

03062

17
rej-

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UACPyP/CCH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

INTERACCIONES INMUNOENDOCRINAS EN LA CISTICERCOSIS
EXPERIMENTAL MURINA CAUSADA POR Taenia crassiceps

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIOL. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES

1992

TESIS IGUAL A LA ORIGINAL



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

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	1
INTRODUCCION GENERAL	3
EL MODELO EXPERIMENTAL	5
EFECTO DEL LOCUS H-2 EN LA SUSCEPTIBILIDAD	6
RESPUESTA INMUNE AL PARASITO	7
EFECTO DEL SEXO EN LA SUSCEPTIBILIDAD	8
INTERACCIONES INMUNOENDOCRINAS	10
EFECTO DE LAS HORMONAS NEUROENDOCRINAS SOBRE LINFOCITOS ...	11
EFECTO DE LINFOCINAS Y MONOCINAS SOBRE EL SISTEMA NEUROENDOCRINO	13
HORMONAS SEXUALES Y RESPUESTA INMUNE	15
OBJETIVOS E HIPOTESIS	20
ARTICULO:	21
IMMUNOENDOCRINE INTERACTIONS IN THE REGULATION OF PARASITE GROWTH IN EXPERIMENTAL MURINE CYSTICERCOSIS: A ROLE FOR 17 β -OESTRADIOL	
RESULTADOS ADICIONALES	42
DISCUSION GENERAL	62
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFIA GENERAL	74
APENDICE I:	87
ARTICULOS PUBLICADOS EN LOS QUE SE PARTICIPO COMO COAUTOR.	
APENDICE II :	123
LA FUNCION DUAL DEL TIMO.	

RESUMEN

El presente trabajo de investigación fue realizado con el propósito de conocer algunos de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina causada por el cisticerco de la *Taenia crassiceps*. Los factores estudiados fueron hormonales e inmunológicos.

En esta parasitosis experimental existen claras diferencias de susceptibilidad entre sexos. Las hembras presentan una carga parasitaria significativamente mayor que los machos. Por otro lado, la respuesta inmune de tipo humoral no parece estar involucrada en la protección contra este parásito.

Aquí estudiamos el efecto de la gonadectomía, de la timectomía neonatal y de la reconstitución hormonal sobre la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) y sobre la susceptibilidad al parásito. Además, estudiamos la evolución de la respuesta inmune celular tanto *in vivo* (DTH) como *in vitro* (respuesta a concanavalina A) y su relación con el crecimiento parasitario. Por último, estudiamos un posible mecanismo de inhibición de la respuesta inmune durante la infección crónica con el cisticerco de *T. crassiceps*.

Los experimentos de timectomías, gonadectomías y reconstitución hormonal, indican que el crecimiento del cisticerco es regulado por eventos inmunológicos dependientes del timo, en los cuales el 17 β -estradiol influye negativamente.

Por otro lado, la respuesta inmune celular es inhibida durante el desarrollo de la infección; se discute la posible

participación de las células T_H1 y T_H2 en la inmunomodulación de la parasitosis. Por último, un posible mecanismo de inhibición de la respuesta inmune, que es sensible a la indometacina, es sugerido.

Lo anterior implica que factores del propio hospedero pueden facilitar la parasitosis por *T. crassiceps*.

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

La cisticercosis humana y porcina es una enfermedad causada por el metacéstodo de *Taenia solium*. La gravedad de esta parasitosis depende principalmente del lugar anatómico en que se aloje el parásito. Este céstodo utiliza al cerdo como hospedero intermediario, mientras que el hombre es hospedero intermediario y/o definitivo; y es el único que puede alojar al parásito adulto. Por lo tanto, el hombre es el principal responsable de la diseminación de los huevecillos en el medio ambiente (Aluja y cols. 1982; Larralde, y cols. 1989b).

Esta parasitosis es frecuente en México y otros países en desarrollo. En nuestro país la cisticercosis es considerada como un problema importante de salud pública. Los datos de la última encuesta serológica nacional indican que la seropositividad en población abierta es del orden de 1.2 % en promedio (Larralde, y cols. 1992).

Las investigaciones sobre cisticercosis se han incrementado de manera importante en los últimos años, principalmente en la búsqueda de un inmunodiagnóstico específico, confiable y reproducible que pueda manejarse para un número alto de muestras biológicas, y que permita la detección temprana de pacientes con cisticercosis (Larralde y cols. 1986 y 1989a; Schantz y cols. 1988; Tsang y cols. 1989; Ramos-Kuri y cols. 1992).

Por otro lado, las investigaciones tendientes a conocer los factores biológicos que intervienen en la interacción

hospedero-parásito en la cisticercosis por *T. solium* no han dejado de realizarse, a pesar de la dificultad de trabajar directamente con los hospederos naturales. En consecuencia, los conocimientos producidos son un tanto insuficientes para sostener las propuestas de los mecanismos que definen la sobrevivencia del parásito en el hospedero inmunocompetente (Flisser, 1989). Debido a lo anterior, ha sido necesario recurrir a modelos experimentales que permitan estudiar más detalladamente los factores que pudieran intervenir en los mecanismos de susceptibilidad o protección en cisticercosis.

Pero además de sus intereses aplicativos en la medicina, todas la cisticercosis tienen un gran interés biológico, en particular para la inmunología. Resulta que los cisticercos - o metacéstodos- son organismos grandes - de varios milímetros hasta decenas de centímetros, ocupantes de un volúmen que varía de unas décimas de mililitro hasta volúmenes mayores- compuestos de varios tejidos estructural y funcionalmente sofisticados (sistemas nervioso, muscular, protonefidial; aparato reproductor, órganos de fijación, especialización periférica (Barnes, 1982); y contienen numerosos y potentes antígenos (Tsang y cols. 1989; Larralde y cols. 1989a). Y, sin embargo, en contra de las leyes fundamentales de la inmunología, los cisticercos frecuentemente franquean la inmunidad de transplante (Roitt, 1988). Esclarecer la forma estratégica que el cisticerco emplea para permanecer por largos períodos en un hospedero inmunocompetente podría también contribuir al estudio y control de la inmunidad de transplante, y a entender mejor el exquisito funcionamiento del sistema inmune,

cuya función se resiste a ser cabalmente predicha por unas cuantas reglas (por ejemplo: ajeno vs. propio; primario vs. secundario; timo dependiente vs. timo independiente; con o sin adyuvante; celular vs. humoral, etc.).

EL MODELO EXPERIMENTAL.

Así es que adoptamos para su estudio más fino la cisticercosis experimental murina causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps*. Este modelo nos facilita enormemente el estudio de los factores biológicos que participan en el desarrollo del parásito. Además, *T. crassiceps* presenta una serie de semejanzas con *T. solium*; por ejemplo: a) tiene un ciclo biológico similar (de manera natural el ratón contrae la enfermedad al ingerir huevecillos presentes en el medio ambiente contaminado con heces de carnívoros pequeños (cánidos y felinos) que alojan al parásito adulto en el intestino, y el ciclo se completa cuando estos ratones son devorados por los carnívoros). b) las manifestaciones patológicas también son similares, debido a que el cisticerco de *T. crassiceps* puede alojarse crónicamente en los ratones sin causar daños importantes a las estructuras vecinas del hospedero (Haselgrove y cols. 1987) aunque, en los últimos estadios de la infección hay una ligera inflamación en la serosa intestinal, que es semejante a aquella causada por el cisticerco de *T. solium* en las meninges basales del hombre). c) la similitud estructural, morfológica y antigénica que comparte con otros céstodos, en especial con *T. solium*, que pueden relacionar los resultados encontrados en este modelo con aquellas

infecciones causadas por otros céstodos incluyendo la cisticercosis humana (Larralde, y cols. 1989a). Además, los cisticercos de *T.crassiceps* pueden servir como una fuente importante de antígenos útiles para el inmunodiagnóstico en cisticercosis (Larralde, y cols. 1990) e incluso para vacunación, debido a que en el modelo experimental se ha encontrado inmunoprotección cruzada entre *T.crassiceps* y *T.solium* (Sciutto, y cols. 1990).

La cisticercosis experimental murina por *T.crassiceps* ofrece las siguientes ventajas para la experimentación: la infección puede inducirse fácilmente por la inoculación directa de los metacéstodos en la cavidad peritoneal; un crecimiento rápido del parásito debido a su reproducción asexual por medio de gemaciones asegura pronto resultados; por su tamaño macroscópico, la carga parasitaria puede determinarse fácilmente con un conteo directo de los parásitos; y por último, el cisticerco de *T.crassiceps* puede mantenerse *in vitro* por varios días o semanas en medios de cultivo convencionales lo que permite múltiples diseños experimentales (Huerta y cols. 1992); estudios recientes sobre la cisticercosis experimental, han demostrado que el desarrollo de esta infección se encuentra bajo el control genético (H-2), gonadal e inmunológico (Sciutto y cols. 1991; Huerta y cols. 1992; Bojalil y cols. 1992).

EFFECTO DEL LOCUS H-2 EN LA SUSCEPTIBILIDAD.

La existencia de diferencias de susceptibilidad asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad han sido descritas

recientemente (Sciutto y cols. 1991). En estos trabajos se demostró que la cepa BALB/c (H-2d) fue más susceptible a la infección experimental con el cisticerco de *T. crassiceps* que las cepas BALB/b (H-2b) y BALB/k (H-2k) y otras (Sciutto y cols. 1991). Es importante mencionar que estas tres cepas de ratones tienen un fondo genético común (BALB) y sólo varían en el locus H-2, de tal modo que las diferencias de susceptibilidad entre las cepas se deben exclusivamente a esta variación genética. En todas ellas la carga parasitaria siempre fué mayor en las hembras que en los machos.

