

206
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Ciencias

LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL MURINA:
SU RELACION CON VARIABLES GENETICAS, SEXUALES E INMUNOLOGICAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

PRESENTA
SABINA FABIOLA VALDEZ ORTEGA

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	página
Resumen.	3
I. Introducción.	5
II. Antecedentes.	13
III. Descripción de técnicas y metodologías utilizadas.	16
1. Cuantificación de poblaciones celulares.	18
2. Cuantificación de la expresión de H-2 por la técnica de ensayo inmunoenzimático celular (EIC).	19
3. Transferencia pasiva de células inmunes.	22
IV. Resultados.	24
1. Influencia de las variables genéticas en la susceptibilidad a la cisticercosis murina.	25
2. Influencia del sexo en la susceptibilidad.	25
3. Poblaciones celulares presentes en sangre periférica en animales susceptibles (BALB/c) y resistentes (BALB/b) en hembras y machos.	26
4. Poblaciones celulares presentes en la cavidad peritoneal de animales susceptibles (BALB/c) y resistentes (BALB/b) en hembras y machos.	26
5. Expresión de antígenos del complejo H-2 en células peritoneales de animales susceptibles (BALB/c) y resistentes (BALB/b) de ambos sexos.	28
6. Efecto de la transferencia de células peritoneales de ratones infectados sobre la carga parasitaria de receptores histocompatibles.	28
V. Discusión general y perspectivas.	30
VI. Apendice 1: Glosario.	35
VII. Apendice 2: Soluciones y reactivos utilizados.	44
VIII. Referencias.	48

RESUMEN

El modelo experimental de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*, accesible y sencillo de instalar, permite estudiar fenómenos inmunológicos en la relación hospedero-parásito. Este trabajo de tesis identifica aquellos genes que afectan de manera más importante la susceptibilidad a esta parasitosis, así como algunos de los mecanismos celulares involucrados en estas diferencias de susceptibilidad.

Diferentes cepas de ratones singénicos y congénicos recombinantes fueron infectados intraperitonealmente y la carga parasitaria se cuantificó 30 días después de la infección utilizando este parámetro como indicador de la susceptibilidad del hospedero al parásito. Los resultados muestran que la susceptibilidad innata a la infección por *T. crassiceps* está fuertemente asociada al haplotipo de histocompatibilidad del ratón, siendo el haplotipo H-2d el más susceptible mientras que los de haplotipo H-2b y H-2k fueron resistentes. Además nuestros resultados sugieren que las regiones S y/o D del complejo H-2 son las más críticamente involucradas en el control de la resistencia hacia la cisticercosis murina. Mientras tanto, poco o ningún efecto sobre la susceptibilidad pudo identificarse asociado al resto del genoma. Además se confirmó que las hembras son más susceptibles que los machos a esta parasitosis independientemente de la cepa de ratones empleada.

Intentando conocer los mecanismos celulares que determinan las diferencias de susceptibilidad estudiamos aspectos de la respuesta inmune celular en ratones BALB/c (susceptibles) y BALB/B (resistentes) infectados. Determinamos el porcentaje de las poblaciones celulares presentes antes y durante la infección parasitaria a nivel sistémico (sangre periférica) y a nivel localizado (cavidad peritoneal). Los resultados indican que la infección peritoneal no modifica sustancialmente la composición celular cualitativa ni cuantitativamente en sangre periférica, en tanto, en la cavidad peritoneal se observan modificaciones que ocurren según el tiempo de infección, el sexo y la cepa estudiada. Analizamos la posibilidad de que existan diferencias en eficiencia

en la presentación de antígenos por células presentadoras mediadas por diferencias en la concentración de antígenos de H-2 . Para ello cuantificamos antígenos del complejo H-2 en superficies de células peritoneales de ratones no infectados y de 5 y 30 días de infección susceptibles y resistentes. Los patrones de respuestas obtenidos fueron esencialmente similares. Considerando las marcadas diferencias de susceptibilidad entre estas cepas (BALB/c y BALB/B), nuestros resultados sugieren que las diferencias de susceptibilidad estarían importantemente mediadas por diferencias en la capacidad de expresar antígenos de H-2 por células presentadoras. Sin embargo la población de células del peritoneo es capaz de transferir protección en esta cisticercosis, según lo observamos en los resultados de transferencia de células peritoneales de animales previamente inmunizados a animales histocompatibles irradiados y desafiados. Quedan aun por dilucidar cuales son los mecanismos celulares que median estas diferencias de susceptibilidad.

I. INTRODUCCION

Modelo experimental de cisticercosis murina.

Taenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi 1810, es un cestodo que vive en la fase adulta de su ciclo natural en el intestino delgado de felinos y cánidos, especialmente el zorro. En la etapa de cisticerco, se reproduce en roedores y menos frecuentemente en lagomorfos, insectívoros, carnívoros y primates. En roedores infectados naturalmente, los cisticercos se localizan subcutáneamente cerca de la axila, cuello, y menos frecuentemente entre la escápula o en la región inguinal. Ocasionalmente los cisticercos pueden desarrollarse en la pleura o en la cavidad peritoneal. La infección natural en la cavidad peritoneal generalmente se acompaña con la infección en otro sitio. Este parásito además de la forma sexuada de reproducción es capaz de dividirse por gemación polar múltiple (Kroeze y Freeman, 1982). Esta reproducción asexual se ha utilizado para mantenerlo en el laboratorio a través de la inoculación del cisticerco en la cavidad peritoneal de ratones, localización que en condiciones experimentales permite que se reproduzca óptimamente. Así, este modelo experimental de cisticercosis resulta accesible y sencillo de instalar, y permite el estudio de los fenómenos inmunológicos que se suceden en la relación hospedero-parásito. Su estudio además se ve favorecido por la gran variedad de reactivos biológicos de que se dispone para esta especie (anticuerpos monoclonales contra marcadores celulares, sondas específicas para identificar diferentes regiones genómicas) y la grandes variedades genéticas de ratones (cepas de ratones genéticamente controladas, congénicas, singénicas y congénicas recombinantes entre otros).

Mecanismos inmunológicos mediados por antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad

La respuesta inmune involucra una serie de reacciones complejas contra sustancias que el organismo reconoce como ajenas. Las moléculas más importantes en esta respuesta son las inmunoglobulinas y las codificadas por los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Estas últimas fueron descubiertas por Gorer en 1938 en el ratón, y se han encontrado y estudiado

SUBREGION DEL CMH		DISTRIBUCION TISULAR DE ANTIGENOS
H-2	HLA	
K, D, L	A, B, C	Todas las células nucleadas y plaquetas eritrocitos (ratón)
I-A	D	linfocitos B
I-E		Macrófagos, monocitos, células epiteliales
I-J		células del melanoma, células T activadas. Linfocitos T supresores.

Tabla A. Distribución tisular de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad en el ratón (H-2) y en humano (HLA). (Roitt et al, 1985).

en muchos otros vertebrados, incluyendo al hombre (Klein, 1988).

Los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad¹ son reconocidos serológicamente, y su nombre se debe a la relación de estos antígenos con el rechazo en trasplantes de tejidos. Cuando se hizo evidente que no era un sólo gene el participante sino un conjunto de genes, estos se denominaron como grupo de antígenos del "Complejo Mayor de Histocompatibilidad" (CMH ó "H-2" en el ratón*. El estudio del H-2 se ha facilitado por la posibilidad de utilizar cepas genéticamente controladas de ratones que han permitido la identificación de los loci involucrados y sus productos fenotípicos.

Este conjunto de genes codifica proteínas de superficies celulares y plasmáticas. El CMH es un sistema altamente polimórfico, ya que cada uno de sus genes tiene una gran variedad de alelos. El conjunto de todos estos alelos es llamado haplotipo*. Sus loci están agrupados en tres clases, dependiendo de su homología y la relación entre sus productos fenotípicos. De esta forma, encontramos antígenos de clase I, II y III*. Los antígenos clase I y II tienen una función similar; ambas unen péptidos inmunogénicos para presentarlos a células T específicas. Se les puede distinguir por el tipo de célula con que interactúan; así, los antígenos clase I asociados a antígeno extraño interactúan con células T citotóxicas* CD8+, mientras los clase II interactúan con células T CD4+ con función ayudadora*. La expresión de las moléculas clase II está restringida hacia ciertas células con funciones especializadas en presentación de antígenos, mientras las clase I están expresadas en todas las células (Tabla A). De esta forma las primeras fases inmunológicas de una respuesta inmune están controladas por las moléculas de clase I y II.

1 A fin de facilitar la comprensión del contenido de esta tesis incluyo un glosario con la descripción de los principales conceptos empleados en este. Aquellos terminos marcados (*) remiten al lector a este glosario.

Determinismo genético de la respuesta inmune en infecciones parasitarias

La respuesta inmune está determinada genéticamente en cada especie y en cada individuo, y se ha sugerido que modificandola en algunos casos podemos modificar el destino de las enfermedades infecciosas. Se han registrado diferencias de susceptibilidad determinadas genéticamente para distintas especies. Si bien no constituyen la regla existen evidencias de asociaciones entre susceptibilidad a infecciones parasitarias y genes del complejo mayor de histocompatibilidad. La importancia de la participación de genes del MHC deriva del papel bien establecido de los productos de dichos genes en la regulación de fenómenos inmunológicos.

Los genes del H-2 influyen en la respuesta de ratones hacia infecciones con *Trichinella spiralis*. Se sabe que diferentes haplotipos se asocian a resistencia o susceptibilidad a este parásito (Wakelin, 1980). Aún cuando los genes que no pertenecen al H-2 ejercen una mayor influencia en la expulsión del parásito, los genes de H-2 también influyen. Esto se ha visto en ratones de haplotipo H-2q, los cuales expulsan más rápido los parásitos que aquellos que tienen haplotipos H-2k o H-2b. Los datos obtenidos con ratones recombinantes llevando el alelo q sugieren que los alelos del loci H-2K tienen una fuerte influencia en la inmunidad y también muestran que los alelos H-2D ejercen un importante efecto modulador (Wakelin y Donachie, 1983). En concordancia con la influencia del H-2 en la resistencia a este parásito, Wassom y colaboradores (1983) encontraron que estos genes influyen en la capacidad del hospedero para resistir una infección primaria y en la fecundidad de las hembras. Mediciones *in vitro* permitieron la identificación de los alelos Ts-1 localizados en la región A β del locus H-2 que funciona como un gene de respuesta inmune, y el Ts-2 localizado entre las regiones S y D que podría controlar la respuesta de las células T. En las cepas congénicas de H-2 más resistentes a *T. spiralis* (haplotipos b, s, f ó g), las células presentadoras de antígenos y subpoblaciones de células T presentan los antígenos del parásito asociados a los antígenos IA y estos ratones carecen de la

expresión de antígenos IE en sus células. Aquellas cepas de ratones que expresan antígenos IE resultan más susceptibles, lo que sugiere que estos antígenos están mediando la activación de poblaciones linfoides supresoras (Wakelin, 1985; Wasson et al, 1987).

En *J. muris* los genes del H-2 y del fondo genético tienen un papel importante en el control de la respuesta inmune humoral hacia la infección (Else y Wakelin, 1989). Se sabe que haplotipos H-2k son más susceptibles que haplotipos H-2b o H-2q estudiando la expulsión de los helmintos del intestino (Else y Wakelin, 1988).

El H-2 también influye en la schistosomiasis. Cepas congénicas de H-2 muestran diferencias en la mortalidad y en su respuesta inmune. Se ha reportado también la influencia del H-2 en la respuesta de ratones hacia la vacuna con parásitos atenuados (*S. mansoni* irradiados) donde los haplotipos H-2b y H-2d están asociados con la inmunidad más alta que haplotipos H-2k ó H-2a (Wakelin, 1989).

El complejo H-2 también influye en la resistencia adquirida hacia infecciones por *Leishmania donovani*, en donde cepas congénicas con diferente haplotipo muestran una marcada diferencia en el desarrollo de la enfermedad (Blackwell et al, 1980).

Se ha propuesto además que podría existir un control genético a través del H-2 en el repertorio de anticuerpos hacia antígenos secretados por *Ascaris* (Kennedy et al, 1988).

Existen evidencias de que el H-2 participa en la expulsión de bacterias de *Salmonella typhimurium*. Su función está asociada con la expresión de genes fuera del H-2 (Nauciel et al, 1988).

Presentación de antígenos y activación linfocitaria.

Podemos considerar como fase crítica en un contacto con algún parásito al periodo inicial, ya que una vez que el agente infeccioso logra evadir los mecanismos de defensa primarios, se instala, dando lugar a una infección. En este contexto, la

presentación de antígenos es uno de los primeros fenómenos inmunológicos, y es de suma importancia para decidir el curso de la infección. La participación del complejo H-2 en esta respuesta inmune es primordial, ya que está modulada por la interacción entre sus productos asociados a superficies celulares. De forma general en la presentación de antígenos* se dan las siguientes fases: la célula presentadora de antígeno entra en contacto con el antígeno extraño, y lo endocita, dirigiéndolo a los compartimientos lisosomales en donde ocurre una degradación parcial que genera péptidos que son excretados al medio celular o expuestos en la membrana plasmática, en donde se asocian a moléculas del H-2. Ambos son reconocidos por el receptor de los linfocitos T_H C formándose un complejo trimolecular entre el receptor, el antígeno y la molécula de H-2). El receptor del linfocito T solo reconoce al antígeno en el contexto de los antígenos del H-2*. Como respuesta a dicho reconocimiento y a la liberación de IL-1 por parte de la CPA el linfocito T produce IL-2 y prolifera.

Siguiendo este esquema, existen tres requerimientos esenciales para que una célula funcione óptimamente como presentadora de antígenos :a) expresar antígenos de histocompatibilidad clase I o II en su superficie; b) procesar el antígeno*; y c) sintetizar y liberar IL-1.

Aún cuando son los macrófagos las principales células que funcionan como presentadoras de antígenos (CPA), existe una gran variedad que puede realizar tal función salvando los requerimientos esenciales, por medio de múltiples y hasta el momento no del todo esclarecidas relaciones e interacciones celulares. Algunas de las células consideradas como CPA son los linfocitos B (Grey et al 1982, Kurt-Jones et al 1988, Chesnut et al 1982), las células dendríticas (Guidos et al 1987), células T (Grammer et al 1988, Hanke 1987), astrocitos del sistema nervioso central, células gliales de la retina (Roberge et al 1988) y fibroblastos humanos (Geppert y Lipsky, 1987).

