Ihle, J. N.,** Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* 1996;**380**:630-633.
- 37 **Kweon, M. N., Yamamoto, M., Kajiki, M., Takahashi, I. and Kiyono, H.,** Systemically derived large intestinal CD4(+) Th2 cells play a central role in STAT6-mediated allergic diarrhea. *J Clin Invest* 2000;**106**:199-206.
- 38 **Pauleau, A. L., Rutschman, R., Lang, R., Pernis, A., Watowich, S. S. and Murray, P. J.,** Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* 2004;**172**:7565-7573.
- 39 **Finkelman, F. D., Wynn, T. A., Donaldson, D. D. and Urban, J. F.,** The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol* 1999;**11**:420-426.
- 40 **Benjamin, E., Coico, R. and Sunshine, G.,** *Immunology: A Short Course*, 4th Edn. Wiley-Liss, New York: 2000.
- 41 **CDC,** American Trypanosomiasis Fact Sheet, 2012 Edn. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 2012, disponible en la página web: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>.
- 42 **Schmunis, G. A.,** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;**102**(1):75-85.
- 43 **Martínez, E.,** Diversity, genomic content and function of endosymbiotic enterobacteria of arthropods *CCG*. Centro de ciencias genómicas UNAM, Cuernavaca, Mor. 2011, disponible en la página web: <http://www.ccg.unam.mx/projects/emartine/diversity-genomic>.

- 44 **Palmieri, O.**, *Enfermedades infecciosas*. Elsevier, Oxford: 2007.
- 45 **Teixeira, A. R., Nitz, N., Guimaro, M. C., Gomes, C. and Santos-Buch, C. A.**, Chagas disease. *Postgrad Med J* 2006;**82**:788-798.
- 46 **OMS**, Migraciones de la enfermedad de Chagas. In **485-564** (Ed.) *OMS*, 2009 Edn. Boletín de la Organización Mundial de la Salud, Washington, DC 2009, disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/87/87/09-030709/es/>.
- 47 **Murray, P. R., Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A.**, *Microbiología médica.*, 5a Edn. Elsevier Mosby Madrid: 2006.
- 48 **Mo, Y. and Vogler, B.**, Highly sensitive drug-screening method to find cruzain inhibitors from natural products by liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy *Pharmacology, Analytical Chemistry*. The University of Alabama in Huntsville, Alabama 2009;1:122.
- 49 **Tau, G. Z., von der Weid, T., Lu, B., Cowan, S., Kvatyuk, M., Pernis, A., Cattoretti, G., Braunstein, N. S., Coffman, R. L. and Rothman, P. B.**, Interferon gamma signaling alters the function of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 2000;**192**:977-986.
- 50 **Lopez, E.**, Situación actual de la enfermedad de Chagas en niños procedentes de las comunidades rurales de los municipios de la ciudad Sandino y Mateare. *CIES, Managua Nicaragua* 2005;**1**:23-24.
- 51 **Torres, M.**, Laboratorio de parasitología, endoparásitos, hemoparásitos e histoparásitos. *Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile* 1997;**26**:169-172.
- 52 **D'Imperio Lima, M. R., Joskowicz, M., Coutinho, A., Kipnis, T. and Eisen, H.**, Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol* 1985;**15**:201-203.
- 53 **Cardillo, F., Voltarelli, J. C., Reed, S. G. and Silva, J. S.**, Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* 1996;**64**:128-134.
- 54 **Tarleton, R. L. and Zhang, L.**, Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 1999;**15**:94-99.

- 55 **Hunter, C. A., Slifer, T. and Araujo, F.,** Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect Immun* 1996;**64**:2381-2386.
- 56 **Amezcu Vesely, M. C., Bermejo, D. A., Montes, C. L., Acosta-Rodriguez, E. V. and Gruppi, A.,** B-Cell Response during Protozoan Parasite Infections. *J Parasitol Res* 2012;**2012**:362131.
- 57 **Rabinovich, G. A. and Gruppi, A.,** Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* 2005;**27**:103-114.
- 58 **Cardoni, R. L., Antunez, M. I. and Abrami, A. A.,** [TH1 response in the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*]. *Medicina (B Aires)* 1999;**59**(2):84-90.
- 59 **Stempin, C. C., Tanos, T. B., Coso, O. A. and Cerban, F. M.,** Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol* 2004;**34**:200-209.
- 60 **Torreilhas, A. C., Faquim-Mauro, E., Da Silva, A. V. and Abrahamsohn, I. A.,** Interference of natural mouse hepatitis virus infection with cytokine production and susceptibility to *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 1999;**96**:381-388.
- 61 **Abrahamsohn, I. A. and Coffman, R. L.,** *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol* 1996;**84**:231-244.
- 62 **Mosmann, T. R.,** Properties and functions of interleukin-10. *Adv Immunol* 1994;**56**:1-26.
- 63 **Galvao Da Silva, A. P., Jacysyn, J. F. and De Almeida Abrahamsohn, I.,** Resistant mice lacking interleukin-12 become susceptible to *Trypanosoma cruzi* infection but fail to mount a T helper type 2 response. *Immunology* 2003;**108**:230-237.
- 64 **Fichera, L. E., Albareda, M. C., Laucella, S. A. and Postan, M.,** Intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in cardiac myocytes is inhibited by cytokine-induced nitric oxide release. *Infect Immun* 2004;**72**:359-363.