RESPUESTA INMUNE AL PARASITO.

También se han llevado a cabo estudios sobre la respuesta inmune en contra del metacéstodo de *T. crassiceps*. Estos indican que la participación de la respuesta inmune en el control de esta parasitosis es irrefutable, debido a que la vacunación con antígenos específicos induce protección (Sciutto y cols. 1990); sin embargo, los mecanismos involucrados en dicha protección son aún desconocidos.

Los primeros en demostrar que el hospedero es capaz de montar una respuesta inmune humoral específica en contra de los antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* fueron Freeman en 1964 y Chernin en 1977. Posteriormente, Good y Miller en 1978 observaron *in vitro* el efecto dañino del complemento sobre el tegumento del parásito sin afectar la viabilidad del mismo.

Trabajos más recientes han demostrado que la respuesta de tipo humoral es insuficiente para la inmunoprotección en esta

parasitosis (Sciutto y cols. 1990). Por el contrario, se ha observado que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-cisticercos puede incluso facilitar el crecimiento del parásito en el animal receptor (Sciutto, 1989).

Nosotros iniciamos las investigaciones sobre la respuesta inmune celular en este modelo experimental, abordándolo de dos maneras: la primera fue estimulando la respuesta inmune celular con ciclofosfamida (CY). En estos trabajos encontramos un aumento significativo en la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH) correlacionado con una carga parasitaria menor en ambos sexos (Bojalil y cols. 1992; Apéndice I). La segunda forma de abordar la investigación fue llevando a cabo timentomías neonatales (TxN) en ambos sexos. Aquí la respuesta de DTH disminuyó significativamente, mientras que la susceptibilidad al parásito se incrementó en ambos sexos, pero de manera mucho más notable en los machos. En esta serie de experimentos, realizamos también transferencia pasiva de células esplénicas inmunes enriquecidas en linfocitos T a animales TxN. Los resultados obtenidos confirmaron que la respuesta inmune dependiente de células T es importante en ésta parasitosis, puesto que aquellos animales neonatalmente timentomizados que recibieron las células T inmunes, tuvieron una carga parasitaria significativamente menor que los animales no transferidos (Bojalil y cols. 1992; Apéndice I).

EFECTO DEL SEXO EN LA SUSCEPTIBILIDAD.

Estudios previos sobre la cisticercosis experimental murina causada por *T. crassiceps* han determinado que las hembras son

significativamente más susceptibles a esta parasitosis que los machos, ya sea que la infección haya sido adquirida por la ingestión de huevecillos o por la inoculación intraperitoneal directa del cisticerco (Freeman, 1964; Larralde, y cols. 1989b). Sobre estas diferencias sexuales hemos demostrado que la gonadectomía iguala la carga parasitaria en ambos sexos: en machos gonadectomizados la susceptibilidad aumenta y en las hembras disminuye la carga parasitaria (Terrazas 1989; Huerta y cols. 1992; Apéndice I). El posible mecanismo de acción de las hormonas sexuales en esta parasitosis parece estar mediado a través del sistema inmune, pues *in vitro* no se detectó efecto alguno de testosterona, 17 β -estradiol y progesterona sobre la capacidad de gemación y crecimiento del cisticerco (Huerta y cols. 1992; Apéndice I).

Por otro lado, las diferencias entre sexos desaparecieron también cuando los animales fueron neonatalmente timectomizados; lo anterior nos sugirió la posible existencia de una interacción entre gónadas-timo-respuesta inmune y susceptibilidad al parásito (Bojalil y cols. 1992).

Este último punto nos ha llevado a investigar las posibles interrelaciones entre el sistema inmune y el neuroendócrino que participan en la regulación del crecimiento parasitario; de modo que es necesario presentar una pequeña parte de lo que se conoce actualmente en éste tema, antes de abordar los resultados de ésta tesis.

INTERACCIONES NEUROINMUNOENDOCRINAS

El sistema nervioso central y el inmune han sido considerados históricamente como entidades biológicas independientes; sin embargo, muchas publicaciones en años recientes han generado una gran cantidad de información que nos indica la existencia de una interrelación entre el sistema inmune y el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenales, así como con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. De tal modo que actualmente es reconocido que los sistemas neuroendócrino e inmune están íntimamente ligados y que existe una comunicación bidireccional entre ambos (Weigent y Blalock 1987; Buzzetti y cols. 1989).

Las primeras interacciones entre los dos sistemas fueron identificadas para los glucocorticoides (Fauci 1979) cuya principal acción es inhibir la respuesta inmune, y para el timo (órgano clave en el desarrollo del sistema inmune), en la regulación de los niveles de hormonas sexuales y de la reproducción (Rebar y cols. 1981; Grossman 1985).

Las bases moleculares para la comunicación entre estos sistemas implica la utilización de señales y receptores comunes. Es decir, el sistema inmune y sus productos pueden modular funciones neuroendócrinas y las hormonas de origen neuroendócrino así como sus receptores son ahora incluidos como componentes del sistema inmune.

En este apartado se revisan brevemente las interacciones entre sistema inmune y neuroendócrino en el siguiente orden 1) efecto de las hormonas neuroendócrinas sobre la función de linfocitos, y 2) el efecto de las linfocinas y monocinas sobre el

sistema neuroendócrino.

Efecto de hormonas neuroendócrinas sobre linfocitos.

HORMONA ADRENOCORTICOTROPICA (ACTH).- Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado que la ACTH suprime la respuesta de anticuerpos a antígenos dependientes (eritrocitos de carnero) e independientes (dinitrofenol, DNP) de células T (Johnson y cols. 1982; Blalock, 1989). Las funciones de linfocitos T y macrófagos también son moduladas por ACTH; por ejemplo, ACTH inhibe la producción de interferón gamma (IFN γ) por linfocitos T (Johnson y cols. 1984), y bloquea la capacidad tumoricida de los macrófagos (Koff y Dunegan 1985).

ENDORFINAS y ENCEFALINAS.- Los péptidos opioides endógenos también tienen influencia sobre la respuesta inmune. La α -endorfina, met-encefalina y leu-encefalina son potentes supresores de la producción de anticuerpos; tal supresión puede bloquearse por el antagonista opiáceo naloxona. Por otro lado, la respuesta celular parece ser aumentada por las endorfinas, ya que β -endorfina incrementa la respuesta proliferativa de células T a concanavalina-A y fitohemaglutinina, aumenta la generación de linfocitos T citotóxicos (Carr y Klimpel 1986), de células asesinas naturales y la producción de IFN- γ (Mandler y cols. 1986).

HORMONA DE CRECIMIENTO (GH).- La hormona de crecimiento es de origen hipofisiario, inicialmente se reconoció su efecto sobre el sistema inmune en una cepa de ratones "enanos", los cuales tienen una baja concentración de GH y respuestas inmunológicas

deprimidas (Blalock, 1989). Su efecto más sobresaliente es a nivel del timo, de modo que las respuestas dependientes de células T son las más deficientes. La hormona de crecimiento es necesaria en cultivos *in vitro* para obtener células T citotóxicas funcionales, así como para estimular la tasa de división de las células T, de tal modo que la GH puede influir tanto en la proliferación de células T, como en su diferenciación terminal en células efectoras (Snow, 1985).

HORMONA LUTEINIZANTE (LH) y PROLACTINA (PRL).- Estas hormonas hipofisiarias también son capaces de modular funciones del sistema inmune y son dependientes de la función del timo, puesto que animales timectomizados presentan una disminución importante en los niveles séricos de LH y de PRL con el consiguiente efecto sobre la producción de estoeroides sexuales (Grossman, 1985; Hall y Goldstein 1984; Ver apéndice II). Los trabajos de Rouabhia y colaboradores (1988a) han demostrado un efecto inhibitor de LH sobre la actividad citotóxica de las células NK por un lado, pero por el otro también demostraron un efecto estimulador de LH sobre la respuesta proliferativa de linfocitos de bazo (Rouabhia 1988b). Lo que implica distintas formas de acción para una misma hormona dependiente de la célula receptora.

La prolactina es otra hormona hipofisiaria inmunomoduladora, ya que incrementa la producción de anticuerpos *in vitro* e *in vivo* (Cross y cols. 1989) y el tratamiento con bromocriptina, que es una droga que suprime la producción de prolactina, inhibe la producción de anticuerpos (Nagy y cols. 1983). Al parecer el

principal mecanismo de inmunomodulación de la prolactina es sobre células T_H activas, específicamente sobre la producción de IL-4 e IL-6 con lo cual se asocia su efecto a las células T_H2 . Por otro lado, en pacientes con altos niveles de prolactina se han determinado niveles bajos de IL-2 (Vidaller y cols. 1986). Por último, en un modelo animal de enfermedad autoinmune se determinó que la prolactina acelera la mortalidad de estos animales (McMurray y cols. 1991).

Efecto de linfocinas y monocinas sobre el sistema neuroendócrino.

En los párrafos anteriores se ha descrito brevemente que muchos péptidos de origen neuroendócrino tienen diversas acciones inmunoregulatorias. Sin embargo, el sistema neuroendócrino puede también ser modulado por productos del sistema inmune que tienen algunas funciones hormonales, primordialmente a nivel de hipotálamo e hipófisis.