PROTISTAS

PARASITO	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE	CEFA	REF.
<u>Leishmania mexicana</u>	M	H	DBA/2	1
<u>Leishmania major</u>	M	H	BALB/c	2
			DBA/2N	
			DBA/2J	
<u>Leishmania donovani</u>	M	H		3
<u>Trypanosoma rhodesiense</u>	M	H	C576B1/6J	4
			CBA/N	5
<u>Plasmodium berghei</u>	M	H	DBA	6
<u>Plasmodium chabaudi</u>	M	H	B10	7
<u>Trichomonas vaginalis</u>	H	M		8
<u>Brugia pahangi</u>	M	H	C57BL/6	9

HELMINTOS				
<u>Trichinella spiralis</u>	M	H	CD-18	10
			Wiss	
			C3H	11
<u>Nematospiroides dubius</u>	M	H	NAMRU-3	12
<u>Echinococcus granulosus</u>	M	H	BALB/c	13
<u>Taenia crassiceps</u>	M		BALB/B	
			BALB/F	
<u>Taenia taeniaeformis</u>	M	H	C3H/He	14

Tabla B. Patrones de susceptibilidad a enfermedades parasitarias urinarias asociadas a sexo (Fragoso et al, 1990).

REFERENCIAS:

- Alexander, J. (1988). Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with Leishmania mexicana and Leishmania major. Parasitology 96: 297-302.
- Mock, B. A. and Macy, C. A. (1988). Hormonal modulation of sex differences in resistance to Leishmania major sistreris infections. Infect. Immun. 56: 3316-3319.
- Grannini, M. S. H. (1986). Sex-influenced response in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis in mouse. Parasite Immunol. 8: 31-37.
- Greenblatt, H. C. and Rosenstreich, D. L. (1984). Trypanosoma rhodesiense infection in mouse: sex dependence or resistance. Infect. Immun. 42 (1): 237-240.
- Hauschka, T. S. (1947). Sex of host as a factor in chagas disease. J. Parasitol. 33: 399-404.
- Greenber, J., Nadel, E. M. and Coatney, G. K. (1953). The influence of strain sex and age of mouse on infection in Plasmodium berghei. J. Infect. Dis. 93: 96-100.
- Wunderlich, F., Mossmann, H., Helwig, M. and Schillinger, G. (1958). Resistance to Plasmodium chabaudi in B10 mice: influence of the H-2 complex and testosterone. Inf. and Immun. 25 (9): 2400-2406.
- Alexander, J. and Stimson, W. H. (1986). Sex hormones and the course of parasitic infection. Parasitol. Today 4 (7): 189-193.
- Zakanishi, H., Horii, Y., Terashira, K. and Fujita, K. (1985). Effect of testosterone on the susceptibility of C57B1/6 to infection with Brugia pahangi with reference to inflammatory cell response. J. Parasitol. 75 (3): 455-460.
- Reddington, J. J., Stewart, G. C., Krarar, G. W. and Kramer, M. A. (1981). The effects of host sex and hormones in Trichinella spiralis in the mouse. J. Parasitol. 67 (4): 548-557.
- Dobson, C. and Owen, M. E. (1978). Effect of host sex and passive immunity in mouse infected with Nematospiroides dubius. J. Parasitol. 8: 359-364.
- Frayha, G. J., Lawlor, W. K. and Dajani, R. M. (1971). Echinococcus granulosus in albino mice: effects of host sex and sex hormones on the growth of hydatid cysts. Exp. Parasitol. 29: 255-262.
- Sciutto, E., Fragoso, Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lorell, C., and Larralde, C.: Murine Taenia crassiceps cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. Parasitology Research. In press.
- Mitchell, G. F., Rajasekariah, G. R. and Rickard, M. D. (1980). A mechanism to account for mouse strain variation in resistance to the larval cestode Taenia taeniaeformis. Immunology 35: 418-469.

Mediación del sexo en la susceptibilidad a enfermedades parasitarias

La influencia del sexo es otra de las características que se ha intentado asociar a diferencias en la susceptibilidad a infecciones.

En casi todos los modelos murinos de enfermedades parasitarias estudiados los machos son más susceptibles, salvo en la tricomoniasis por *Trichomonas vaginalis* y la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, donde las más susceptibles son las hembras (Tabla B). Estas diferencias pueden estar determinadas por el cromosoma " Y ", o bien pueden ser el resultado de la influencia del sistema neuroendócrino, ya sea que modifique el compartimiento donde el parásito se desarrolla o modificando la respuesta inmune del hospedero contra el parásito (Fragoso et al 1990).

Objetivos de este trabajo de tesis

En nuestro laboratorio hemos encontrado que la susceptibilidad innata a la infección por *Taenia crassiceps* está fuertemente asociada al haplotipo de histocompatibilidad del ratón. El haplotipo H-2d resultó ser el más susceptible mientras que los de H-2b y H-2k fueron resistentes. Mientras tanto, poco o ningún efecto sobre la susceptibilidad pudo identificarse asociada al resto del genoma. En relación al efecto del sexo se confirmó que las hembras son más susceptibles que los machos a esta parasitosis.

En este trabajo de tesis se ha intentado identificar aquellos genes que afectan de manera más importante la susceptibilidad a esta parasitosis, así como algunos de los mecanismos celulares involucrados en las diferencias de susceptibilidad.

Para ello hemos estudiado las poblaciones celulares involucradas en esta infección en el tiempo a través de:

1. La caracterización de los tipos celulares (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos) de la cavidad peritoneal y de sangre periférica en ratones hembras y machos resistentes y susceptibles a diferentes tiempos de infección.
2. El estudio de la funcionalidad de estas células midiendo su capacidad de transferir inmunidad a ratones histocompatibles infectados.
3. La cuantificación de antígenos del complejo H-2 expresados en superficies celulares de células peritoneales de ratones susceptibles y resistentes, hembras y machos, a modo de identificar diferencias en su capacidad de presentar antígenos.

II. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio hemos estudiado el modelo experimental de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*; la información obtenida durante los últimos años se resume a continuación y constituye las bases inmediatas del presente trabajo de tesis.

Varias cepas de ratones singénicos y congénicos recombinantes fueron infectados inoculando intraperitonealmente diez cisticercos de *Taenia crassiceps* por ratón. Los ratones se sacrificaron en diferentes tiempos de infección y la carga parasitaria se cuantificó individualmente por conteo de los cisticercos. Este parámetro se utilizó como medida de susceptibilidad a la infección. Se encontró que los genes relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad (H-2) ejercen una gran influencia en el crecimiento del parásito, como se demuestra por las diferentes cargas parasitarias de ratones congénicos con el fondo genético BALB: ratones BALB/c (H-2d) son más susceptibles mientras que BALB/k (H-2k) y BALB/b (H-2b) son comparativamente resistentes. Los genes no pertenecientes al H-2 no tienen un efecto significativo en la susceptibilidad en las cepas H-2d, lo que se refleja en las cargas parasitarias similares en ratones BALB/c, DBA/2, y ([BALB/c x DBA/2] F1). Usando las cepas H-2b (BALB/b, C57BL/6J) y H-2k (C3H/HJ, BALB/k y C3HeB/FeJ) se encontró que genes del fondo genético no relacionados con H-2 pueden causar una influencia pequeña pero significativa en la carga parasitaria (Tabla I). Se utilizó también la cepa recombinante A/J (Kk, Ik, Sd, Dd) la cual resultó susceptible sugiriendo que las regiones S y/o D del complejo H-2 están probablemente involucradas en el control de la resistencia hacia la cisticercosis murina. Los ratones hembras de todas las cepas fueron más susceptibles que los machos (Tabla I).

Este trabajo de tesis intenta dilucidar el porqué las cepas que sólo difieren en su haplotipo de H-2 presentan diferencias de susceptibilidad hacia *Taenia crassiceps*. Para ello seleccionamos BALB/c como cepa susceptible y BALB/b como cepa resistente. Esta investigación se concentró en el estudio de la respuesta inmune celular.

A modo de abordar este estudio comenzamos por describir las

poblaciones celulares sistémicas (sangre periférica) y localizadas (cavidad peritoneal), determinando el porcentaje de las poblaciones celulares presentes en sangre y cavidad peritoneal antes y durante la infección parasitaria en ratones susceptibles y resistentes, en cada sexo y en dos cepas congénicas (BALB/c y BALB/B). En el intento de identificar las poblaciones celulares involucradas en la protección a esta cisticercosis y responsables de las diferencias de susceptibilidad transferimos células de animales previamente inmunizados a animales histocompatibles irradiados y desafiados. Por último, y considerando tanto la importancia de los fenómenos inmunológicos iniciales en la respuesta al parásito como los fenómenos de presentación antigénica, críticamente mediados por productos del H-2, intentamos estudiar sus características en ratones susceptibles y resistentes. En este sentido cuantificamos la expresión de H-2 y de antígenos procesados en la superficie de células inmunocompetentes durante la infección. Para ello desarrollamos un método que nos permitiera estudiar la expresión de antígenos de superficie celular (EIC). Células peritoneales enriquecidas en macrófagos por su procesamiento durante este método EIC, fueron obtenidas a partir de ratones susceptibles y resistentes no infectados y de 0, 5, y 30 días de infección. Se estudió la expresión de antígenos del complejo H-2 en estas poblaciones celulares cuantificando si los procesos de presentación antigénica se realizaban con diferente eficiencia.

III. DESCRIPCION DE TECNICAS Y METODOLOGIAS UTILIZADAS.

ANIMALES

Se utilizaron ratones machos y hembras de 6 a 8 semanas de edad de la cepa susceptible BALB/c (haplotipo H-2d) y de la cepa resistente BALB/B (haplotipo H-2b). Estos ratones fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

PARASITOS

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* pertenecen a la cepa ORF (Freeman, 1962). Esta cepa se ha mantenido en nuestro laboratorio por más de 4 años. Los parásitos se reproducen por gemación y son mantenidos en ratones hembras de la cepa BALB/c. Para experimentación se utilizan parásitos de ratones de no más de tres meses de infección. Los parásitos que provienen de ratones con infecciones más prolongadas presentan anomalías en su crecimiento.

INFECCION EXPERIMENTAL

A partir del grupo de ratones stock se obtienen los parásitos de la cavidad peritoneal, se extraen en amortiguador de fosfatos (PBS) y son lavados tres veces en la misma solución. Para infectar se seleccionan parásitos de aproximadamente 2 mm, los que son colectados en una jeringa de 1 ml y se inyectan intraperitonealmente 10 en cada ratón.

DISEÑO EXPERIMENTAL

a) Se escogieron los siguientes tiempos de infección: a los 0, 5, 15 y 30 días posteriores a la infección, se cuantificaron las poblaciones celulares presentes en sangre periférica y en cavidad peritoneal así como la expresión de antígenos de H-2 en la superficie de células peritoneales.

b) Se transfirieron células inmunocompetentes a receptores inunosuprimidos histocompatibles al haplotipo celular transferido y se cuantificó la carga parasitaria recuperada a los 30 días posteriores a la infección.

1. CUANTIFICACION DE POBLACIONES CELULARES

A) PREPARACION DE EXTENDIDOS:

a) Para obtener los extendidos sanguíneos los ratones son anestesiados con éter y se sangran periorbitalmente. Una gota de sangre es colocada en el extremo del portaobjetos, se realiza el frotis y se dejan secar a temperatura ambiente en una superficie plana procediendo luego a la tinción con hematoxilina-eosina.

b) Para los extendidos de células de cavidad peritoneal se disecan los ratones sangrándolos a blanco y matándolos por dislocación cervical. Se realiza un lavado cuidadoso de la cavidad con PBS a fin de obtener las células presentes en dicho compartimiento. Se centrifuga a 1500 rpm en tubos de centrifuga de plástico para evitar la adherencia de células; el sobrenadante es eliminado y se resuspenden las células en el mismo medio. Este procedimiento se repite dos veces más para lavar las células, después de la última centrifugación se resuspende en un volumen mínimo de PBS, se toman 10 μ l de la suspensión y se colocan en un portaobjetos para obtener el extendido que se tinte con hematoxilina-eosina. El resto de las células son tratadas para la cuantificación de expresión de antígenos de H-2.

Los extendidos se realizan por duplicado utilizando los 10 ratones de cada grupo para los extendidos de cavidad peritoneal y se muestrean sólo tres ratones por grupo en extendidos sanguíneos.

c) Método de Hematoxilina-Eosina (hematoxilina de Harris-eosina alcoholica):

- Lavar los extendidos en agua estilada.
- Ternir con hematoxilina de Harris de 1 a 3 minutos.
- Virar con agua de la llave.
- Lavar con agua destilada para detener el viraje.
- Deshidratar con alcoholes de 50 y 70 por 3 min cada uno.
- Ternir con eosina alcoholica de 1 a 3 minutos.
- Deshidratar con alcoholes de 90° (dos cambios) y absoluto durante 5 minutos en cada alcohol.
- Aclarar con xilol durante 5 minutos.

-Cubrir con balsamo de Canada o resina.

B) CONTAJE DE TIPOS CELULARES:

Los extendidos tratados con Hematoxilina-eosina son examinados en el microscopio óptico a 100x para obtener la fórmula linfocitaria. De cada cien células contadas se obtiene el porcentaje de macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los porcentajes celulares obtenidos en ambos tipos de extendidos son calculados por cuadruplicado para cada tiempo de infección, sexo y cepa. Los datos obtenidos son transformados, para su normalización, con una raíz cuadrática y son manejados por un análisis de varianza (prueba estadística paramétrica con $P < 0.05$) para establecer si existen o no diferencias significativas entre las siguientes variables: tiempo de infección, cepa, sexo, sangre periférica y cavidad peritoneal.