- 65 **Postan, M., Arnaiz, M. R. and Fichera, L. E.**, [Myocardial cell response to Trypanosoma cruzi infection]. *Medicina (B Aires)* 1999;**59(2)**:57-62.
- 66 **Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S. and Cerban, F.**, Alternative activation and increase of Trypanosoma cruzi survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol* 2002;**72**:727-734.
- 67 **Rodriguez-Sosa, M., David, J. R., Bojalil, R., Satoskar, A. R. and Terrazas, L. I.**, Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite Taenia crassiceps is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 2002;**168**:3135-3139.
- 68 **Acosta, A. M. and Santos-Buch, C. A.**, Autoimmune myocarditis induced by Trypanosoma cruzi. *Circulation* 1985;**71**:1255-1261.
- 69 **Hagar, J. M. and Rahimtoola, S. H.**, Chagas' heart disease. *Curr Probl Cardiol* 1995;**20**:825-924.
- 70 **Lopez-Ordenez, T., Panzera, F., Tun-Ku, E., Ferrandis, I. and Ramsey, J. M.**, [Genomic and proteomic contributions for Chagas disease control]. *Salud Publica Mex* 2009;**51(3)**:S410-423.
- 71 **Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Berns, A.**, Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991;**19**:4293.
- 72 **Granger, D. L., Taintor, R. R., Boockvar, K. S. and Hibbs, J. B., Jr.**, Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996;**268**:142-151.
- 73 **Malara, G. and Charra, R.**, Dosages des proteines partiulaires selon la méthode de Lowry. *Université de Paris.Station Zoologique. Villefrenche-Sur-Mer. Notes de Travail* 1972;**6**:11.
- 74 **Tarleton, R. L., Grusby, M. J. and Zhang, L.**, Increased susceptibility of Stat4-deficient and enhanced resistance in Stat6-deficient mice to infection with Trypanosoma cruzi. *J Immunol* 2000;**165**:1520-1525.
- 75 **Munoz-Fernandez, M. A., Fernandez, M. A. and Fresno, M.**, Activation of human macrophages for the killing of intracellular Trypanosoma cruzi by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett* 1992;**33**:35-40.

- 76 **Shealy, D. J., Wooley, P. H., Emmell, E., Volk, A., Rosenberg, A., Treacy, G., Wagner, C. L., Mayton, L., Griswold, D. E. and Song, X. Y.,** Anti-TNF-alpha antibody allows healing of joint damage in polyarthritic transgenic mice. *Arthritis Res* 2002;**4**:R7.
- 77 **Argiles, J. M., Busquets, S., Lopez-Soriano, F. J. and Figueras, M.,** [Pathophysiology of neoplastic cachexia]. *Nutr Hosp* 2006;**21**(3):4-9.
- 78 **Takeda, K., Tanaka, T., Shi, W., Matsumoto, M., Minami, M., Kashiwamura, S., Nakanishi, K., Yoshida, N., Kishimoto, T. and Akira, S.,** Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature* 1996;**380**:627-630.
- 79 **Vaquero, N. L., Mussari, C. and Girard-Bosch, M. C.,** Modelo natural de dicotomía TH1-TH2: La enfermedad de Hansen. [*Th1-TH2 balance. Natural model: Hansen'disease*]. *Rev. argent. dermatol.* 2010;**91**(3):00-00

Alma mater

Hace más de cuatrocientos cincuenta años nació una bella dama, de edad longeva, pero de espíritu joven y progresista, que ha acompañado a su pueblo durante su historia, fungiendo como la conciencia y la razón de esta bella nación.

Siendo de antepasados españoles esta gran dama nació en México y se siente muy orgullosa de su origen, dondequiera que se manifieste representa a su país con orgullo, usando su flamante vestidura de color azul con ribetes dorados que brillan con el sol y en su pecho muestra el escudo que la identifica como universitaria.

Se dice que su espíritu esta forjado por la raza que la vio nacer, conteniendo en su corazón la mezcla de dos culturas que al fusionarse le dieron lo mejor de ambos mundos. En su seno se han acuñado grandes personajes que ahora son parte importante de la sociedad.

Su capacidad cultural y humana le dio total autonomía permitiéndole desarrollarse en todos los aspectos universales, inclusive sirviendo como formadora y protectora del conocimiento, funge como guardiana de la cultura de su pueblo.

Mujer multidisciplinaria patrimonio de la humanidad tu belleza es una perfecta combinación de la cultura europea y americana, eres honrada por la sangre mestiza que corre por tus *campus*. ¡Oh! gran mujer sabia y culta que con honor ostentas tu linaje, sigue tu camino, aunque es arduo, tú sabrás recorrerlo para alcanzar la cima.

Porque has logrado trascender de forma extraordinaria por tu excelencia en todo aquello que te propones hacer, te apreciamos por todos los premios que has ganado tanto nacionales como internacionales.

Eres la perfecta promotora de la ciencia y la tecnología has logrado innovar en todos los aspectos más vanguardistas de estas disciplinas, tu voz en castellano se ha escuchado en muchos lugares; aunque dominas muchos idiomas y dialectos e inclusive aquellos que se creían olvidados tú los retomas y los haces tuyos para enseñárselos a tus hijos y mantenerlos vivos.

A pesar de ser una mujer de edad avanzada sigues ejercitándote día con día practicando gran variedad de disciplinas deportivas, participando en distintas justas en las cuales has ganado innumerables trofeos y medallas junto con tus hijos que te representan; han aprendido de ti el deportivismo y la tenacidad para enfrentarse a sus oponentes.

Gracias UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO porque tú eres mi madre intelectual y nunca te olvidare.

Marco Rodrigo Velázquez Gómez