INTERFERON (IFN).- Se ha demostrado *in vitro* que el interferón induce un efecto esteroidogénico, similar al de ACTH, sobre células suprarrenales (Blalock y Harp 1981). *In vivo* se observó que el IFN α eleva los niveles de cortisol circulante en humanos. Probablemente el órgano blanco del IFN son las glándulas suprarrenales (Blalock, 1989).

INTERLEUCINA 1 (IL-1).- La interleucina 1 es una citocina producida primordialmente por macrófagos activados. Los primeros reportes de la acción de esta citocina a nivel sistémico fueron sobre su efecto en la inducción de fiebre (Dinarello , 1984); la acción directa parece estar dada al nivel del hipotálamo

anterior, lugar donde se encuentran los centros termorreguladores del organismo. Además, la IL-1 promueve la generación de ondas lentas de sueño (Besedovsky y cols. 1985). Por otro lado, la administración de IL-1 en ratas genera un incremento de ACTH y corticosterona en sangre (Besedovsky y cols. 1986). Este efecto puede ser a nivel de hipotálamo ya que la IL-1 estimula la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) (Berkenbosh y cols. 1987; Wolosky y cols. 1987) y también a nivel de hipófisis donde provoca la secreción de ACTH como se mencionó antes. La IL-1 también puede alterar la secreción *in vivo* de la hormona de crecimiento, somatostatina y prolactina en la hipófisis, a través de su acción sobre el hipotálamo (Rettori y cols. 1987; Honegger y cols. 1992).

IL-2.- En esta citocina se ha demostrado que su capacidad para elevar los niveles circulantes de ACTH y cortisol (Lotze y cols. 1985). En este caso la acción de IL-2 parece ser sobre la hipófisis, ya que esta linfocina causa una mayor producción y liberación de proopiomelanocorticotropina (POMC) en células tumorales de hipófisis (Low y cols. 1987. Smith y cols. 1987).

IL-6.- Esta linfocina, que es producida principalmente por macrófagos, tiene efectos semejantes a los de la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF). Sin embargo, recientemente se ha demostrado su participación también en las interacciones entre sistema inmune y neuroendócrino. La acción de IL-6 sobre el sistema neuroendócrino es a varios niveles: en las glándulas suprarrenales estimula la producción de corticoesteroides, en la hipófisis anterior la IL-6 estimula la liberación de LH, FSH,

PRL y GH (Spangelo y cols. 1989). También el crecimiento endometrial ha sido relacionado con niveles altos de IL-6 (Tabibzadeh y cols. 1989), y recientemente se ha sugerido la participación de IL-6 en la producción de progesterona en células de la granulosa (Gorospe y cols. 1992). Por último, se han reportado receptores para esta citocina en la hipófisis anterior (Ohmichi y cols. 1992).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF α). El TNF α es una citocina derivada de macrófagos y es liberada durante estados de inflamación. La acción de TNF α sobre el sistema neuroendócrino es también a nivel hipotálamico en donde afecta la regulación de la temperatura corporal induciendo pirexia. *In vitro*, también actúa directamente sobre la células hipofisiarias aumentando la secreción de ACTH, GH y TSH (Milenkovic y cols. 1989). Además, en las células de la cromafina, el TNF α modula los niveles de encefalina, péptido vasoactivo intestinal (VIP), sustancia P y neurotensina (Eskay y Eiden, 1992).

HORMONAS SEXUALES Y RESPUESTA INMUNE

Evidencias clínicas y experimentales sostienen la hipótesis de que los esteroides gonadales pueden regular la función inmune. Lo anterior está basado en las siguientes observaciones:

- 1) La existencia de un dimorfismo sexual en la respuesta inmune;
- 2) La respuesta inmune es alterada por la gonadectomía y reconstitución hormonal;
- 3) La respuesta inmune es alterada durante el embarazo cuando la cantidad de hormonas sexuales se incrementa;
- 4) Los órganos responsables de la respuesta inmune

poseen receptores para hormonas sexuales.

Tradicionalmente es aceptado que el sexo femenino puede montar una respuesta inmune mejor que el masculino, debido a que muchos estudios han demostrado una mayor producción de inmunoglobulinas en hembras que en machos (Grossman 1985). Además, se ha reportado que las hembras pueden rechazar injertos de piel mucho más rápido que los machos (Ahmed y cols. 1985). Por otro lado, el sexo femenino presenta mayor incidencia de enfermedades autoinmunes (Ahmed y cols. 1985), por ejemplo para lupus eritematoso sistémico la relación con respecto al sexo es 13:1 para mujeres y hombres, respectivamente. Otras enfermedades de este tipo que se presentan de manera preponderante en el sexo femenino son: artritis y diabetes. Además, existen evidencias en roedores que el tratamiento con estrógenos puede hacer menos susceptibles a los animales a infecciones de tipo bacteriano causadas por *Pneumococcus* tipo I, *Pasteurella* spp. y *Salmonella* spp. (Pung y cols. 1984), así también como a ciertos protozoarios como son *Trypanosoma* y *Plasmodium* (Cottrell y cols. 1977). Sin embargo, también existen una serie de trabajos que indican que los estrógenos pueden suprimir la respuesta inmune, afectando principalmente la de tipo celular (Ahmed y cols. 1985; Grossman y cols. 1991; Carlsten y cols. 1992).

La acción de las hormonas sexuales sobre el sistema inmune se da a 2 niveles:

- 1) A través del timo, en donde existen receptores para hormonas de ambos sexos en distintas poblaciones celulares, y en donde pueden modular la maduración de los linfocitos T, así como

la producción de hormonas tímicas (Screpanti y cols. 1991; Sakabe y cols. 1990; Goldstein, 1987; ver apéndice II).

2) A nivel periférico sobre células linfoides y macrófagos circulantes, que posean los receptores citosólicos apropiados.

Los esteroides sexuales (17 β -estradiol, testosterona y progesterona), han sido bien caracterizados en sus diferentes formas de modular la respuesta inmune (Grossman 1985; Ahmed y cols. 1985). La testosterona ha sido considerada por algunos autores como inmunosupresora, pero hasta ahora no se han detectado receptores para esta hormona en células linfoides (Cohen y cols. 1983), sólo han sido detectados receptores para estrógenos en diferentes poblaciones de células linfoides (T, B, NK) (Cohen y cols. 1983; Danel y cols. 1988), así como en macrófagos (Hu y cols. 1988; Gulsham y cols. 1990), en dónde pueden modular la respuesta inmunológica.

La acción directa de los estrógenos sobre los linfocitos B resulta en un aumento en la respuesta de anticuerpos antígeno-específicos (Clerici y cols. 1991), mientras que inhiben la capacidad citotóxica en las células NK, y en las células T inhiben su producción de linfocinas (Ahmed y cols. 1985). Su acción sobre macrófagos es, principalmente, inducir una mayor secreción de IL-1 (Gulsham y cols. 1990).

Por otro lado, recientemente se ha determinado que el estradiol puede tener un efecto diferencial sobre el sistema inmune y se debe a su acción dicotómica sobre las respuestas inmunes mediadas por células B y células T, es decir, puede incrementar la respuesta de anticuerpos, pero al mismo tiempo

inhibir la respuesta celular (Carlsten y cols. 1992).

COROLARIO.

Los estudios anteriores sobre la cisticercosis experimental, y la información adicional sobre las interacciones entre los sistemas inmune y neuroendócrino indican que existe una intrincada red de factores biológicos que pueden participar en la susceptibilidad y/o resistencia contra esta parasitosis. Dichos factores son esencialmente de tipo genético, sexual e inmunológico. De aquí se origina nuestro interés en conocer los factores sexuales y endócrinos que participan en la susceptibilidad al parásito, y conocer el comportamiento de la respuesta inmune celular que pueda ser útil para el control del crecimiento parasitario. Además, ha sido nuestro interés determinar la existencia de posibles interacciones immunoendócrinas en la cisticercosis experimental murina causada por *T. crassiceps*, con el propósito de conocer el mecanismo de acción de factores hormonales sobre la respuesta inmune celular en la cisticercosis experimental murina.

Es importante mencionar que existen muy pocos modelos experimentales que nos permitan estudiar este tipo de interacciones en enfermedades parasitarias; es decir, que permita integrar la neuroinmunoendocrinología con la inmunoparasitología y así obtener resultados de una respuesta inmune efectora que se encuentra influida por "ambos sentidos", o sea, por las hormonas del propio hospedero y por la acción del parásito sobre el sistema inmune, y de este sobre el neuroendócrino.

OBJETIVOS

El presente trabajo fue desarrollado con el propósito de:

- 1) Conocer el papel de las hormonas sexuales en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental causada por *T. crassiceps*;
- 2) Identificar el nivel de acción de las hormonas sexuales sobre la respuesta inmune en esta parasitosis;
- 3) Estudiar la cinética de repuesta inmune celular *in vivo* e *in vitro* y correlacionarla con el desarrollo de la parasitosis;
- 4) Determinar la existencia de otros factores que puedan afectar el desarrollo de la respuesta inmune en contra del parásito.

HIPOTESIS

Dados los antecedentes anteriores nuestra hipótesis es que los estrógenos favorecen el crecimiento parasitario interfiriendo con la respuesta inmune de tipo celular. De tal modo que, cualquier intervención que modifique el nivel de hormonas sexuales y/o la respuesta inmune celular, se verá reflejado en una modificación de la susceptibilidad al parásito.