2. CUANTIFICACION DE LA EXPRESION DE H-2 POR LA TECNICA DE ENSAYO INMUNOENZIMATICO CELULAR (EIC).

A) Preparación de reactivos biológicos utilizados en el ensayo

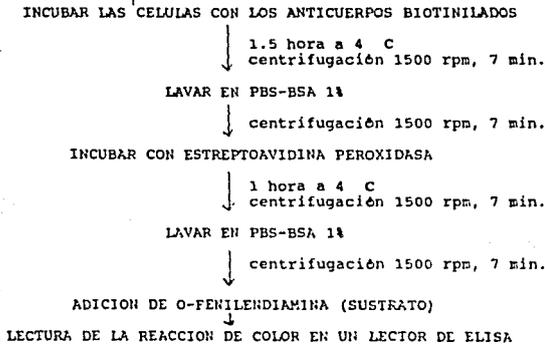
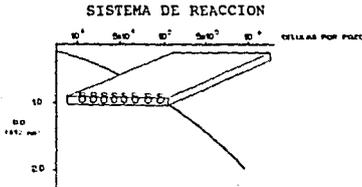
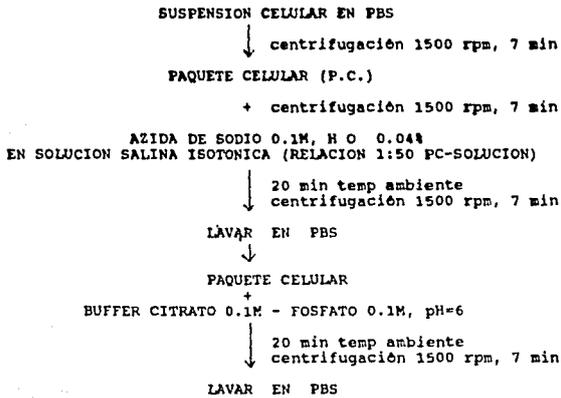
Para aumentar la sensibilidad de la reacción se utiliza un sistema biotina-avidina para lo cual los anticuerpos utilizados son biotinilados. La biotina unida al anticuerpo presenta cuatro sitios de fijación para avidina, de tal forma que la adición del sustrato dará una respuesta amplificada que facilita la cuantificación.

a) Purificación de anticuerpos:

El sistema de purificación se basa en la utilización de proteína A, que tiene capacidad de fijación a los fragmentos Fc de inmunoglobulinas. Para los IgG de ratón esta afinidad es muy baja; sin embargo, las condiciones de fijación de este método de purificación se han modificado para aumentar la eficiencia del pegado (BIO-RAD).

-Montar una columna de Agarosa-proteína A (Affi-Gel Proteína A MAPS II de BIO-RAD)

**FIGURA A. DESCRIPCION DE LA TECNICA
ENSAYO INMUNOENZIMATICO CELULAR (EIC)**



-Equilibrar la columna con el equivalente a 5 veces su volumen con buffer de pegado (Solución BB) hasta que el eluyente sea de pH=9.

-Dejar salir el fluido lentamente, aproximadamente 0.8 ml/min.

-Lavar con 15 ml de la solución BB y coleccionar el eluido en muestras de 1 ml. La elución se continúa controlando la cantidad de proteína eluida por medio de la absorbancia a 280 nm. Cuando se tiene una D.O=0.05 se considera completa esta fase.

-Eluir con 5 ml de buffer de elución (solución EB) y coleccionar muestras de 1ml en tubos que contengan 100 µl de una solución de TRIS-HCl 1M pH=9. Estas muestras son las que contienen la proteína deseada. Se cuantifica la concentración de proteína obtenida determinando la absorbancia a 280 nm.

-Lavar con 10 ml de la solución EB.

-Regenerar con 5 ml de Buffer de recuperación.

-Almacenar la columna con PBS-Azida de sodio 0.1 M.

b) Asociación de anticuerpos con Biotina

-Dializar el anticuerpo purificado en una solución de bicarbonato de sodio 0.1 M pH=8 24 horas a 4 C.

-Determinar la concentración proteica a 280 nm y se ajusta a 100 mg/ml con la solución de diálisis.

-Por cada 100 mg/ml de proteína adicionar 1.1 mg de biotina disuelta en 100 µl de DMSO.

-Incubar la muestra 2 horas a 25 C

-Parar la reacción adicionando 0.1 volumen de ClNH 1 M pH=7.2

-Dializar contra PBS 0.01 M pH=7.2 24 horas a 4 C.

-Almacenar los anticuerpos marcados y filtrados en millipore de 0.22 mm en alícuotas de 100 µl en PBS en relación 1:1 a 4 C .

B) Técnica de EIA para la cuantificación de la expresión de H-2 (Figura A).

a) Las células obtenidas de cavidad peritoneal son sometidas a una solución salina isotónica con azida de sodio al 0.1M en presencia de peróxido de oxígeno al 0.04 % por 20 min a temperatura ambiente. Esta fase corresponde a la inhibición de la

actividad de peroxidasa endógena de las células (macrófagos) que da una respuesta de fondo muy alta si no es eliminada. Se centrifugan a 1500 rpm 10 min. se resuspenden en PBS y se repite dos veces más. Las células se tratan con una solución citrato 0.1 M-fosfato 0.1 M pH=6 20 min a temperatura ambiente para hacer irreversible la inhibición de la peroxidasa durante el tiempo de reacción. Se lavan de la forma descrita y finalmente se resuspende en 5 ml de PBS-BSA al 1 % , se calcula la concentración celular de macrófagos por conteo en la cámara de Neubauer y se hacen las diluciones pertinentes para obtener las concentraciones de 2.5×10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 2.5×10^5 y de 5×10^5 cel/ml. Se adicionan por cuadruplicado 100 μ l de cada dilución en una placa de hemaglutinación de fondo en U de 96 pozos. Se centrifugan y después de eliminar el sobrenadante (quedando las células en el fondo del pozo) se adiciona por duplicado 100 μ l de una dilución 1:10 en PBS-BSA de un anticuerpo anti-H-2 o de inmunoglobulinas purificadas de sueros de animales sanos. Son incubadas a 4°C una hora y media, al cabo de dicho tiempo se centrifuga a 1500 rpm 7 min la placa con su contenido dos veces con 100 μ l por pozo con PBS-BSA al 1% y se incuba la reacción durante 60 minutos con estreptoavidina Peroxidasa en una dilución 1:2000. Por último se lavan tres veces con la misma solución, se adiciona el sustrato (O-feniléndiamina) y se detiene la reacción con H_2SO_4 4N. se cuantifica en un lector de ELISA la reacción determinando la D.O. a 493 nm (Fragoso et al 1990).

Esta cuantificación se realiza para los distintos tiempos de infección (0, 8, y 30 días) para cada sexo y para la cepa susceptible y la resistente.

En la reacción las inmunoglobulinas de ratones sanos utilizadas se emplean como control positivo de reacción considerando su capacidad de fijación a los receptores Fc de las superficies celulares de macrófagos, células que constituyen el porcentaje principal de las poblaciones celulares presentes.

Los datos son transformados por una raíz cuadrática para su normalización y sometidos a un análisis de varianza (prueba estadística paramétrica con $P < 0.05$) para detectar diferencias en

la expresión de antígenos de superficie .

3. TRANSFERENCIA PASIVA DE CELULAS

A) RATONES UTILIZADOS

a) Los ratones donadores fueron machos y hembras de las cepa C57BL/6J para obtener células H-2b y la cepa BALB/c para las células H-2d. La edad de los ratones es de 8 a 9 semanas.

b) Como ratones receptores se utilizaron hembras y machos de la F1 de la cepa híbrida histocompatible B6D2 que presenta un haplotipo d/b (Figura B).

B) IRRADIACION

A fin de inmunosuprimir la respuesta inmune del hospedero para ser transferido con células inmunes y estudiar el efecto de la transferencia se inmunosuprimieron los ratones receptores por irradiación. La dosis de la irradiación fue 600 RADS a una energía de 5 megas por dos minutos. La irradiación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología. Para mantenerlos quietos durante la exposición los ratones son previamente anestesiados con Pentobarbital al 63 % en una dilución de 1:10 con PBS 1x pH=7.3 de la cual se inyectan 100 µl por cada 10 g de peso del ratón. Los ratones se mantienen luego en el bioterio con suministro de agua y alimento estéril usando Oxitetraciclina soluble (antibiótico) desde una semana antes de la irradiación y durante todo el experimento, cambiando diariamente la jaula y manteniéndola estéril.

C) OBTENCION DE CELULAS A TRANSFERIR

a) 10 ratones de cada cepa donadora fueron vacunados intraperitonealmente con 100 µg de extracto total de cisticercos de *Taenia crassiceps* por ratón, 5 días antes de su sacrificio. Para obtener las células presentes en cavidad peritoneal los ratones son anestesiados con éter y sangrados a blanco pericocularmente. Posteriormente se remojan en una solución de

benzal para ser disectados en campana de flujo laminar. Las células son obtenidas lavando repetidamente la cavidad peritoneal con medio de cultivo RPMI 1640 . La suspensión celular es centrifugada cinco minutos a 1500 rpm y lavada una vez más con el mismo medio. Se determina su concentración por conteo en una cámara de Neubauer y se inoculan 4×10^5 células por ratón.

D) TRANSFERENCIA Y DESAFIO

El desafío de los ratones se realiza de la misma forma mencionada para la infección experimental, sólo que la obtención de los parásitos y manejo posterior hasta su inoculación se realiza en condiciones estériles.

La concentración celular mencionada es inoculada intraperitonealmente en grupos de 13 a 14 ratones. Los grupos controles fueron grupos de ratones no irradiados y desafiados y ratones irradiados y desafiados, los grupos experimentales fueron ratones irradiados e inoculados con células provenientes de ratones previamente vacunados de haplotipo H-2b y H-2d y desafiados con 10 parásitos por ratón. La transferencia de células se realiza entre ratones del mismo sexo utilizando en cada caso ambas cepas donantes. Los ratones recibieron una segunda transferencia del mismo tipo celular 10 días después del desafío.

Treinta días después del desafío los ratones son sacrificados y se cuantifica la carga parasitaria individual (número de parásitos presentes) recuperada de la cavidad peritoneal.

Los datos obtenidos son transformados por una raíz cuadrática para su normalización y son sometidos a un análisis de varianza (prueba estadística paramétrica con $P < 0.05$) para saber si existen diferencias significativas en las variables manejadas (irradiación y transferencia de células de haplotipo H-2b y H-2d). También se realizan gráficas de distribución de frecuencias de carga parasitaria.

IV. RESULTADOS

TABLA 1
 SUSCEPTIBILIDAD HACIA LA CISTICERCOSIS CAUSADA POR *Taenia crassiceps*
 DE RATONES CON HAPLOTIPOS H-2 d, b Y k EN DIFERENTES FONDOS GENÉTICOS

HAPLOTIPO H-2	CEPA	HEMBRAS PROMEDIO DE LA CARGA PARASITARIA \pm *SE (n)	MACHOS PROMEDIO DE LA CARGA PARASITARIA \pm SE (n)
d	BALB/c	110.3 \pm 4.6 (70) ^a	25.6 \pm 1.9 (50) ^b
	DBA/2	83.2 \pm 9.6 (9) ^a	N.D.
	(BALB/c \times DBA/2)F1	123.6 \pm 17.3 (7) ^a	34.0 \pm 4.2 (16) ^b
a(k/d)	A/J	115.3 \pm 5.4 (47) ^a	30.0 \pm 2.5 (45) ^b
b	BALB/b	18.1 \pm 2.3 (18) ^b	0.9 \pm 0.4 (20) ^{d,c}
	C57 BL/6J	4.8 \pm 1.9 (26) ^c	0.4 \pm 0.2 (20) ^{d,c}
k	BALB/k	33.1 \pm 6.0 (15) ^b	0.0 \pm 0.0 (15) ^d
	C3H/HeJ	21.8 \pm 5.3 (15) ^b	3.7 \pm 1.7 (15) ^{d,c}
	C3HeB/FeJ	6.0 \pm 2.2 (10) ^c	2.7 \pm 1.5 (21) ^{d,c}

- Error estándar de la media (n) número de ratones muestreados.
 a, b, c y d: datos estadísticos marcados con la misma literal no son significativamente diferentes de cada uno mientras aquellos con diferentes literales son significativamente diferentes (P 0.01). Grupos marcados con dos literales no son significativamente diferentes de dos grupos que difieren significativamente en sus cargas parasitarias entre ellos mismos: uno localizado en el extremo superior de la distribución y el otro en el extremo inferior.

1. INFLUENCIA DE LAS VARIABLES GENÉTICAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CISTICERCOSIS MURINA.

Ratones de nueve cepas (BALB/c AnN, DBA/2, BALB/c X DBA/2 F1, BALB/b, C57BL/6J, C3H/HeJ, C3Hs B/FeJ, BALB/k y A/J) fueron infectados intraperitonealmente con diez cisticercos de la cepa ORF de *Taenia crassiceps* por ratón. Los animales se sacrificaron 30 días después y se cuantificaron las cargas parasitarias individuales (abundancia de parásitos). Las medias del número de parásitos establecidos en cada cepa se anotan en la Tabla I. En esta Tabla se incluyen ratones congénicos en H-2 con el fondo genético BALB en donde se pueden distinguir dos clases de fenotipos: la susceptible H-2d con grandes cargas parasitarias y las resistentes H-2b y H-2k con pequeñas cargas parasitarias.

Estos resultados muestran que genes pertenecientes al complejo mayor de histocompatibilidad son fundamentales en el control de esta parasitosis, mientras que el fondo genético no tiene mayor influencia en el desarrollo de la parasitosis.

También se observa que cepas con el haplotipo H-2d presentan cargas parasitarias más numerosas, mientras que las cepas con haplotipo H-2b y H-2k presentan cargas parasitarias significativamente menores. No se encontraron diferencias significativas entre las tres cepas susceptibles H-2d. Sin embargo sólo en las hembras con los haplotipos resistentes, H-2b y H-2k, se observaron diferencias significativas asociadas a cada cepa, aunque estas diferencias fueron de mucho menor magnitud. La cepa recombinante A/J de haplotipo H-2a que presenta los alelos Kk, Ak, Ek, Dd, Sd presentó cargas parasitarias esencialmente idénticas a las cepas H-2d. Este resultado sugiere que las regiones S o/y D del complejo H-2 están probablemente involucradas en el control de esta parasitosis.

2. INFLUENCIA DEL SEXO EN LA SUSCEPTIBILIDAD.

Los ratones hembras fueron más susceptibles a la cisticercosis intraperitoneal que los machos. Esta fuerte asociación entre el sexo del hospedero y el crecimiento del parásito se observa en todas las cepas utilizadas (Tabla I).