A continuación presento el manuscrito que será enviado a publicación próximamente, y que más sucintamente presenta mi trabajo experimental al caso.

RESULTADOS

IMMUNOENDOCRINE INTERACTIONS IN THE REGULATION OF PARASITE GROWTH
IN EXPERIMENTAL MURINE CYSTICERCOSIS (*TAENIA CRASSICEPS*): A ROLE
FOR 17 β -OESTRADIOL.

Luis Ignacio Terrazas , Rafael Bojalil, Tzipe Govezensky, and
Carlos Larralde.

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones
Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; AP 70228;
México, D.F. 04510.

Mailing address:

Dr. Carlos Larralde

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

AP 70228. México, D.F. 04510

MEXICO

Fax number: 525-550-0048

Telephone: 525-550-3982

Running Head:

Immunoendocrine Interactions In Cysticercosis

Keywords

Immune-endocrine interactions in parasitism; cysticercosis; sex associated immunity; *Taenia crassiceps*; 17 β -oestradiol and immunity.

ABSTRACT

Neonatal thymectomy, gonadectomy and hormonal reconstitution experiments in female and male BALB/c mice experimentally infected with *Taenia crassiceps* metacestodes indicate that growth of cysticercus is regulated by thymus dependent cell-associated immunological events involving 17 β -oestradiol but not 5 α -dihydrotestosterone.

Experimental murine cysticercosis caused by *T. crassiceps* (Freeman, 1964; Larralde et al., 1989) has gained prominence in recent years as a manageable experimental system in which to explore the role of biological factors involved in host susceptibility. Thus, the significance of the H-2 genes in mice susceptibility has been advanced (Sciutto et al., 1991) as well as the relevance of cellular immune mechanisms (Bojalil et al., 1992), as opposed to antibodies (Sciutto, 1989), in immunological resistance to cysticercosis. Further, that the striking differences in susceptibility of female and male mice involves both the immune system and the gonads has been recently established (Huerta et al., 1992). *T. crassiceps* cysticercosis is also an alternative source of crossreacting antigens useful in the study of human cestode diseases (i.e. *T. solium* cysticercosis (Gottstein et al., 1986; Schantz et al., 1988; Larralde et al., 1990), hydatid disease by *Echinococcus granulosus* (Larralde et al., 1989)) and a practical model for testing candidate vaccines against porcine *T. solium* cysticercosis (Sciutto et al., 1990).

In here we probe further in the immunoendocrinological interactions regulating parasite growth in the host by way of relating neonatal thymectomy, prepuberal gonadectomy and hormonal reconstitution by 17 β -oestradiol and 5 α -dihydrotestosterone in male and female mice, with whole parasite counts, antibody response and delayed type hypersensitivity response to the parasite's antigens. Results confirm the mediation of thymus dependent cellular immune mechanisms in the sex-associated

differences in susceptibility, and point to 17 β -oestradiol as a major protagonist in the immuno-endocrinological control of cysticercus growth.

Parasites

The fast-growing ORF strain of *T. crassiceps* isolated by Freeman in 1962, was used in all experiments and was supplied by Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) in 1986. Since then the parasites have been maintained in female Balb/c mice by intraperitoneal sequential inoculation of metacestodes in their peritoneal cavity (Freeman, 1962). Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 months before.

Mice

Balb/c inbred mice of both sexes were utilized at different ages (from 5 weeks to 8 weeks of age) according to each experimental protocol. They were all bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations (Green, 1980), starting with original stock from Jackson Labs in 1982 and were fed Purina's Diet 5015 *ad libitum*.

Neonatal thymectomy

Neonatal thymectomy was performed upon mice of both sexes within 48 hr after birth, according to the method described by Sjodin et al., (1963). Thymectomized mice were used for experiments at 6-8 weeks of age. After the final assessment of experimental responses all mice were autopsied to confirm (macroscopically and histologically) that they were actually free of thymus. The results obtained from mice with thymic tissue

remaining in the mediastinum were excluded from this study.

Gonadectomy

Gonadectomies were surgically performed under anesthesia with ether on 5-week old mice of both sexes, either or not previously thymectomized. They were then allowed a 3-week recovery period before inoculation with parasites.

Infection

Ten small (aprox 2mm diameter) non budding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml PBS (0.15M NaCl, 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into each mouse using a .25 gauge needle. Mice were sacrificed 30 days after infection and all the cysts found inside the peritoneal cavity were counted. In this form of disease the parasites never migrate to another location in the host.

Measurement of Delayed Type Hypersensitivity response (DTH)

In all mice, DTH was measured 28 days after infection by injecting into the right hind-footpad of each mouse 100 μ g of vesicular fluid proteins in 30 μ l of sterile saline solution. Swelling was measured 24 h later with a dial-thickness gauge (Mitotoyo, Japan); the original (before inoculation) footpad thickness was used as internal control.

Anticysticercus antibody assay.

Vesicular fluid from *T. crassiceps* larvae was employed as the source of antigen for detection of anticysticercus antibody in the sera of mice by ELISA, as described elsewhere (Larralde et al., 1989a).

Hormonal reconstitution

Gonadectomized mice of both sexes were hormonally reconstituted with their own major sexual hormone or with the sexual hormone of the opposite sex. The hormones used were 17 β -oestradiol and 5 α -dihydrotestosterone, and were delivered in the form of subcutaneous three-weeks controlled dose-dependent release rate pellets (Innovative Research of America. IRA. Toledo, OH.). Doses of 17 β -oestradiol were 0.1 mg/pellet or 0.01 mg/pellet, while the only dose used of 5 α -dihydrotestosterone was of 0.5 mg/pellet. All mice had the pellet implant for three days before infection; this was done to assure an adequate hormonal environment in the hosts when cysticercus were inoculated. Twenty-one days after the implantation of hormonal pellets all mice received a second pellet of the same dose to maintain hormonal levels for another week. The biological hormonal function of pellets were confirmed by observation of the size of the uterus in gonadectomized females and the size of seminal vesicles in orchietomized males (Nagasawa and Yanai, 1977).

RESULTS

1 Effect of sex in normal mice

The notable difference in parasite intensities between control female and male mice are immediately appreciated in Table 1: almost five times greater intensity was found in normal females (204 ± 92) than in normal males (43 ± 21). DTH was significantly higher in males than in females, while antibody response appeared to be equal in both sexes.

2 Effect of gonadectomy

Gonadectomy significantly reduced in 41 % the parasite intensity of females relative to controls ($P < 0.01$) while it increased that of males in 190 % ($P < 0.01$), bringing down the female/male intensity quotient from 4.7 to 0.9. As for delayed type hypersensitivity, gonadectomy in females increased it 45 %, ($P < 0.05$) while it was inconsequential for DTH response of males (1.5 % decrement, $P > 0.1$; Table I). Whole antibody serum levels were not significantly affected by gonadectomy in neither female or male mice ($P > 0.5$; Table I).

3 Effect of thymectomy

Thymectomy significantly increased parasite intensity in females to 70 % relative to controls ($P < 0.01$), and up to 351 % ($P < 0.01$) that of males (Table 1), reducing the female/male intensity quotient from 4.7 to 1.8. Delayed type hypersensitivity was significantly reduced by thymectomy in both sexes ($P < 0.01$) but antibody response was not modified (Table I).

4 Effect of both thymectomy and gonadectomy

In females, the reducing effect of gonadectomy upon parasite intensity ($P < 0.01$) together with the increasing effect of thymectomy ($P < 0.01$) nearly equally countered each other to reach a net effect of only 7 % reduction relative to control values ($P > 0.05$). In males, however, the increasing effects of gonadectomy ($P < 0.01$) and of thymectomy ($P < 0.01$) prevailed in mice when they were both gonadectomized and thymectomized, thus reaching a net 286 % increment relative to controls ($P < 0.01$). In consequence, the female/male intensity quotient in this group was reduced to 1.1. Delayed type hypersensitivity was decreased in both sexes by gonadectomy and thymectomy ($P < 0.01$) while antibody response was not modified (Fig. 1, Table 1).

5 Effect of hormonal reconstitution

Table II shows the results obtained in this set of experiments performed upon gonadectomized female and male mice. Here again, the sex-associated differences in parasite intensities of normal control mice, now favoring females over males by a factor of seventeen, is to be noted. Likewise, the changes in parasite intensities brought about by gonadectomy (decreasing that of females by 56 % ($P < 0.01$) and increasing the one of males by 350% ($P < 0.01$)), cancelling the usual sex-associated differences in parasite intensity of control mice was reproduced as described above (see also Huerta et al., 1992). Hormonal reconstitution experiments met with the problem of very large variations within groups of mice as compared to the other

groups (i.e. the variation coefficient of control females is equal to $285/85 = 3.5$, while that in reconstituted females are 1.4, 2.2 and 1.5). However, some solid statistical influences may be drawn from the data. Reconstitution with 17 β -oestradiol brought about a large and statistically very significant ($P < 0.01$) increment in parasite intensity as compared to gonadectomized mice, in both female ($P < 0.01$) and male ($P < 0.01$) mice, while 5 α -dihydrotestosterone seemed inconsequential ($P > 0.05$). DTH to the parasite antigens was also significantly decreased by reconstitution with 0.1 mg of 17 β -oestradiol as compared with control ($P < 0.01$) and with gonadectomized ($P < 0.01$) mice, in both sexes (Table II). The lower dose (0.01 mg) of 17 β -oestradiol had similar effects upon DTH, excepting the contrast between hormonally reconstituted and gonadectomized females. Antibody levels were not significantly altered by hormonal reconstitution in neither sex or treatment combination (Table II).

6 The correlation between parasite intensity and type of immune response.

As a way to examine the association between type of immune response (cellular or humoral) and parasite intensities, all pairs of data involving parasite intensity and DTH, and parasite intensity and antibody response, collected in these experiments, were plotted in Figure 1. The resulting plots are very scattered but, when analyzed disregarding sex, statistics indicate to a significant ($P < 0.05$) negative correlation between parasite

intensity and DTH (i.e. the more parasites the less DTH) whereas no significant correlation positive or negative ($P > 0.05$) was found with antibody response. When analyzed within sex, the correlations indicated that only in females was large parasite intensity related to low DTH response ($P < 0.02$) while in males the correlation was tenuous.

DISCUSSION

Our results further support previous findings indicating to a significant interaction between gonads and immune system -thymus in particular- in the regulation of growth of *T. crassiceps* cysticerci placed and growing in the peritoneal cavity of recipient susceptible BALB/c mice (Huerta et al., 1992; Bojalil et al., 1992). Likewise, the lack of correlation between parasite intensity and total antibody response in these experiments further weakens the role of antibody as a major factor in controlling growth of the metacestodes. In contrast, the significant decrease of parasite intensity with increase in DTH strengthens cell associated immune phenomena as being the mechanisms principally involved in the host's immunological dealing with the cysticerci (Bojalil et al., 1992).

The most original contribution of this work stems from hormonal reconstitution experiments which show that 17 β -oestradiol administration increased parasite intensities in both gonadectomized female and male mice, to levels superior to those of controls, while 5 α -dihydrotestosterone was ineffective. Concomitantly, 17 β -oestradiol reconstitution significantly decreased delayed type hypersensitivity while 5 α -dihydrotestosterone was inconsequential. Thus, one is led to propose that the sex-associated differences in parasite intensities, favoring females over males, is mediated by 17 β -oestradiol exerting a negative influence upon the immunological control of parasite growth. Further, because sex-associated differences in parasite intensity and DTH were minimized by

thymectomy, and because of the negative correlation between parasite intensity and DTH -but not with antibody response- one strongly suspects that 17 β -oestradiol acts through cellular immunity mechanisms under close thymus related control.

Literature now abounds with cases where estrogens relate with immunological components or influence immune events. Thus, receptors for oestrogens have been found in thymus (Ahmed et al., 1985; Grossman, 1985, 1991; Screpanti et al., 1989; Sakabe et al., 1990) and in peripheral immunocompetent cells like T CD-8 lymphocytes (Cohen et al., 1983; Clerici and Bergamasco, 1991) , macrophages (Hu et al., 1988; Gulsham, 1990) and B cells (Danel et al., 1988). Likewise, oestrogens have been involved in the maturation of different subsets of T lymphocytes (Sakabe et al., 1990; Screpanti et al., 1991) and in the production of IL-2 (Henriksen and Frey, 1982; Ahmed et al., 1984). Testosterone, in contrast, has not get been found to be a major influence on the immune system (Cohen et al., 1983; Polan, 1988; Gulsham, 1990; Danel et al., 1988). So that, in general, our finding 17 β -oestradiol a most relevant sex hormone in murine cysticercosis is in good accord with other observations relating it with thymus dependent cellular immunity, such as is delayed-type hypersensitivity.

However, that a single hormone so dramatically affects a major feature of a parasitic disease such as parasite intensity is rarely ever recognized, and implies promises of other insights about the complexity of host-parasite relationships. For example sexual hormones could also - not necessarily alternatively- be acting through the hypophyseal hormones (FSH and LH), that have

been also proposed as immunomodulators (Rouhabia et al., 1988) and that would most likely be altered by the gonadectomies and thymectomies performed in our experiments. On the other hand, high levels of estrogenic hormones stimulate the release of prolactin in pituitary gland, and this hormone also affects the immune responses (Yamaguchi et al., 1990).

At this stage then, it would be adventurous to point to a single molecular site and form action for 17 β -oestradiol in the regulation of cysticercus growth, but our experiments leave no doubt as to it's capacity to regulate the growth of cysticerci by way of the immune system, involving at least, the thymus.

Figure 2 presents an advanced scheme of the biological factors involved in cysticercus growth, their likely target systems, the positive or negative sign of their influences, and the molecules most likely involved. The scheme is not final, of course, it is developing, and gaining in precision and depth, as our experimentation with *T. crassiceps* in BALB/c mice progresses.

Notwithstanding the statistical significance of the major variables that we have found affect *T. crassiceps* growth in the peritoneal cavity of recipient mice [(the host's sex (Freeman, 1964; Larralde et al., 1989), immune status (Sciutto et al., 1990) and H-2 haplotype (Sciutto et al., 1991)], an unexplained variation in parasite intensities is a usual finding in all experiments. Note the differences between control and gonadectomized values of parasitic intensities in males in Table I and II, for instance. The female to male ratios always favor females -here and elsewhere (Sciutto et al., 1990, 1991; Huerta

et al., 1992)- but their absolute number vary considerably between experiments. This residual variation may perhaps derive from other host determinants of parasite growth - besides those already identified- and/or from the parasite itself. The period in the oestral cycle in which each one of the hosts is challenged with the implanted cysticerci -those initial few days in which the cysticerci either establish in the host or are rejected (Larralde et al., 1989; Sciutto et al. 1990)- could be of significance. Likewise, *T. crassiceps* is known to differentiate into several strains -some fast and other slow in growth (Larralde et al., 1989; Sciutto et al., 1991). Thus, our initial parasite strain may have differentiated to a point where the sampling of ten seemingly identical cysticerci for each individual challenge may include one or a few members differing widely in growth capacity, thus giving raise to variations between experiments.

LEGENDS

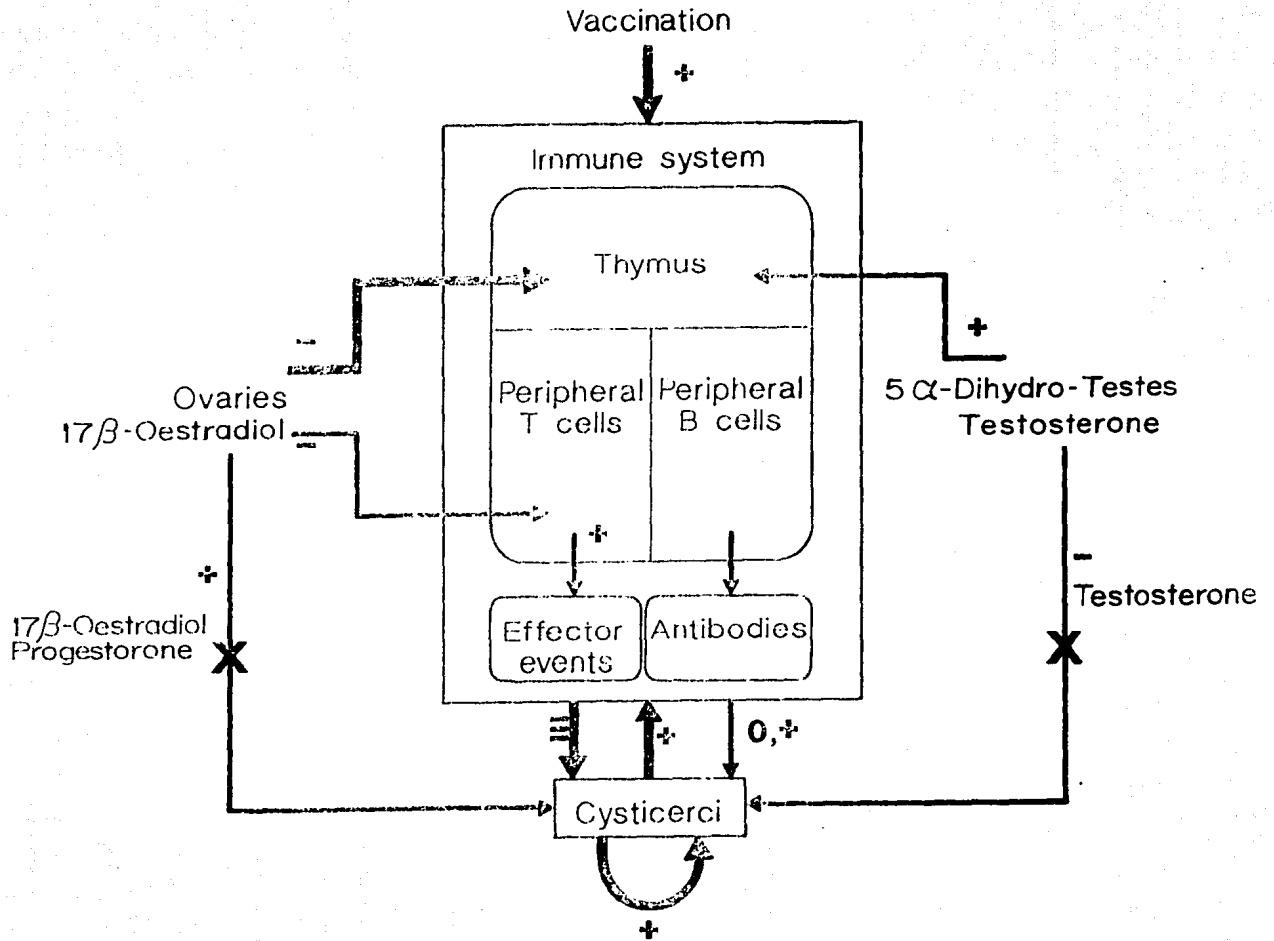
TABLE I

(a) is very significant differences ($P < 0.01$) between genders within treatment; (b) is significant ($P < 0.05$) differences between genders within treatment; (c) is very significant differences between treatments within genders; (d) is significant differences between treatments within gender; (n) is the number of mice in each group.