TABLA II

POCENTRAL DE CELULAS PRESENTES EN SANGRE DE RATONES
RESISTENTES (RWA) O DE ALTO SENS

	MACHOS				HEMbras			
	Ratones no infectados	Días después de la infección			Ratones no infectados	Días después de la infección		
		5	15	30		5	15	30
Tipos de células contadas:								
Macrófagos	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos	27	27	22	38	20	27	41	28
Eosinófilos	0	0	0	0	0	0	0	0
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	73	73	78	62	71	73	50	73
Relación L/S	0,30	0,30	0,28	0,61	0,40	0,30	0,60	0,38

+ Número de días después de la infección intraperitoneal con 10 ejemplares por ratón.
o Media del número de células de tres ratones por grupo contadas por cuadruplicado.

TABLA III

POCENTRAL DE CELULAS PRESENTES EN SANGRE DE RATONES
SUSCEPTIBLES (SW/C) O DE ALTO SENS

	MACHOS				HEMbras			
	Ratones no infectados	Días después de la infección			Ratones no infectados	Días después de la infección		
		5	15	30		5	15	30
Tipos de células contadas:								
Macrófagos	0	0	0	0	0	0	0	0
Neutrófilos	23	33	30	51	20	23	45	30
Eosinófilos	0	0	0	0	0	0	0	0
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	77	67	64	49	74	77	57	70
Relación L/S	0,28	0,49	0,50	1,00	0,35	0,29	0,75	0,42

+ Número de días después de la infección intraperitoneal con 10 ejemplares por ratón.
o Media del número de células de tres ratones por grupo contadas por cuadruplicado.

3. POBLACIONES CELULARES PRESENTES EN SANGRE PERIFERICA EN ANIMALES SUSCEPTIBLES (BALB/c) Y EN ANIMALES RESISTENTES (BALB/b) EN HEMBRAS Y MACHOS.

Se estudiaron los porcentajes de monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos en animales no infectados y en diferentes tiempos posteriores a la infección (Tablas II y III) y se observó que:

a) La infección con *Taenia crassiceps* no modifica los tipos celulares presentes en sangre periférica. Así, la población celular en animales no infectados está constituida por neutrófilos y linfocitos fundamentalmente y esta misma constitución se mantiene después de la infección.

b) Animales no infectados presentan igual porcentaje de linfocitos y neutrófilos independientemente de cepa y sexo.

c) En animales resistentes las células no se modifican ni con la infección ni durante su curso. Mientras tanto, en animales susceptibles se observan diferencias significativas por ligero aumento en el porcentaje de neutrófilos y consecuentemente reducción de linfocitos aunque estas diferencias son pequeñas en valor absoluto.

En resumen, la infección peritoneal no modifica sustancialmente la composición celular cualitativa ni cuantitativamente en sangre periférica. Esta observación sugiere que esta parasitosis no afecta a nivel sistémico al ratón.

4. POBLACIONES CELULARES PRESENTES EN LA CAVIDAD PERITONEAL DE ANIMALES SUSCEPTIBLES (BALB/c) Y EN ANIMALES RESISTENTES (BALB/b) EN HEMBRAS Y MACHOS.

Se estudiaron los porcentajes de monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos en animales no infectados y en diferentes tiempos posteriores a la infección y se observó que:

a) La infección con *Taenia crassiceps* modifica los tipos y porcentajes celulares presentes en la cavidad peritoneal. Así, en

TABLA IV
PORCENTAJE DE CÉLULAS PRESENTES EN LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES RESISTENTES (BALB/c) DE AMBOS SEXOS

	MACHOS				HEMBRAS			
	Ratones no infectados	Días después de la infección			Ratones no infectados	Días después de la infección		
		5	15	30		5	15	30
Tipos de células contadas:								
Monocitos	23	45	44	35	23	40	45	50
Neutrófilos	10	9	25	22	6	21	15	20
Eosinófilos	0	6	14	25	1	6	26	18
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	67	40	17	18	70	31	14	12

+ Número de días después de la infección intraperitoneal con 10 cisticercos por ratón.
 o Media del número de células de tres ratones por grupo contados por cuadruplicado.

TABLA V
PORCENTAJE DE CÉLULAS PRESENTES EN LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATONES SUSCEPTIBLES (BALB/c) DE AMBOS SEXOS

	MACHOS				HEMBRAS			
	Ratones no infectados	Días después de la infección			Ratones no infectados	Días después de la infección		
		5	15	30		5	15	30
Tipos de células contadas:								
Monocitos	15	27	47	48	36	33	32	28
Neutrófilos	10	23	9	25	7	26	6	41
Eosinófilos	1	17	33	20	1	8	36	12
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0
Linfocitos	71	33	11	8	56	33	26	19

+ Número de días después de la infección intraperitoneal con 10 cisticercos por ratón.
 o Media del número de células de tres ratones por grupo contados por cuadruplicado.

animales no infectados la población celular está constituida por linfocitos, monocitos y neutrófilos. Esta constitución se ve afectada con la infección debido a la presencia de eosinófilos. Además se presenta un cambio en los porcentajes de los diferentes tipos celulares (Tablas IV y V).

b) Los neutrófilos y eosinófilos difieren en cantidad según la cepa y el tiempo de infección y los monocitos además según el sexo. Para linfocitos se observan diferencias sólo en el tiempo.

c) En los machos de ambas cepas los monocitos aumentan con el tiempo de infección. En la cepa BALB/b aumentan tempranamente en relación a la cepa BALB/c y los 15 días todos los valores se igualan.

d) En las hembras susceptibles no se observan modificaciones durante la infección, en tanto en las hembras resistentes aumentan con la infección pero no durante la misma al igual que los machos de la misma cepa.

e) Las hembras y machos resistentes y susceptibles no infectados tienen más linfocitos antes que después de la infección, disminuyendo durante ésta.

f) Los neutrófilos aumentan con la infección tanto en los animales susceptibles como resistentes alcanzando los valores máximos las hembras BALB/c a los 30 días.

g) Los eosinófilos aparecen con la infección aumentando en tiempos posteriores a ésta en la cepa BALB/B y alcanzando su máximo porcentaje a los 15 días de infección en la cepa BALB/c.

En resumen, en la cavidad peritoneal sí se observan modificaciones con la infección que ocurren según el tiempo de ésta, el sexo y la cepa estudiada. En estas modificaciones llama la atención el cambio de composición de las poblaciones celulares a consecuencia de la infección que aumenta notablemente las poblaciones de células fagocíticas (monocitos/neutrófilos) y la población de eosinófilos.

FIGURA 1b

Expresión de antígenos de H-2 en células peritoneales de ratones susceptibles (BALB/c) machos y hembras

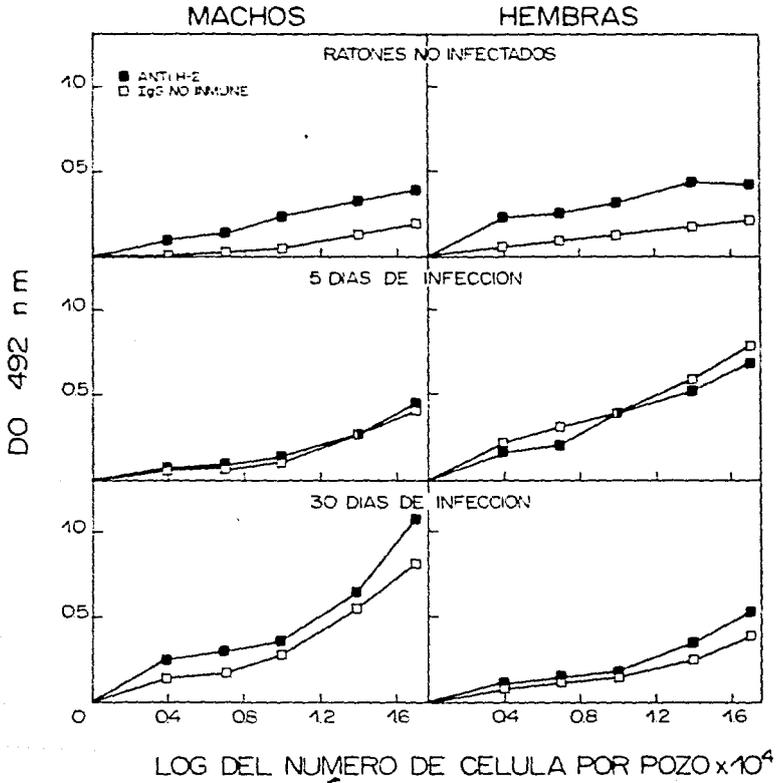
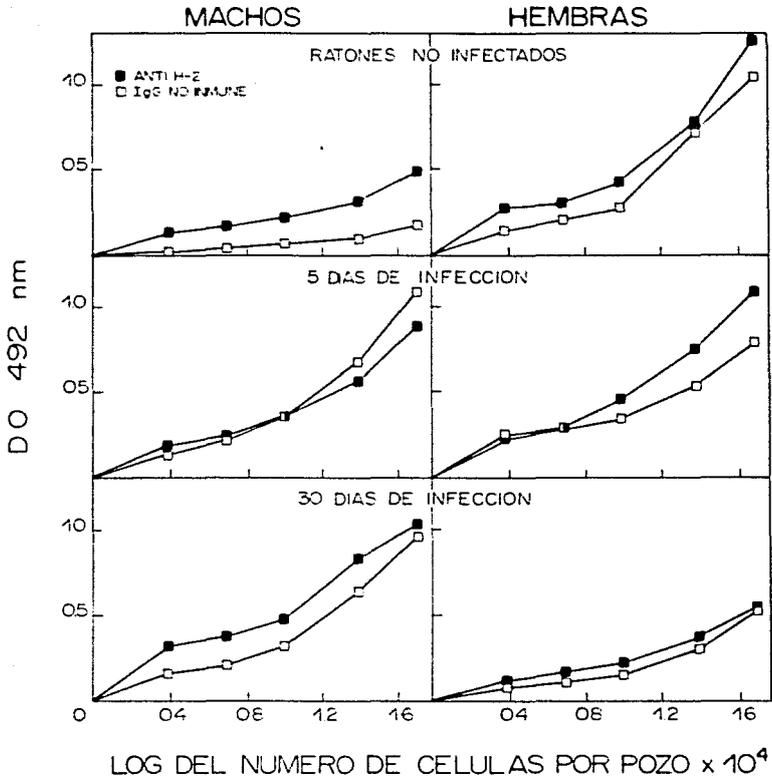


FIGURA 1a

Expresión de antígenos de H-2 en células peritoneales de ratones resistentes (BALB/B) machos y hembras



5. EXPRESION DE ANTIGENOS DEL COMPLEJO H-2 EN CELULAS PERITONEALES DE ANIMALES SUSCEPTIBLES (BALB/c) Y RESISTENTES (BALB/b) DE AMBOS SEXOS.

Se cuantificó la expresión de antígenos del complejo H-2 en superficies de células peritoneales de ratones no infectados y de 5 y 30 días de infección. Esta cuantificación se realizó con el ensayo inmunoenzimático (EIC) descrito en materiales y métodos.

Para la detección de antígenos del H-2 se utilizó un anticuerpo monoclonal de rata anti H-2 de ratón (M.142) (Kennett *et al* 1990) y como control positivo de reacción se utilizaron inmuglobulinas IgG de ratón considerando su capacidad de fijación a receptores Fc presentes en macrófagos y linfocitos B fundamentalmente (CPAs).

Como se observa en la Figura 1a y 1b animales no infectados BALB/b y BALB/c presentan niveles similares de H-2 y de receptores Fc en superficie y ambos antígenos aumentan durante la infección. Este aumento sólo es significativamente mayor para la cepa resistente a los 5 días de infección.

Las hembras susceptibles aumentan a los 5 días de infección sus niveles de expresión, en tanto en las resistentes disminuyen los niveles durante ésta.

Sin embargo, las diferencias en los niveles de expresión de estos antígenos son en valores absolutos pequeñas, siendo el patrón de respuestas obtenidas esencialmente similares.

6. EFECTO DE LA TRANSFERENCIA DE CELULAS PERITONEALES DE RATONES INFECTADOS SOBRE LA CARGA PARASITARIA DE RECEPTORES HISTOCOMPATIBLES.

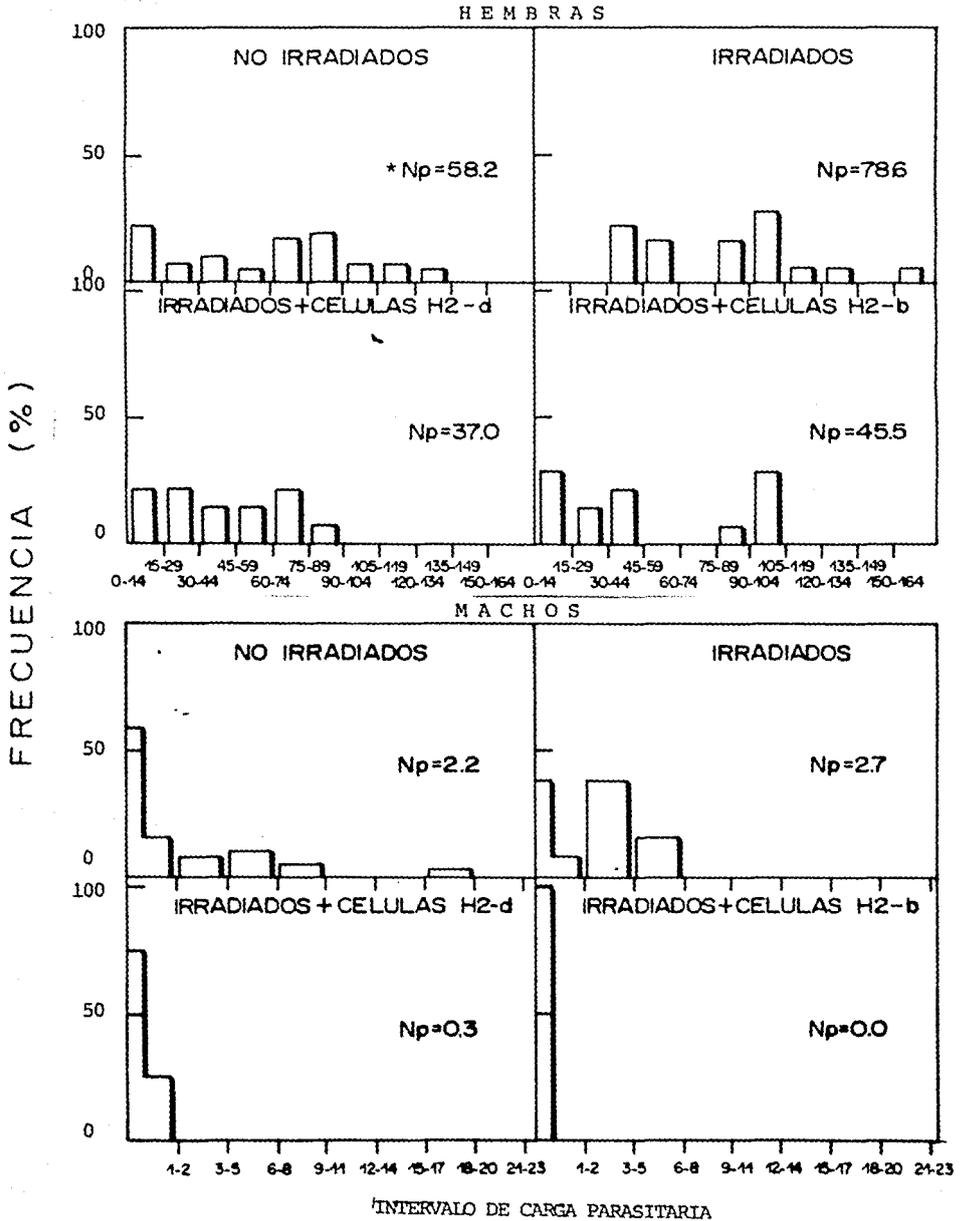
a) Efecto de la irradiación en la carga parasitaria.