Parasites intensities are given as the mean \pm one standard deviation (s.d.) of the number of cysts recovered from the peritoneal cavity of each mouse. DTH is expressed as the mean \pm one s.d. of the percent increment of foot-pad thickness after 24 hs of antigen injection relative to it's own thickness prior to injection in each mouse. Antibody level is expressed as the mean \pm one s.d. of three ELISA O.D. readings at 492 nm performed in each serum. Statistical analysis was performed by paired "t" testing groups of equal or unequal sizes.

TABLE II

Idem to table I.



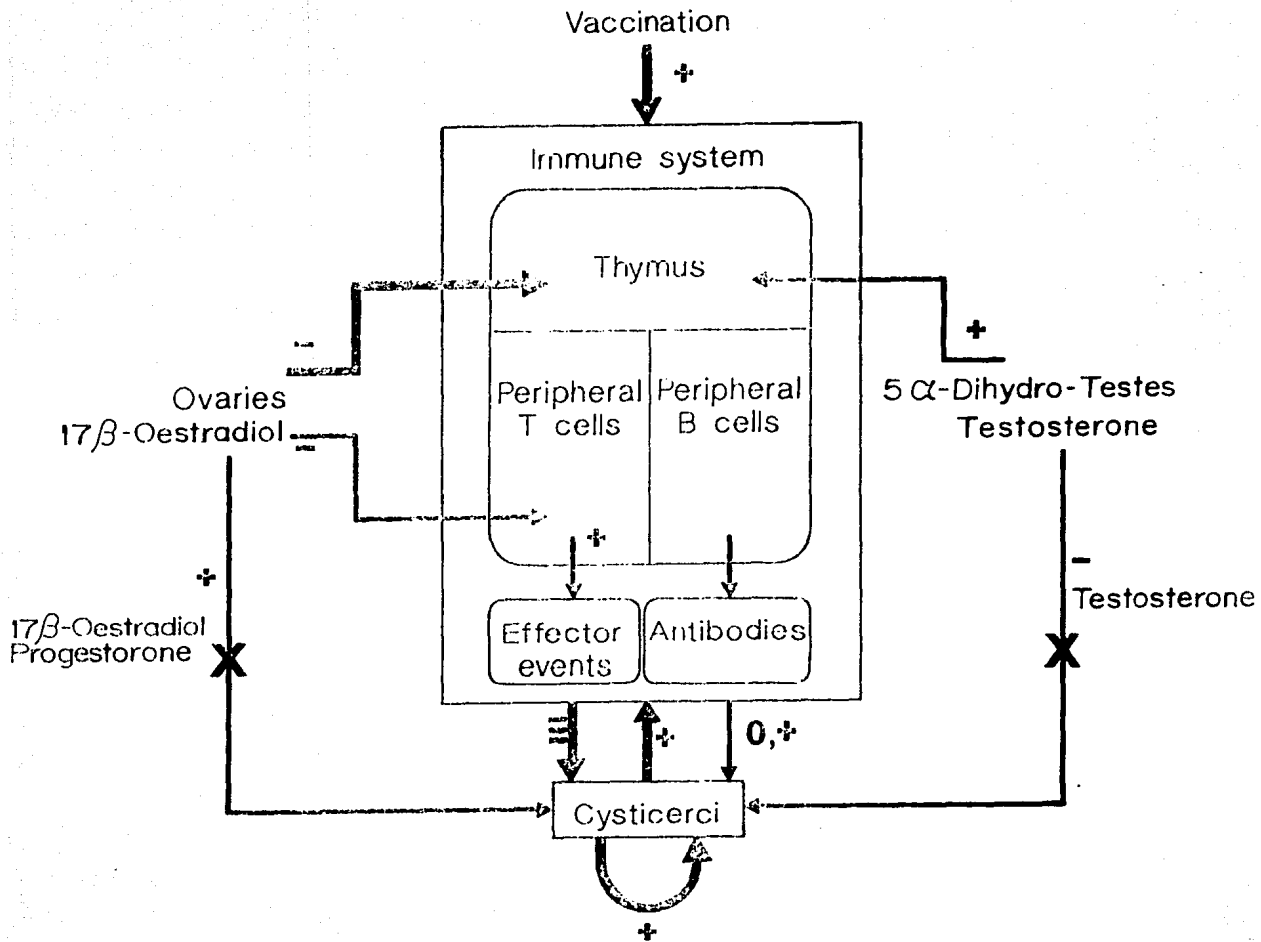


FIGURE 1

Plots of parasite intensities in each individual mouse with the same individual's values for DTH and antibody response without discriminating for differences in sex or treatment group. A statistically significant negative correlation coefficient was found only between parasite intensity and delayed type hypersensitivity ($P < 0.05$), and not antibody response. However, the linear model system only explained 5 % of the total variance of parasite intensities.

TABLE I

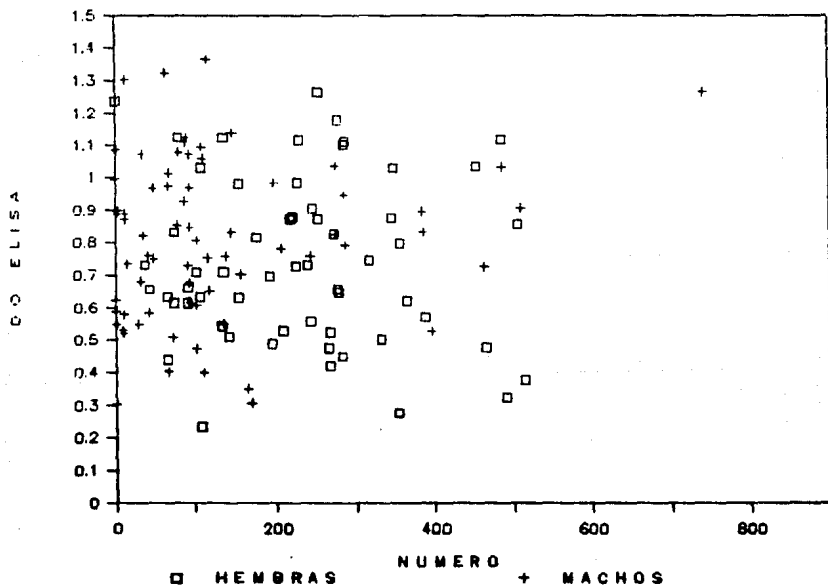
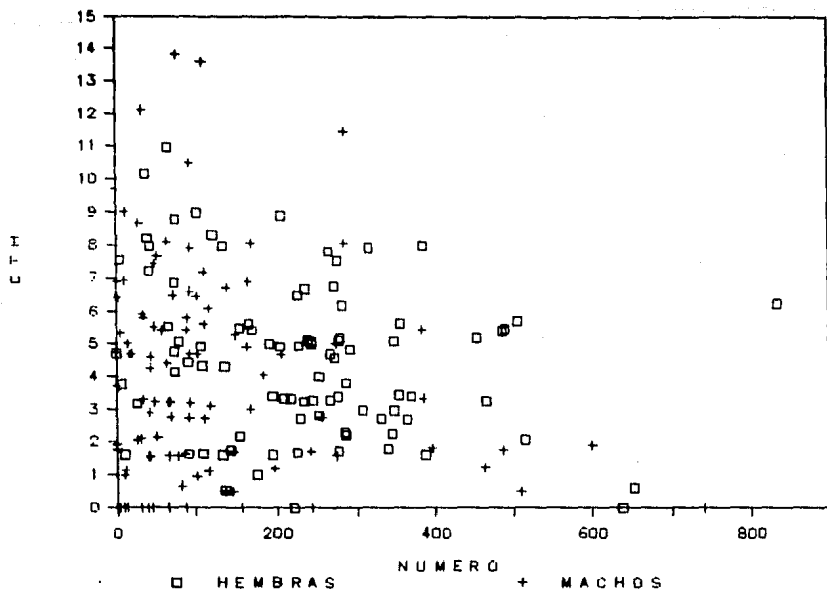
RESPONSE		PARASITE INTENSITY		D T H		ANTIBODY LEVEL	
TREATMENT	FEMALES	MALES	FEMALES	MALES	FEMALES	MALES	
CONTROL	204 ± 92 (n= 8)	^a 43 ± 21 (n= 10)	4.5 ± 2.2	^a 8.8 ± 2.6	.648 ± .193	.720 ± .081	
GONADEC- TOMI ZED	^c 119 ± 80 (n= 10)	^c 125 ± 81 (n= 10)	7.3 ± 2.3	6.5 ± 2.3	.633 ± .112	.656 ± .102	
THYMEC- TOMI ZED	^c 351 ± 99 (n= 12)	^{c,b} 194 ± 163 (n= 8)	3.9 ± 1.7	^c 1.07 ± 1.1	.734 ± .190	.756 ± .164	
THYMEC- TOMI ZED & GONADEC- TOMI ZED	^c 201 ± 157 (n= 8)	^c 183 ± 71 (n= 7)	4 ± 2.4	^c 3 ± 1.9	.586 ± .169	.736 ± .145	

Effect of gonadectomy, thymectomy, and thymectomy & gonadectomy upon parasite intensity, delayed type hypersensitivity (DTH), and antibody level in experimental murine cysticercosis by *T. crassiceps*.

TABLE II

RESPONSE TREATMENT		PARASITE INTENSITY		D T H		ANTIBODY LEVEL	
		FEMALES	MALES	FEMALES	MALES	FEMALES	MALES
CONTROL		268 ± 85 (n= 10)	16 ± a 22 (n= 10)	4 ± 2.2	8.5 ± 2.6 a	.865 ± .302	.826 ± .327
GONADECTOMIZED		119 ± ^c 79 (n= 10)	72 ± ^b 51	4.4 ± 2.6	7.1 ± 3.4	.836 ± .306	.991 ± .243
GONADECTOMIZED AND RECONSTITUTED WITH:	17 β-OES- TRADIOL (0.01mg)	382 ± 269 (n= 6)	268 ± ^c 236 (n= 7)	4.75 ± 2.50	4.84 ± ^c 1.57	.956 ± .180	.804 ± .323
	17 β-OES- TRADIOL (0.1 MG)	466 ± ^c 209 (n= 5)	319 ± ^c 173 (n= 9)	1.78 ± 2.16	2.1 ± ^c 2.2	1.178 ± .200	.826 ± .211
	5 α-DIHY- DROTESTOS- TERONE (0.5 mg)	152 ± 101 (n= 10)	67 ± ^b 35 (n= 10)	2.71 ± 2.23	6.75± 2.0	.938 ± .260	.953 ± .247

Effect of gonadectomy and hormonal reconstitution upon parasite intensity, delayed type hypersensitivity (DTH) and antibody level in experimental murine cysticercosis by *T. crassiceps*.



RESULTADOS ADICIONALES

RESULTADOS ADICIONALES

(CINETICA DE LA RESPUESTA INMUNE Y CRECIMIENTO PARASITARIO)

INTRODUCCION.

Con el propósito de conocer el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral, y su relación con el crecimiento parasitario; llevamos a cabo una cinética de ambos tipos de respuestas en ratones de la cepa endogámica BALB/c de ambos sexos con distintos tiempos de infección. Las respuestas de tipo celular analizadas fueron: la hipersensibilidad retardada (DTH) *in vivo* a antígenos específicos del fluido vesicular de *T. crassiceps*, y la respuesta a concanavalina A *in vitro* utilizando el método de incorporación de timidina tritiada al núcleo. Para la respuesta inmune humoral se detectaron los niveles de anticuerpos anticisticerco (IgG) por ELISA.

La iniciación de una respuesta de DTH depende del reclutamiento de células T circulantes específicamente sensibilizadas. El contacto con el antígeno estimula a estos linfocitos a producir citocinas, algunas de las cuales son capaces de atraer y activar inespecíficamente a células mononucleares de la circulación sanguínea. Estos macrófagos reclutados dan origen a la inflamación al causar una destrucción inespecífica del tejido, o bien al liberar citocinas inflamatorias como leucotrienos ó prostaglandinas (Green y cols. 1984). La medición de la respuesta de DTH en un sitio periférico, como lo es el cojinete plantar o la oreja, provee un medio para

cuantificar el grado de sensibilización a un antígeno. El grado de la inflamación refleja en parte el número de células reactivas antígeno-específicas en la circulación, este hecho es apoyado por experimentos de transferencia celular, en los cuales existe una asociación positiva entre el número de células transferidas y el tamaño de la lesión generada (Turk, 1980).

Por otro lado, la respuesta *in vitro* a mitógenos específicos para linfocitos T es considerada como una medida del estado inmunológico celular del organismo. Uno de los mitógenos más utilizados es la concanavalina A. Esta prueba se lleva a cabo en células esplénicas, debido a que en el bazo circulan 8 veces más linfocitos que en todos los ganglios linfáticos juntos, y además, en éste órgano se encuentran la mayoría de las células involucradas en la respuesta inmune.

Por último, la detección de anticuerpos se realizó para conocer el desarrollo de la respuesta inmune humoral a la par con la de tipo celular.

MATERIALES Y METODOS.

ANIMALES.

Se utilizaron ratones de la cepa endogámica BALB/c de ambos sexos, con 6 ó 7 semanas de edad.

PARASITOS.

Los parásitos utilizados fueron los metacéstodos de *Taenia crassiceps* variedad ORF, que han sido mantenidos en el laboratorio a través de pases intraperitoneales en ratones

hembras.

INFECCION.

Todos los animales fueron infectados por vía intraperitoneal el mismo día, con 10 cisticercos de *T. crassiceps* con un diámetro menor a 2 mm y sin yemas aparentes, en un volumen de 300 μ l de PBS.

CINETICA DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH).

Los animales infectados se anestesiaron con éter para medir su cojinete plantar posterior derecho con un vernier (Mitotoyo, Japón). Posteriormente, fueron inyectados intradérmicamente en el mismo cojinete plantar con 100 μ g de proteínas de fluido vesicular del cisticerco de *T. crassiceps*, estos desafíos se hicieron a los 3, 7, 14, 21, 28 y 42 días después de la infección (siempre se utilizaron 10 ratones de cada sexo). La inflamación del cojinete plantar se midió 24 h más tarde y se expresó como el porciento de incremento del cojinete tomado antes de la inyección del antígeno.

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTICISTICERCO.

Después de realizar las mediciones de DTH, se obtuvo el suero de todos los animales para la detección de anticuerpos anticisticerco utilizando la técnica del ELISA. Como antígeno se utilizaron proteínas del fluido vesicular del cisticerco de *T. crassiceps*, los sueros se diluyeron 1:100 en PBS-tween y se procesaron como reportó Sciutto y cols. (1990).

RESPUESTA BLASTOGENICA AL MITOGENO CONCANAVALINA A.

Después de haber realizado las mediciones de DTH, y obtenido el suero para la detección de anticuerpos anticisticerco, los ratones parasitados y normales de ambos sexos fueron sacrificados por dislocación cervical. En condiciones estériles, se extirparon los bazos y se depositaron en una solución salina balanceada (SSB) fría. Para la obtención de las células linfoides, los bazos fueron perfundidos con 5 ml de SSB, después se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con cloruro de amonio al 0.87 % en un buffer de tris para lisar los eritrocitos. Inmediatamente las células se lavaron 3 veces con SSB para eliminar el cloruro de amonio y el detritus celular. Posteriormente, las células se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a 5×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, New York, USA.), suplementado con 10 % de suero bovino fetal (GIBCO), 1% de penicilina estreptomycin (GIBCO); 1 % de aminoácidos no esenciales (GIBCO), 0.5 % de L-glutamina 200 mM (GIBCO) y 25 mM de Hepes (ICN, Cal., USA). La viabilidad se determinó por la exclusión del colorante azul tripano, y ésta siempre fue mayor al 95 %.

Cien microlitros de esta suspensión celular fueron sembradas en microplacas de cultivo de 96 pozos (Costar) y estimuladas con 100 μ l de una solución de Con A (Sigma) (2 μ g/ml), diluida en el mismo medio de cultivo. En los pozos controles sólo se agregaron otros 100 μ l de medio suplementado. Las células se incubaron por 54 h a 37 C y 5 % de CO₂. Al término de este período, a cada pozo se agregaron 10 μ l de medio con 1 μ Ci de ³H-timidina (NEN. Boston

Ma. U.S.A.) y las placas se incubaron nuevamente por 18 h más. Al final de la incubación, las células se cosecharon en un cosechador automático (Brandel Inc), sobre un papel de fibra de vidrio (Whatman) y posteriormente la marca radiactiva fue determinada en un contador de centelleo líquido (Tri Carb).

Los resultados de estos cultivos son reportados como Índice de Estimulación (I.E.); el cual se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{I.E.} = \frac{\text{cpm de células estimuladas con Con-A}}{\text{cpm de células no estimuladas}}$$

CARGA PARASITARIA.

Después de la obtención del bazo para el cultivo de linfocitos, todos los animales fueron procesados para contar el número de parasitos en la cavidad peritoneal de cada uno. Esto se realizó con una jeringa de insulina y se consideró como una unidad todo aquel cisticercos que estuviera libre con o sin yemas en uno de sus extremos.

RESULTADOS

RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH) A ANTIGENOS DEL CISTICERCO DE *T. crassiceps*.

El nivel de respuesta celular *in vivo* a antígenos del parásito se llevó a cabo durante el curso de la infección, los animales de ambos sexos se inyectaron con el antígeno en el cojinete plantar los días 3, 7, 14, 21, 28 y 42 post-infección (p.i.). La inflamación específica provocada por la inyección del antígeno en los animales infectados se muestra en la figura 1. La capacidad para montar una respuesta de DTH es evidente desde los primeros días de infección (en el día 3 con 4.78% en machos y 3.25 % en hembras). Esta respuesta se incrementó gradualmente en ambos sexos hasta alcanzar la máxima inflamación en el día 14 p.i. ($P < 0.001$). Después de este punto la respuesta de DTH tuvo fluctuaciones, pero en el día 21 p.i. ésta disminuyó significativamente con respecto a la máxima obtenida ($P < 0.001$).

RESPUESTA DE ANTICUERPOS.