La dosis de irradiación utilizada en los ratones efectivamente deprime inmunológicamente según se ha estudiado en nuestro laboratorio (Huerta *et al*, 1990).

El efecto de la irradiación sobre la carga parasitaria en hembras y machos puede observarse en la Figura 2. En los machos y

FIGURA 2

Efecto de la transferencia pasiva de células peritoneales de ratones infectados sobre la carga parasitaria de ratones histocompatibles



en las hembras la irradiación no modificó la carga parasitaria esperada de forma significativa (58.2 vs 78.6 para hembras y 2.2 vs 2.7 para machos). Sin embargo, observando estos valores graficados a manera de histograma (distribución de frecuencias de cargas parasitarias de intervalos de 15 en hembras y de 2 en machos) se distingue que la irradiación en hembras reduce a cero el número de animales completamente resistentes (rangos de 0-14 y de 15-29) mientras en machos reduce parcialmente el número de animales completamente resistentes (rango de 0)

b) Efecto de la transferencia de células inmunes.

En la Figura 2 puede observarse que las transferencias de células inmunes en animales irradiados y parasitados protege significativamente al hospedero obteniéndose un mínimo de parásitos en animales transferidos en relación al esperado para animales sin transferir en hembras (78 vs 37 ó 45 según el haplotipo celular transferido) y en machos (2.7 vs 0.3 ó 0.0 según el haplotipo celular transferido).

Comparando las cargas parasitarias obtenidas en animales transferidos con células de haplotipo susceptible (H-2d) ó resistente (H-2b) no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Esto implica que las células peritoneales no fueron capaces de conferir resistencia diferencial en los hospederos.

V. DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS.

En esta tesis se intenta ahondar en el estudio del determinismo genético y sexual de la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina y descubrir algunos aspectos de la respuesta inmune celular que el hospedero produce durante la infección. Las bases fundamentales de este proyecto las constituyen:

A. Las diferencias de susceptibilidad encontradas donde genes del complejo mayor de histocompatibilidad (H-2) influyen importantemente en el crecimiento del parásito. Así, las cepas con haplotipo H-2d son significativamente más susceptibles que las cepas H-2b y H-2k. Los datos obtenidos de la cepa recombinante utilizada sugieren que las regiones críticas en el desarrollo de la infección son S y/o D. Mientras tanto, el resto del genoma no parece tener un efecto significativo en la susceptibilidad.

B. Las diferencias de susceptibilidad encontradas en relación al sexo del hospedero. Las hembras son más susceptibles que los machos en todas las cepas estudiadas.

Este trabajo es un intento por identificar aquellos mecanismos inmunológicos que críticamente influyan en las diferencias de susceptibilidad descritas. En este sentido los resultados principales obtenidos son:

1. Los porcentajes celulares determinados en sangre periférica de ratones sanos y ratones de 5, 15, y 30 días de infección son estadísticamente iguales. Esto implica que la infección con este parásito no compromete sistémicamente al hospedero. Queda aún por conocer que tanto se ve afectado el estado de salud general del hospedero infectado.

2. Los porcentajes celulares determinados en cavidad peritoneal de ratones sanos y de ratones infectados (5, 15, y 30 días de infección) indican que la infección modifica el repertorio celular encontrado afectando los porcentajes celulares descritos (macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos) de manera diferente según el tiempo de infección.

Entre estas diferencias llama la atención la aparición de eosinófilos con la infección en este compartimiento. Estas

células, como se ha descrito, tienen asociadas funciones fagocíticas, y son además mediadoras de hipersensibilidad inmediata, con la consecuente producción de factores proteolíticos y enzimáticos. Participan también en mecanismos celulares a consecuencia de la infección parasitaria. Sin embargo, no parecen mediar fenómenos inmunológicos asociados con resistencia y susceptibilidad ya que al menos en número son iguales entre hembras y machos y las diferencias observadas entre BALB/b y BALB/c son pequeñas en valores absolutos.

3. La respuesta de inmunidad por transferencia de células inmunes a hospederos desafiados indican que las células de cavidad peritoneal son capaces de conferir inmunidad protegiendo parcialmente a las hembras desafiadas y completamente a los machos desafiados.

Sin embargo, la transferencia de células de animales genéticamente resistentes o animales genéticamente susceptibles previamente inmunizados no arroja diferencias significativas. Lo que sugiere que las células de este compartimento obtenidos en estos tiempos de infección no son las que determinan las diferencias de susceptibilidad relacionadas a cepas de ratones.

Otra posibilidad que puede contemplarse a la luz de estos resultados es que la transferencia de células de la cavidad peritoneal inmunizadas modifique la capacidad innata de estas poblaciones celulares frente al desafío e iguale su capacidad de respuesta. Esta posibilidad podría explorarse realizando transferencias celulares con células no inmunes.

Este resultado aunado a que los tipos celulares presentes en animales infectados de diferente sexo o cepa son esencialmente iguales hacen muy probable la propuesta de que, a diferencia de lo esperado, las células que están directamente comprometidas con el parásito en la cavidad donde la infección ocurre (cavidad peritoneal) no son las críticas en determinar las diferencias de susceptibilidad identificadas.

4. Otro resultado que surge de este estudio es que la irradiación no modifica la carga parasitaria esperada a pesar de

efectivamente deprimir inmunológicamente al hospedero (según lo reportado por Huerta y colaboradores).

Esto podría deberse a las diferencias de susceptibilidad de las células a la irradiación características de cada tipo celular o dependientes de su ubicación. Así, durante la irradiación las gonadas son protegidas con dispositivos adecuados de plomo y podrían en este proceso quedar protegidos nódulos linfáticos capaces de producir las células necesarias para mantener niveles parasitarios equivalentes a los de animales no irradiados.

5. Otra observación relevante es la gran similitud en la concentración de antígenos del complejo H-2 en superficie de células peritoneales. Esta semejanza sugiere que la presentación de antígenos por macrófagos a linfocitos T ayudadores, respuesta responsable de la proliferación celular, no sería el mecanismo crítico en esta infección. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en la identificación de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad y las funciones que sus productos median indicando que los antígenos de clase I son los involucrados en determinar las diferencias de susceptibilidad. Probablemente la búsqueda de diferencias de expresión de estos antígenos en particular permitan observar diferencias de expresión. Sin embargo, las diferencias en los niveles de expresión de estos antígenos son en, valores absolutos, pequeñas, siendo el patrón de respuestas obtenidas esencialmente similares lo que sugiere que la presentación antigénica en el contexto de células peritoneales (macrófagos y linfocitos B) no constituyen los eventos más fuertemente involucrados en las diferencias de susceptibilidad a esta cisticercosis.

No se debe de descartar la posibilidad de que en los eventos de expresión antigénica aquí estudiados ocurran diferencias significativas en tiempos muy tempranos de la infección, y que no hayan sido detectadas en los intervalos de tiempo postinfección elegidos en este trabajo.

También debemos considerar aspectos de este estudio que dificultan la interpretación del significado biológico de estos resultados. En este sentido figuran: a) El uso de poblaciones de

células totales presentes en peritoneo cuya composición se modifica durante el tiempo de infección; sin embargo, este factor está relativamente controlado considerando que esta población es procesada en el ensayo de cuantificación de antígenos de superficie (EIC) y está muy enriquecida en macrófagos (75-95 %). y b) El estudio de antígenos de superficie presenta la complicación de que se intenta fotografiar instantes de eventos biológicos que se modifican en el orden de segundos, y el detenerlos por procedimientos químicos o físicos implican efectos que pueden comprometer el fenómeno en estudio.

Espero que los resultados obtenidos en esta evaluación de la respuesta inmune celular en la cisticercosis experimental murina señalen algunos caminos de exploración más probablemente fructíferos en la identificación de factores biológicos asociados a la susceptibilidad en la cisticercosis por *Taenia crassiceps*.

VI. APENDICE 1

GLOSARIO

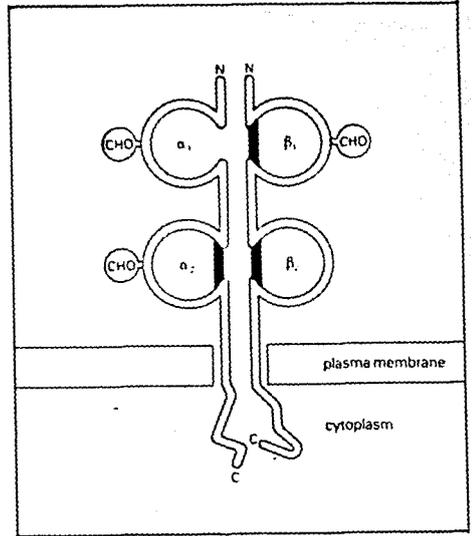
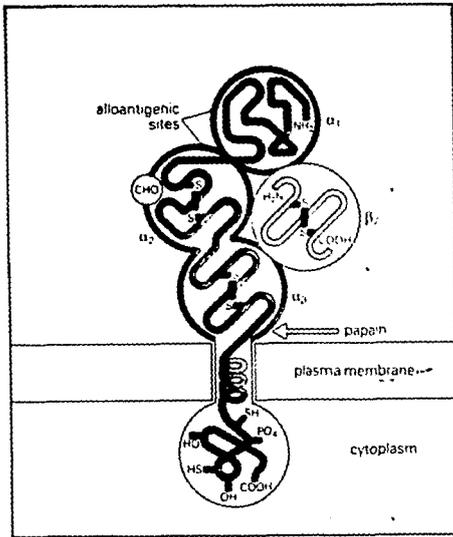


Figura 1. a) Estructura de antígenos de clase I intacto. La cadena codificada por el H-2 tiene tres dominios globulares llamados α_1 , α_2 y α_3 . El dominio α_3 está asociado con el péptido, no codificado por el H-2, β_2 -microglobulina que es un pequeño péptido globular estabilizado por un enlace intracatenario disulfuro. Este péptido tiene una estructura terciaria similar a un dominio de una inmunoglobulina. Una corta sección hidrofílica del componente codificado por el H-2 permanece dentro del citoplasma, en el extremo -COOH. Una sección hidrofóbica atraviesa la membrana y la mayoría del polipéptido, comprendiendo los tres dominios globulares; se localizan en la superficie celular. Los sitios aloantigénicos (que lleva determinantes específicos para cada individuo) se localiza entre los dominios α_1 y α_2 donde existe una unidad carbohidratada adherida al dominio α_2 .

b) estructura de antígenos de clase II. Están formados por dos péptidos diferentes (α y β) unidos no covalentemente que atraviesan la membrana plasmática por su extremo carboxilo terminal. Ambas cadenas tienen dos dominios globulares estructuralmente relacionados con dominios de inmunoglobulinas y todos excepto el dominio α_1 están estabilizados por enlaces disulfuro intracatenarios. Ambas cadenas tienen unidades carbohidratadas. La cadena β contiene los sitios aloantigénicos (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

Antígenos clase I:

Los genes de las regiones K, D y L del complejo mayor de histocompatibilidad codifican para glicoproteínas de superficie celular. Estos productos llamados antígenos clase I están relacionados con el rechazo en trasplantes de tejidos y los antígenos serológicos que inducen la formación de anticuerpos. Son considerados marcadores celulares por su amplia distribución. Cuando una célula normal propia se modifica, los linfocitos T citotóxicos la identifican a través de los antígenos clase I para eliminarla. Estos antígenos pueden ser identificados serológica o histogenéticamente. Las moléculas de clase I están constituidas por una cadena variable llamada alfa de peso molecular de 45,000 y una cadena constante denominada β 2-microglobulina de peso molecular aproximado de 12,000 que se codifica fuera del CMH. Ambas cadenas están unidas en forma no covalente. La cadena alfa confiere la especificidad antigénica y su variación alélica (Fig. 1) (Sciutto, 1987).

Antígenos clase II:

Estos antígenos llamados Ia o Ir (por regular la respuesta inmune hacia algunos antígenos) se expresan en linfocitos B, CPA, células de Kupfer, células de Langerhans y en células relacionadas con el sistema hematopoyético. Los linfocitos T cooperadores reconocen a un antígeno cuando este está asociado a moléculas clase II en la superficie de las CPA y a su vez los linfocitos B activados por IL-2 reconocen esta asociación y responden produciendo anticuerpos. Las moléculas clase II están formadas por dos cadenas variables (α y β) de peso molecular aproximado de 33,000-35,000 y de 28,000-30,000 respectivamente (Fig. 1) (Sciutto, 1987).

Antígenos clase III:

Los genes de la región III del MHC codifican moléculas del sistema de complemento, C2, C4 y factor B, y la enzima 21 hidroxilasa que aparentemente no participa en el sistema inmune. En cuanto a su distribución celular, macrófagos y hepatocitos producen C4 y linfocitos y macrófagos el factor B (Sciutto, 1987).

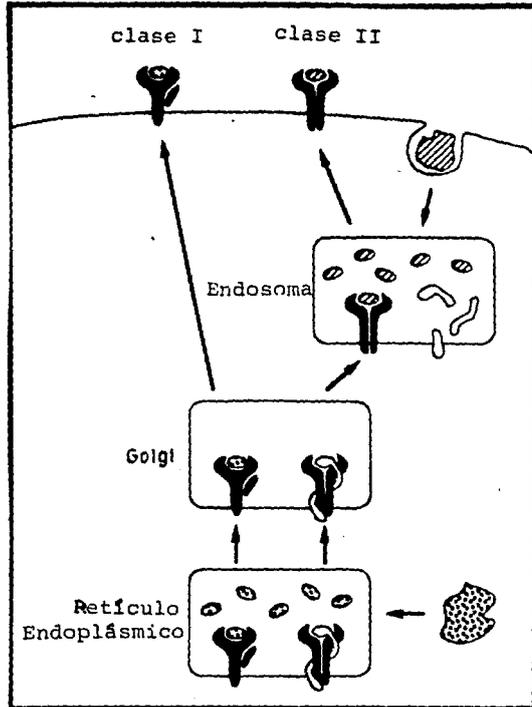


Figura 2. Procesamiento del antígeno para su unión a moléculas clase I ó clase II (en negro y la cadena invariable en blanco) dependiendo de su origen, antígeno exógeno (rayas) y antígeno endógeno (moteado) (Long, 1988).

Antígenos exógenos y endógenos:

Distinción entre antígenos dada en base a la presentación de antígenos restringida a moléculas clase I y II. Una forma de distinguir y diferenciar la presentación de antígeno dada por moléculas clase I o clase II es la fuente de la cual proviene el antígeno, los exógenos pueden ser presentados por clase II y los endógenos por clase I. Los antígenos exógenos internalizados en la CPA por endocitosis son presumiblemente procesados en el medio ácido de los endosomas y los fragmentos resultantes pueden solamente interaccionar con moléculas clase II. Un antígeno endógeno requiere para su presentación por moléculas clase I estar en el citoplasma, su unión ocurre en el retículo endoplásmico (RE, en donde existen compartimentos separados para cada clase de molécula). La distinción entre moléculas clase I y II en la presentación de antígenos endógenos puede ser por características estructurales más que en vías de procesamiento. De esta forma la cadena constante de las moléculas clase II actuaría como una barrera que puede ser liberada en un endosoma, con lo cual esta molécula se une a un antígeno exógeno, en tanto que la molécula clase I ya unido al antígeno pasa directamente a la superficie celular (Fig. 2) (Long, 1988).

Basófilo:

Célula perteneciente a la línea fagocitaria. Se encuentra en muy baja proporción en circulación (menos del 0.2 %), y está caracterizada por sus gránulos azul-violeta que contienen heparina y otras enzimas (Roitt *et al.*, 1985).

Células del sistema inmune:

Todas las células del sistema inmune derivan de células troncales pluripotenciales y a través de dos líneas de diferenciación se tiene una línea linfóide que producirá linfocitos y una línea mielóide que produce fagocitos además de plaquetas y células cebadas (Fig. 3). Existen dos diferentes tipos de linfocitos con diferente función -células T y células B-. Las células T se diferencian en el timo en tanto que las B en el hígado fetal, en bazo y en mamíferos adultos en la médula ósea (en aves en un órgano exclusivo de esta clase, la bolsa de Fabricio).

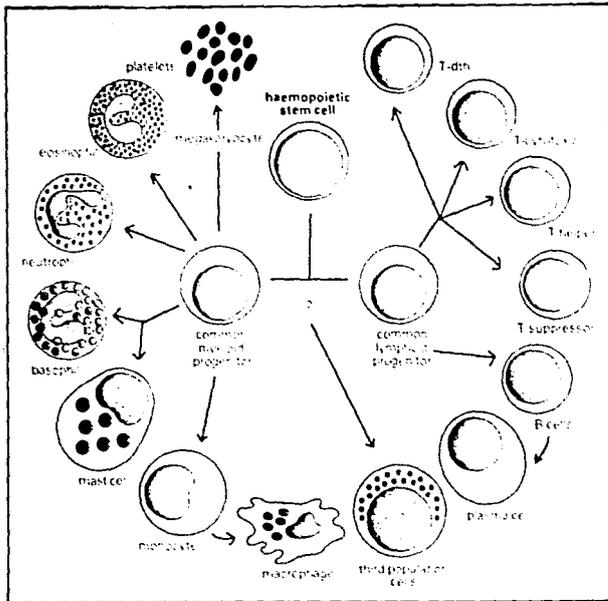


Figura 3. Origen de las células involucradas en el sistema inmune. Todas las células derivan de células troncales pluripotenciales. De estas se diferencian dos distintos progenitores, uno para células linfoides y otro para células mieloides. El primero tiene el potencial para diferenciarse en células T o B dependiendo del microambiente en el cual se instalan, estos son el timo ó hígado/médula ósea fetal. El origen de las células nulas ó tercera población es incierta. Las células mieloides se diferencian en las células mostradas en el esquema (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

Además existen las células nulas cuya secuencia de diferenciación no es conocida. Los tres tipos de células se distinguen funcionalmente pero las células T y B son morfológicamente idénticas y se pueden agrupar en linfocitos pequeños que no contienen gránulos y poseen un gran núcleo que ocupa casi todo el citoplasma y los linfocitos grandes que contienen gránulos intracitoplasmáticos azurófilos y un núcleo menos grande. En los fagocitos también hay dos tipos básicos: monocitos y granulocitos polimorfonucleares. Los últimos son más usualmente llamados polimorfos y pueden ser neutrófilos, basófilos o eosinófilos dependiendo del estado histológico de sus gránulos. Estas células forman parte del sistema fagocítico mononuclear (Roitt *et al.*, 1985).

Célula Presentadora de Antígeno (CPA):

Célula capaz de adherir un antígeno y expresarlo en su superficie para su reconocimiento. Los tres requerimientos básicos para que una célula funcione óptimamente como CPA son a) expresar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad en su superficie, b) procesar antígenos y c) sintetizar y secretar interleucina 1. La célula presentadora de antígeno clásica es el macrófago, sin embargo actualmente existen evidencias que apoyan la realización de tal función en células B (Grey *et al.*, 1982; Kurt-Jones *et al.*, 1988; Chesnut *et al.*, 1982) células dendríticas en presencia de macrófagos, (Guidos *et al.*, 1987) células T (Grammer *et al.*, 1988; Hanke, 1987), astrocitos del sistema nervioso central, células gliales de la retina (Roberge *et al.*, 1988) y fibroblastos (Geppert and Lipsky, 1987). Sin embargo el que estas células funcionen como CPA está restringido a la producción de IL-1 en el medio de acción por otros tipos celulares.

Complejo Mayor de Histocompatibilidad:

Conjunto de genes que controlan la participación del sistema inmune contra antígenos extraños. Está presente en varios grupos de vertebrados, y se presume su existencia en invertebrados, lo cual reflejaría su origen temprano en la evolución de los animales. Su nombre proviene de su participación en el rechazo de trasplantes de tejidos. Sus genes están divididos en tres clases: los genes clase I codifican antígenos de superficie celular

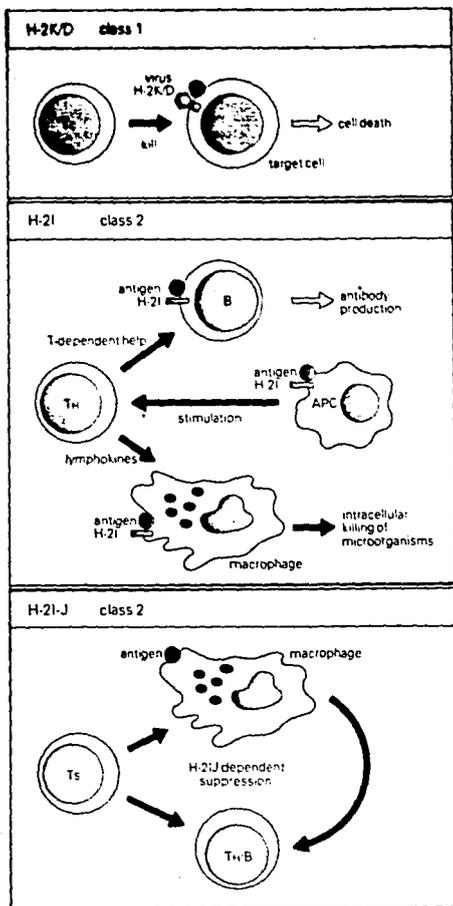


Figura 4. Esquema de las funciones biológicas del MHC en el ratón H-2K/D. Células T citotóxicas (Tc) reconocen antígenos extraños cuando están asociados con productos H-2K o H-2D y matan las células blanco.

H-2I. Células T cooperadoras (Th por su nombre en inglés) reconocen antígenos extraños en asociación con productos del gene H-2I en células presentadoras de antígenos (CPA). Las células Th pueden cooperar con células B para inducir la producción de anticuerpos y pueden también liberar linfoquinas las cuales ayudan a los macrófagos en la destrucción de microorganismos intracelulares.

H-2I/J. Células T supresoras (Ts) suprimen específicamente la acción de macrófagos, células b y células T cooperadoras las cuales son inducidas por antígenos extraños particulares. La acción de las células Ts esta aparentemente relacionada con las regiones I-J y la interacción entre Ts y sus blancos es más eficiente cuando tienen el mismo haplotipo (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

relacionados con trasplantes de tejidos y antígenos serológicos; los genes clase II codifican antígenos de superficie que controlan el nivel de respuesta hacia antígenos extraños, y los genes clase III controlan la expresión de algunos componentes del sistema del complemento y enzimas. Estas moléculas restringen la respuesta de las células T, y son esenciales porque sin ellas las CPA son incapaces de presentar el antígeno y restrictivos porque la forma alélica de las moléculas clase I o II determina la forma de la respuesta a consecuencia, citotóxica o cooperadora. Es un sistema con alta complejidad (varias moléculas de cada clase) diversidad (diferencias marcadas entre diferentes individuos de una misma especie visto por secuenciación y mapeo de péptidos) y polimorfismo (gran número de alelos para cada gene). Su función más conocida es la regulación de las interacciones célula-célula. En el ratón el complejo H-2 se localiza en el cromosoma 17, donde ocupa de 0.3 a 1.5 centimorgans de longitud dependiendo de que loci se consideren dentro del H-2, actualmente se consideran los extremos de la región K (centromérico) y 1.5 cM del Tla (telomérico). Se han identificado las regiones K, I, S, D, Qa y Tla. En la región I se mencionan dos subregiones: A y E. (Klein, 1979; Klein 1980; Steinmetz, 1984; Sciutto, 1987) (Figs. 4 y 5).

Eosinófilo:

Células que comprenden del 2 al 5 % de los leucocitos sanguíneos. Como los neutrófilos, son capaces de fagocitar y matar microorganismos ingeridos, aunque este no es su papel principal. Los gránulos de estas células permanecen unidos a la membrana celular. En sangre humana tienen usualmente un sólo núcleo bilobulado y varias vesículas citoplasmáticas. Poseen ribosomas, mitocondrias y microtúbulos. Pueden ser desgranulados ante un estímulo apropiado. Esta desgranulación involucra la fusión de los gránulos con la membrana plásmática y el envío al exterior de su contenido (mecanismo usado con blancos demasiado grandes que no pueden ser fagocitados, por ejemplo helmintos). Son atraídos por productos liberados de células T, basófilos y células cebadas (Roitt, 1985).

Granulocito polimorfonuclear:

Los granulocitos son producidos en médula ósea en un nivel de

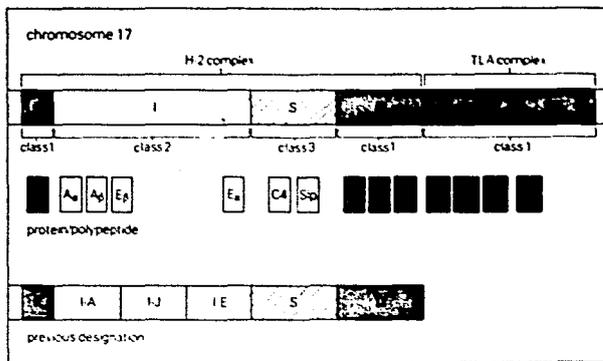


Figura 5. El Complejo Mayor de Histocompatibilidad en el ratón. Mapa genético del cromosoma 17 en el ratón mostrando los complejos H-2 y TLA. Los complejos están subdivididos en regiones, las cuales producen los polipeptidos indicados. Las regiones en oscuro producen proteínas de clase I, en claro proteínas clase II y en rayado proteínas clase III. Con los primeros estudios funcionales y serológicos subdividieron la región I. La región I-A aparentemente corresponde a las secciones Ab, Aa y Eb. La región I-J parece que no codifica para polipéptidos serológicamente detectados. La región I-E contiene el gene Ea (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

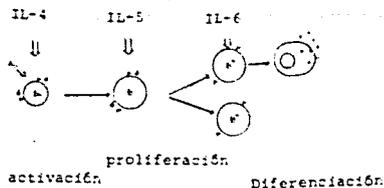


Figura 6. Participación de interlucinas en un evento específico de la respuesta inmune. Representación esquemática de las diferentes fases a través de las cuales las células B se diferencian en células plasmáticas en respuesta a una variedad de interlucinas. (Hishimoto and Hirano, 1988).

8 millones por minuto y tienen corto tiempo de vida (2-3 días) en relación a los monocitos-macrófagos (meses-años). Están presentes en cerca del 60-70 % en los leucocitos sanguíneos. En su forma natural contienen un núcleo multilobulado y algunos gránulos. Se clasifican en neutrófilos, basófilos y eosinófilos en base al estado de reacción de sus gránulos frente a distintas tinciones histológicas. Aunque estas células no muestran alguna especificidad por antígenos, juegan un papel importante en la inflamación aguda y, junto con los anticuerpos y el sistema del complemento, en protección contra microorganismos fagocitando y destruyéndolos. En algunos casos parece estar involucrado en las diferencias de susceptibilidad a infecciones ya que individuos con bajos números de polimorfos en circulación resultan mas susceptibles (Klein *et al.*, 1985; Roitt, 1985).

Haplotipo:

Conjunto de alelos para todos y cada uno de los genes del sistema del complejo mayor de histocompatibilidad. Una cepa de haplotipo b tiene todos sus alelos designados con la misma letra (Sciutto, 1987).

Interleucinas:

Factores soluble derivados de diversas células (macrófagos, células B y T, etc) que actúan de diferente manera y en diferente tiempo en los procesos de la inmunidad celular y humoral. No en todos los casos sus funciones son conocidas de forma específica de ahí la confusión al nombrarlas. Las mejores conocidas respecto de sus funciones son:

IL-1: factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos inmuno competentes.

IL-4: factor para la activación de células B en reposo.

IL-5: factor para el crecimiento de células B activadas.

IL-6: factor para la diferenciación final de células B activadas en células secretoras de anticuerpos.

IL-7: factor de crecimiento para células tempranas de la línea B y de la línea T (Hishimoto y Hirano, 1988) (Fig. 6).

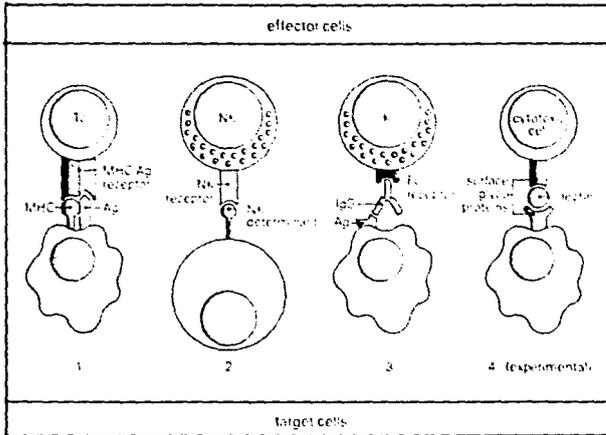


Figura 8. Citotoxicidad mediada por células. La respuesta citotóxica puede estar mediada por cuatro diferentes tipos celulares:

1. Células T citotóxicas se unen a su blanco mientras reconozcan al antígeno y a determinantes del MHC.
2. Células NK reconocen determinantes expresados en células neoplásicas.
3. Células K reconocen el Fc de anticuerpos IgG unidos al antígeno en la superficie de la célula blanco.
4. Experimentalmente, glucoproteínas en la superficie de un efector y blanco pueden ser unidos a través de una lectina (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

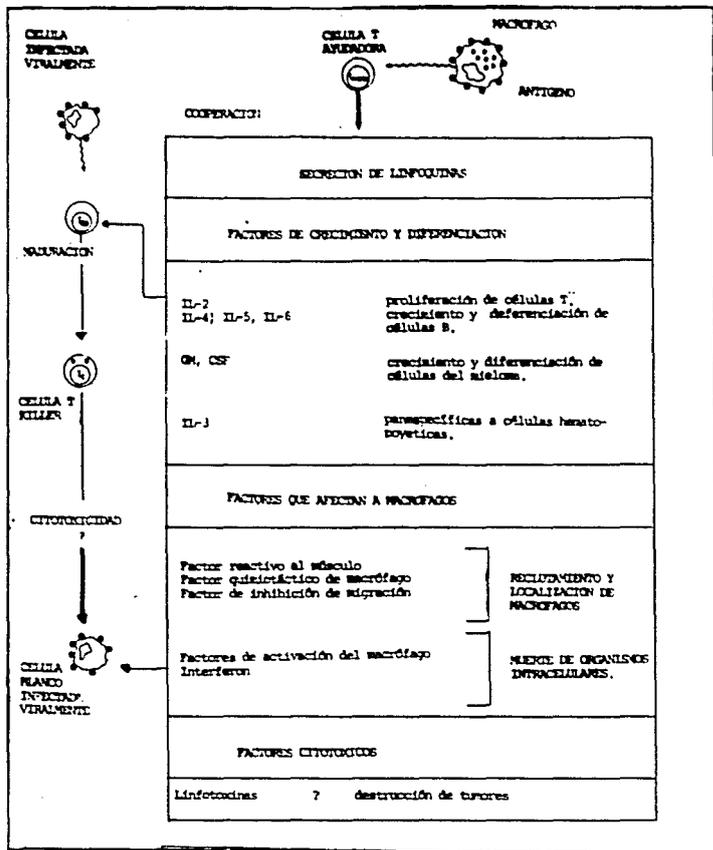


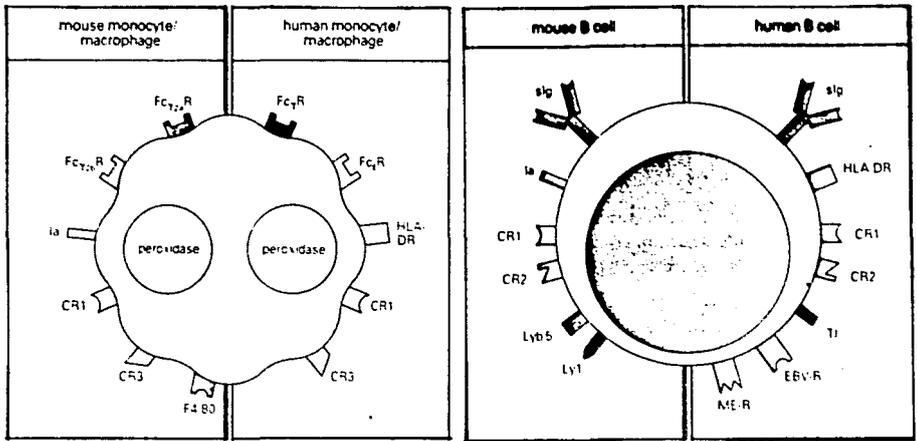
Figura 7. Respuesta inmune mediada por células. Esta respuesta opera a través de la generación de células T citotóxicas y la liberación de interleucinas por medio de la estimulación de dos subpoblaciones de células T, el precursor de células citotóxicas (T_{cp}) y células T cooperadoras/inductoras de hipersensibilidad retardada (T_{h/dth}). Diferentes linfocinas pueden ser producidas por subgrupos de linfocitos, y hasta la fecha no es posible decir que las células mediadoras de la hipersensibilidad retardada representen una subpoblación distinta de las cooperadoras. La intensa proliferación inducida por la estimulación antigénica no se indica en el esquema pero es esencial para la amplificación de la respuesta (Roitt, 1988).

Linfocito:

Dentro de la línea linfoide existen dos tipos de células diferenciadas funcionalmente, los linfocitos T y los linfocitos B. Los linfocitos B se definen clásicamente por producir y secretar inmunoglobulinas (anticuerpos), en tanto que los diversos tipos de linfocitos T actúan combatiendo infecciones intracelulares dando lugar a una respuesta inmune mediada por células. Todos los linfocitos provienen de médula ósea donde se producen por divisiones de las células troncales. De la médula ósea migran al timo y al equivalente de la bolsa de Fabricio, donde maduran y adquieren nuevas características y funciones que las convierten en linfocitos T y/o B. Aparecen en sus membranas una serie de receptores y marcadores que los diferencian (Fig. 11). Una vez maduros migran a los órganos periféricos donde se alojan, pueden también quedar en sangre o la linfa. La última etapa de maduración se cumple a partir del contacto con un antígeno y/o por alguna otra señal estimuladora que lleva a transformar al linfocito B en una célula plasmática productora de inmunoglobulinas con actividad de anticuerpo específico, en tanto el Linfocito T puede evolucionar hacia células que cumplen funciones a) efectora, produciendo factores que intervienen en la inmunidad mediada por células (Fig. 7) y la capacidad de ejercer citotoxicidad directa (Fig. 8) ó b) reguladoras aumentando en diferentes grados las respuestas de linfocitos T y B ó c) supresoras de diversas funciones (Fig. 9) (Roitt *et al.*, 1985; Roitt, 1989).

Macrófagos:

Célula mononuclear derivada de médula ósea que después de su diferenciación a monocitos sanguíneos finalmente se establecen en los tejidos como macrófagos maduros, donde constituyen el sistema fagocítico mononuclear (Fig. 10). Constituyen las CPA por excelencia y son primordiales en los primeros fenómenos inmunológicos por su acción fagocitaria. Estas células tienen una alta capacidad de captar antígenos y modificarlos para que las células T puedan reconocerlos. Es el elemento inespecífico inductor de la respuesta inmune. Presenta una alta capacidad enzimática como lisozima, colagenasa, lipasa, interleucina 1, inhibidores enzimáticos, metabolitos reactivos de oxígeno,



	Fc _γ 2R	Fc _γ R	C3aR	C5aR	CR1	CR2	PEROXIDASA	FOSFATASA ÁCIDA	FOSFATASA ALCÁLINA
NEUTROFILO	-	+	+	+	+	+	+		
EOSINOFILO	+	+	+?	+	+	+	+	+	
BASOFILO	+	+	+	+	+	+	+		
MASTOCITO	+	+	+	+	+	+		+	+

c

	CELULAS T DE RATON Thy 1	CELULAS T HUMANAS (T1), T3, T11
Todas las células T		
TH, T-dth	Ly1, Qa1, LJ7c	T4/Leu 3a, T1
Ts, Tc	Ly2, Ly3	T8/Leu 2a
todas las células T activadas.	Ia	HLA-DR, TAC

d

Figura 11. Marcadores de superficie en los principales tipos celulares del sistema inmune en ratón y en humano. Las equivalencias se muestran en el mismo color. La figura 12c muestra los marcadores en granulocitos maduros humanos (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

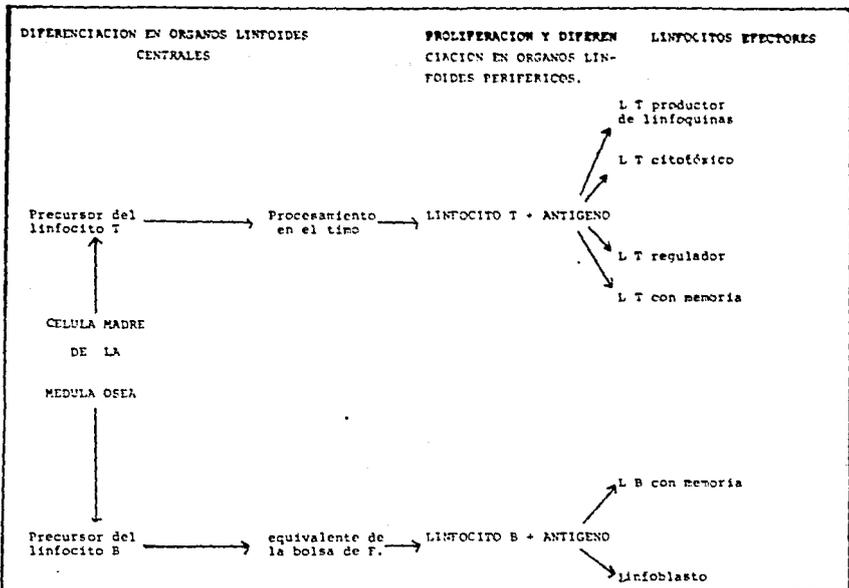


Figura 9. Maduración y diferenciación de las células responsables de la respuesta inmune. Todas derivan de un tronco común y dependiendo del órgano en que se alojen se diferencian a células T o B. Estímulos posteriores dan como resultado una última etapa de maduración en la cual las células plasmáticas sintetizan y liberan anticuerpos y los linfocitos T se diferencian en subpoblaciones con funciones específicas que interactúan durante la respuesta inmune.

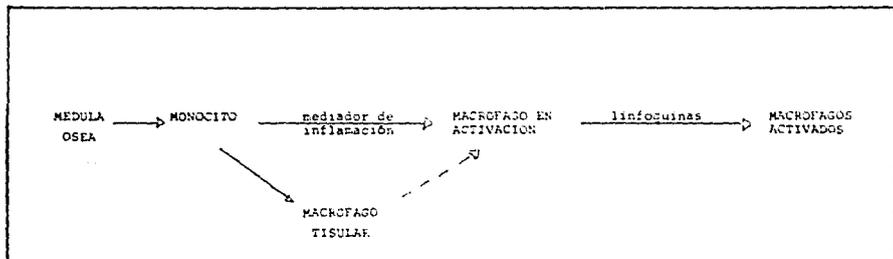


Figura 10. Un modelo general del desarrollo del macrófago. Los monocitos surgen en la médula ósea y migran a los tejidos donde están bajo regulación. Durante la inflamación los monocitos y macrófagos jóvenes pueblan el sitio inflamado. Células T y las linfoquinas modifican el estado de activación del macrófago (Adams and Hamilton 1984).

factores del complemento, etc. (Adams y Hamilton, 1984).

Marcador:

Elementos de superficie celular que tipifican a líneas de células y pueden ser sus receptores (Fig. 11) (Roitt *et al*, 1985).

Neutrófilo:

Célula fagocitaria que representa el 90 % de los granulocitos circulantes, tienen un diametro de 10-20 . Poseen dos tipos de gránulos, los azurófilos (lisosomas) que contienen hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa y muraminidasa y el segundo tipo contienen lactoferrina más lisozima. Los organismos ingeridos están contenidos en fagosomas que al fundirse con gránulos lisosomales forman el fagolisosoma en donde se lleva a cabo la degradación del organismo (Roitt *et al*, 1985).

Presentación de antígenos:

Concepto originado al ponerse de manifiesto la importancia del monocito en la estimulación de la respuesta inmune en especial con linfocitos T. La presentación del antígeno compromete los eventos celulares y bioquímicos necesarios para el reconocimiento y estimulación de los linfocitos CD4 (ayudadora) y CD8 (citotóxica) subpoblaciones de las células T responsables de los eventos celulares que resultan en la eliminación de antígenos extraños (parásitos, bacterias y virus). La presentación de antígenos tiene lugar entre CPA y las células efectoras sean CD4 o CD8 dependiendo del tipo de molécula del complejo mayor de histocompatibilidad al que se unan, clase II o clase I respectivamente (Fig. 12) (Roitt *et al*, 1985).

Receptores:

Moléculas existentes en superficie celulares capaces de fijar específicamente a ciertas proteínas dando como resultado de esta unión el envío de señales de distinto tipo que permiten identificar al receptor. Pueden usarse como marcadores cuando están distribuidos solo en determinada líneas o tipos celulares de interés.

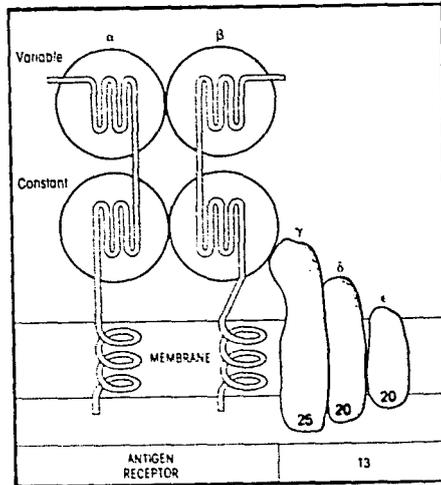


Figura 13. Receptor de la célula T. El antígeno más el H-2 es reconocido por el heterodimero transmembranal compuesto por una cadena α y una β cada una de las cuales tiene un dominio variable y uno constante. El receptor está íntimamente asociado con las cadenas γ , δ y ϵ que forman el complejo T3, cada cadena tiene el peso molecular indicado en kD (el arreglo de las cadenas aun no se conocen) (Roitt, 1988).

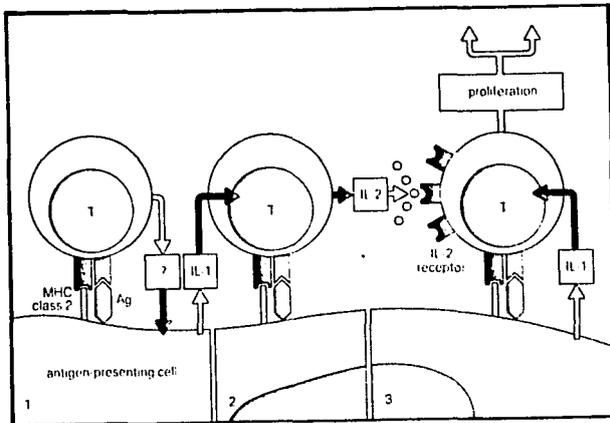


Figura 12. Activación de células T por células presentadoras de antígeno. La activación puede ocurrir en tres fases. Luego de la unión de la célula T con la CPA un factor no conocido (?) de la propia célula T induce a la CPA a producir IL-1 (1). La IL-1 induce la aparición de receptores para IL-2 en la células T y estimula a las células T a liberar IL-2 (2). La IL-2 favorece la activación celular y la proliferación (3) (Roitt, Brostoff and Male, 1985).

Receptor de células T:

El receptor del sistema antígeno-molécula del H-2 en la célula T es un heterodímero formado por dos glicoproteínas de superficie celular (α y β), tienen similitud secuencial y estructural con las inmunoglobulinas pero a diferencia de éstas sólo reconocen al antígeno en el contexto de los antígenos del H-2, formándose así un complejo trimolecular (Antígeno-H-2-RLT). No se conocen todas las características de esta unión y se menciona como posible la existencia de otras moléculas que podrían ayudar a mantener esta asociación (Fig. 13) (Roitt, 1988).

Restricción por el H-2:

La restricción por H-2, vista al estudiar la cooperación celular generada en la respuesta inmune, puede darse en la formación de anticuerpos: células con el mismo H-2 con diferente fondo genético cooperan en la formación de anticuerpos, pero si tienen H-2 diferente aún con fondo genético igual no se da la producción de inmunoglobulinas. Esto se explica por la presencia en el antígeno del H-2 de un receptor que reconoce lo propio y lo extraño. También existe restricción en la generación de la respuesta inmune mediada por células: la lisis de un antígeno específico en la célula blanco se da solamente cuando dicha célula y la célula efectora tienen el mismo H-2, de esta forma existe restricción en las células citotóxicas. La restricción para la formación de anticuerpos se localiza en los genes de la región I que codifican para moléculas clase II y para el sistema celular citotóxico en las regiones K y D donde están los genes que codifican para moléculas clase I.

VII. APENDICE 2.

Soluciones y reactivos utilizados.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS 10x)

Fosfato de sodio dibásico	10.22 g
Fosfato de sodio monobásico	3.86 g
Cloruro de sodio	74.00 g

Ajustar a pH=7.2 y aforar a 1 litro. A partir de esta solución se hacen diluciones para obtener PBS 1x

SOLUCION SALINA ISOTONICA CON AZIDA (SSI-A)

Cloruro de sodio al 0.85 %	85.00 g
Azida de sodio 0.1 M	6.50 g

Aforar a 1 litro.

PBS-ALBUMINA AL 1% (PBS-BSA 1%)

PBS 1x	1.00 l
Albumina	10.00 g

Aforar con PBS 1x a 1 l y guardar en congelación.

SOLUCION CITRATO-FOSFATO pH 8

Fosfato de sodio tribásico 0.1 M

Acido citrico 0.1 M

Ajustar a pH 8 antes de aforar al volumen deseado.

SOLUCION CITRATO-FOSFATO pH 5

Fosfato de sodio dibásico 0.2 M 25.70 ml

Acido citrico 0.1 M 24.30 ml

Agua destilada 50.00 ml

ESTREPTOVIDINA PEROXIDASA

Para 10 ml de la dilución 1:2000

estrepto-avidina peroxidasa 5.00 µl

PBS-BSA 1% 10.00 ml

SUSTRATO PARA REACCION DE ELISA

Citrato-Fosfato pH 5 5.00 ml

Agua destilada 5.00 ml

O-Fenilendiamina 4.00 mg

Peróxido de Oxígeno 50.00 µl

SOLUCION DE BICARBONATO DE SODIO 0.1 M

Bicarbonato de sodio 8.40 g

Agua destilada para aforar a 1.00 l

Antes de aforar ajustar a pH 8

PREPARACION DE COLORANTES: HEMATOXILINA DE HARRIS.

Hematoxilina	1.00 g
Oxido rojo de mercurio	0.50 g
Sulfato de aluminio y amonio o potasio (alumbre)	20.00 g
Alcohol etílico absoluto	10.00 ml
Agua destilada	200.00 ml

Disolver la hematoxilina en alcohol absoluto, calentando a baño maria y tapando; en otro recipiente disolver el alumbre en 100 ml de agua destilada; se mezclan las dos soluciones y se añade el agua restante. Se hierve la mezcla lo más rapido posible, y se agrega el oxido rojo de mercurio hasta que tome un color rojo purpura; enseguida se enfria con hielo a baño maria y se filtra 10 veces. Se le agregan de 3 a 5 gotas de ácido acético por cada 10 ml de solución.

EOSINA ALCOHOLICA

Eosina azulosa	1.00 g
Orange G	1.00 g
Alcohol de 70	100.00 ml

Se mezcla todo en frio y se filtra.

SOLUCIONES PARA PURIFICACION DE ANTICUERPOS EN COLUMNA MAPS II

Todos los reactivos utilizados son del sistema de purificación de anticuerpos Affil-Gel Protein A MAPS II de BIO-RAD.

AMORTIGUADOR DE PEGADO (SOLUCION BB)

Disolver 31.4 g del reactivo en 100 ml de agua desionizada. Agitar 10 minutos y filtrar en un filtro de naylon de 0.22 m , ajustar a pH9 con NaOH 10 N o HCl 8 N. Almacenar a 4 C.

AMORTIGUADOR DE ELUCION (SOLUCION EB)

Disolver 2.2 g del reactivo en 100 ml de agua desionizada. Agitar 10 min y filtrar con filtro de 0.22 y ajustar a pH 3 con las mismas soluciones anteriores y almacenar bajo las mismas características. Para ambas soluciones se puede agregar Azida de sodio al 0.05 %.

AMORTIGUADOR DE RECUPERACION

Se aplica sin tratamiento previo y sin pipetearlo (contiene

metanol).

TRIS-HCl 1 M pH 9

Trizma-base
Agua destilada

6.05 g
50.00 ml

VIII. REFERENCIAS

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

1. Adams, D. and Hamilton, T. (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annual Review of Immunology* 2: 283-318
2. Ananue, E. (1984). Antigen-Presenting function of the macrophage. *Annual Review of Immunology* 2: 395-428.
3. Ananue, E. and Cerottini, J-C. (1989). Antigen presentation. *The FASEB Journal* 3: 2496-2502.
4. Blackwell, J., Freeman, J. and Bradley, D. (1980). Influence of H-2 complex on acquired resistance to *Leishmania donovani* infection in mice. *Nature* 283(3): 72-74.
5. Chesnut, R., Colon, S. and Grey, H. (1982). Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumors and macrophages. *The Journal of Immunology* 129 (6): 2382-2388.
6. Else, K. and Wakelin, D. (1988). The effects of H-2 and non-H-2 genes on the expulsion of the nematode *Trichuris muris* from inbred congenic mice. *Parasitology* 90: 543-550.
7. Else, K. and Wakelin, D. (1989). Genetic variation in the humoral immune responses of mice to the nematode *Trichuris muris*. *Parasite Immunology* 11: 77-90.
8. Fragoso, G., Sciutto, E., Estrada, I. y Larralde, C. (in Press). Susceptibilidad genética a infecciones parasitarias murinas. *Revista Latinoamericana de Microbiología*.
9. Fragoso, G., Valdez, F., Rosenstein, Y., Diaz, M.L., Montoya, R., Govezensky, T. and Sciutto, E. (Submitted). An immunoenzymatic assay to measured the expression of murine histocompatibility antigens in macrophages and lymphocytes. *Journal of Immunology Methods*.
10. Freeman, R.S. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 909-990.

11. Goppert, T. and Lipsky, P. (1987). Dissection of defective antigen presentation by interferon-g-treated fibroblasts. *The Journal of Immunology* 139(2):385-392.
12. Grammer, S., Ishioka, G. and Chesnut, W. (1988). Studies on the capacity of B cells as well as T cells to serve as accessory cells for the activation of herpes simplex virus-specific cytolytic T cells. *The Journal of Immunology* 140(8):2018-2022.
13. Grey, H., Colon, S. and Chesnut, W. (1982). Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting B cells. II. Biochemical comparison of the fate of antigen in B cell tumors and macrophages. *The Journal of Immunology* 129(6):2389-2395.
14. Guidos, C., Sinha, A. and Lee, K. (1987). Functional differences and complementation between dendritic cell and macrophages in T-cell activation. *Immunology* 91:269-278.
15. Huerta, L., Terrazas, L.I., Sciutto, E., Lomeli, C., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T. and Larraide, C. (submitted). *Taenia crassiceps*: immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis. *Experimental Parasitology*.
16. Hanke, J., Cook, R., Lopez, L. and Rich, R. (1987). Differential antigen-presenting cell requirements of hapten-specific T cell lines restricted to class II determinants. *The Journal of Immunology* 139(8):2384-2391.
17. Janeway, C. (1989). The role of CD4 in T-cell Activation: accessory molecule or co-receptor?. *Immunology Today* 10(7):234-238.
18. Kennedy, M., Gordon, A., Tomlin, L., and Qureshi, F. (1986). Genetic (Major histocompatibility complex?) control of the antibody repertoire to the secreted antigens of *Nocaris*. *Parasite Immunology* 9:269-273.
19. Kennett, R. et al. (1980). *Monoclonal Antibodies*. Plenum Press, Plenum Pub. New York, 448 pp.

20. Kishimoto, T. and Hirano, T. (1988). Molecular regulation of B lymphocyte response. *Annual Review of Immunology* 6:485-512.
21. Klein, J. (1979). The major histocompatibility complex of the mouse. *Science* 203:516-521.
22. Klein, S. (1986). H-2 complex In: *Natural History of the Major Histocompatibility Complex*. John Wiley and Son, New York, USA, 50-70.
23. Kroeze, W. K. and Freeman, R. S. (1982). *Taenia crassiceps*: Fate of cysticerci following ingestion by the mouse. *Experimental Parasitology* 54:425-431.
24. Kurt-Jones, E., Liano, D., Hayglass, K., Benacerraf, B., Sy, M-S. and Abbas, A. (1988). The role of antigen-presenting B cells in T cell priming in vivo. *The Journal of Immunology* 140 (11):3773-3778.
25. Long, E. (1989). Intracellular traffic and antigen processing. *Immunology Today* 10(7):232-234.
26. Nauciel, C., Ronco, E., Guenet, J. and Pla, M. (1988). Role of H-2 and non-H-2 genes in control of bacterial clearance from the spleen in *Salmonella typhimurium*-infected mice. *Infection and Immunity* 58(9):2407-2411.
27. Roberge, F., Caspi, R. and Nussenblatt, R. (1988). Glial retinal muller cells produce IL-1 activity and have a dual affect on autoimmune T helper lymphocytes. *The Journal of Immunology* 140(7):2193-2196.
28. Roitt, I. (1988). *Essential Immunology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, England.
29. Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (1985). *Immunology*. The C.U. Mosby Company, London, England.

30. Sciutto, E. (1987). El complejo mayor de histocompatibilidad del raton y la respuesta inmune. *Revista de la Facultad de Medicina* 30(3):79-86.
31. Sciutto, E., Fragoso, G., Diaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C. and Larralde, C. (in Press). Murine *Taenia crassiceps* Cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research*.
32. Steinmetz, M. (1984). Structure, function and evolution of the major histocompatibility complex of the mouse. *Trends in Biochemical Sciences* 9(5):224-226.
33. Wakelin, D. (1980). Genetic control of immunity to parasites infection with *Trichinella spiralis* in inbred and congenic mice showing rapid and slow responses to infection. *Parasite Immunology* 2:85-98.
34. Wakelin, D. (1985). Genetic control of immunity to helminth infections. *Parasitology Today* 1(1):17-23.
35. Wakelin, D. and Donachie, A. (1983). Genetic control of immunity to *Trichinella spiralis*: influence of H-2-linked genes on immunity to the intestinal phase of infection. *Immunology* 48:343-350.
36. Wassom, D., Brooks, B., Cypess, R., and David, C. (1983). A survey of susceptibility to infection with *Trichinella spiralis* of inbred mouse strains sharing common H-2 alleles but different genetic backgrounds. *The Journal of Parasitology* 69(6): 1033-1037.
37. Wassom, D., Krco, J. and David, C. (1987). I-E expression and susceptibility to parasite infection. *Immunology Today* 8(2):39-43.