Los anticuerpos (IgG) anticisticerco fueron detectados mediante ELISA. Este tipo de respuesta fue incrementándose constantemente a partir del día 7 p.i. en el que los niveles de anticuerpos detectados fueron mínimos. Después de ese día el nivel de anticuerpos se incrementó gradualmente sin sufrir ninguna variación importante durante el desarrollo de la parasitosis, de tal modo que al final de la misma hubo un aumento significativo en el nivel de anticuerpos anticisticerco (Figura

RESPUESTA DE DTH

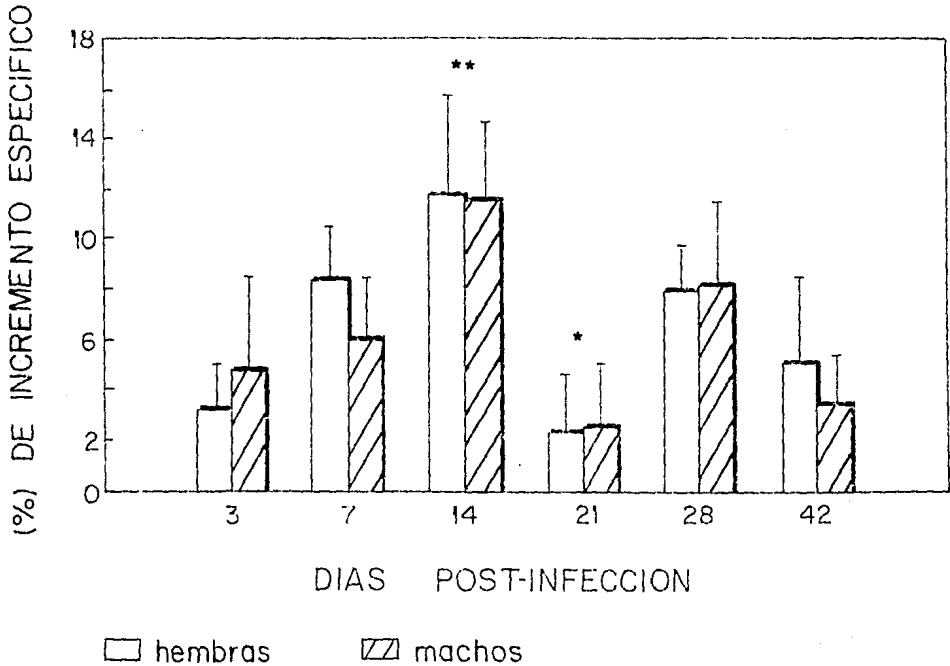


FIGURA 1.- CINÉTICA DE LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA (DTH). Todos los animales fueron infectados el mismo día con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. En los días especificados se desafiaron con 100 μ g de proteínas del fluido vesicular de cisticerco. Veinticuatro horas más tarde se midió la inflamación en el cojinete plantar de cada animal (la cual se reporta como el porcentaje específico de incremento en el volumen del cojinete plantar). Obsérvese que la máxima respuesta se alcanza en el día 14 p.i. y que ésta cae significativamente el día 21.

**** P < 0.001 con respecto a todos los tiempos de infección.**

*** P < 0.01 con respecto a los días 7, 14 y 28 p.i.**

DETECCION DE ANTICUERPOS ANTICISTICERCO (IgG) ELISA

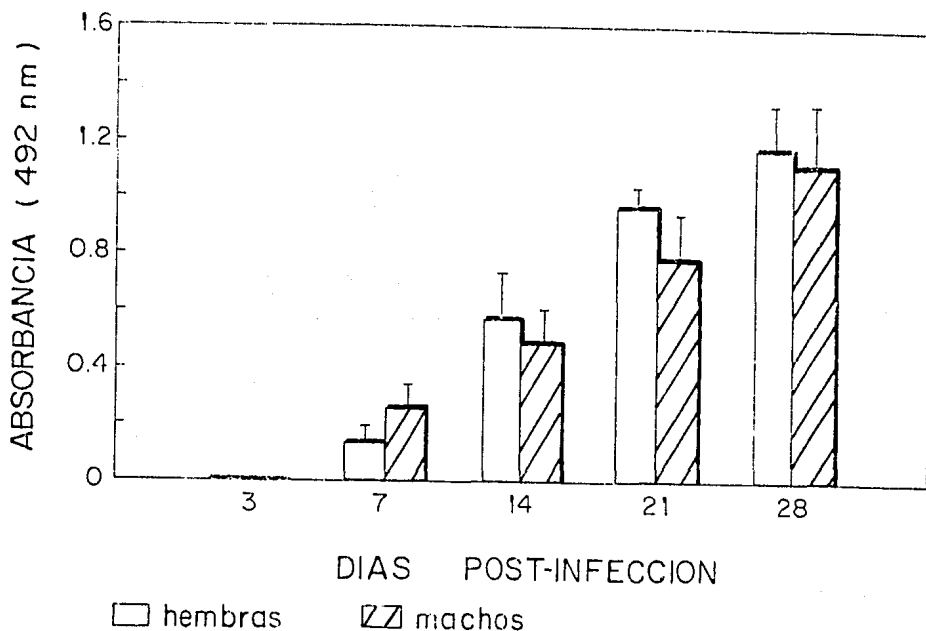


FIGURA 2.- RESPUESTA DE ANTICUERPOS (IgG) ANTICISTICERCO. Después de las mediciones de DTH, se obtuvo el suero de los animales parasitados para detectar los anticuerpos anticisticercos por medio de ELISA. Puede observarse en esta figura que a partir del día 7 p.i. hay un incremento sostenido de los niveles de anticuerpos antiparasitarios, lo que nos sugiere que este tipo de respuesta no es alterada durante el desarrollo parasitario.

2).

CINETICA DE RESPUESTA A CON-A IN VITRO.

Tres o cuatro animales de cada sexo, parasitados o no, fueron sacrificados a los 7, 14, 21, 28 y 42 días p.i., para determinar la respuesta de sus linfocitos al mitógeno Con-A.

En la figura 3 puede observarse que la capacidad de los linfocitos T para responder a Con-A es superior en los animales normales que en los parasitados. Independientemente de lo anterior, se observó una declinación gradual en la respuesta a Con-A en los animales parasitados de ambos sexos. De tal forma que el índice de proliferación mínimo se detectó en el día 21 p.i. (4.2 para hembras y 3.6 para machos) y fue significativamente menor ($P < 0.01$) al índice de estimulación de los animales controles. Posteriormente hubo una recuperación de la respuesta pero no fue sostenida, ya que al final de la infección el índice de proliferación volvió a caer. Observándose en este día una menor respuesta en las hembras.

CINETICA DEL CRECIMIENTO PARASITARIO.

A partir de una infección inicial con 10 cisticercos de *T. crassiceps*, se siguió el desarrollo de esta parasitosis en ambos sexos. Desde los primeros días de infección pudieron detectarse números pequeños de cisticercos. Sin embargo, lo más sobresaliente de la cinética de crecimiento del parásito puede reducirse a lo que pasó a partir de la 3a. semana de infección,

CINETICA DE RESPUESTA A CON -- A

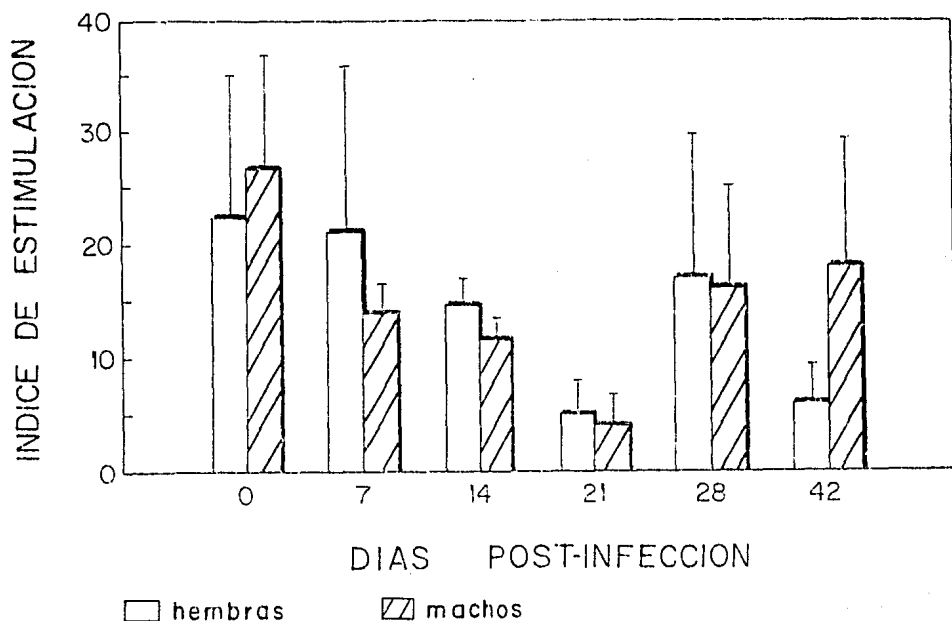


FIGURA 3.- CINETICA DE LA RESPUESTA LINFOPROLIFERATIVA A CON-A IN VITRO. En esta gráfica puede apreciarse como los linfocitos de los animales parasitados tienen una respuesta menor a la Con-A, (mitógeno específico para células T), que los animales sanos. También puede notarse que la menor respuesta se detectó durante la 3a. semana de infección, lo cual coincide con la menor respuesta de DTH y el incremento en la carga parasitaria.

que fué donde se inició el mayor aumento en la carga parasitaria (Figura 4). A partir de este momento empiezan a ser evidentes las diferencias de susceptibilidad entre sexos, y un incremento sostenido en la carga parasitaria.

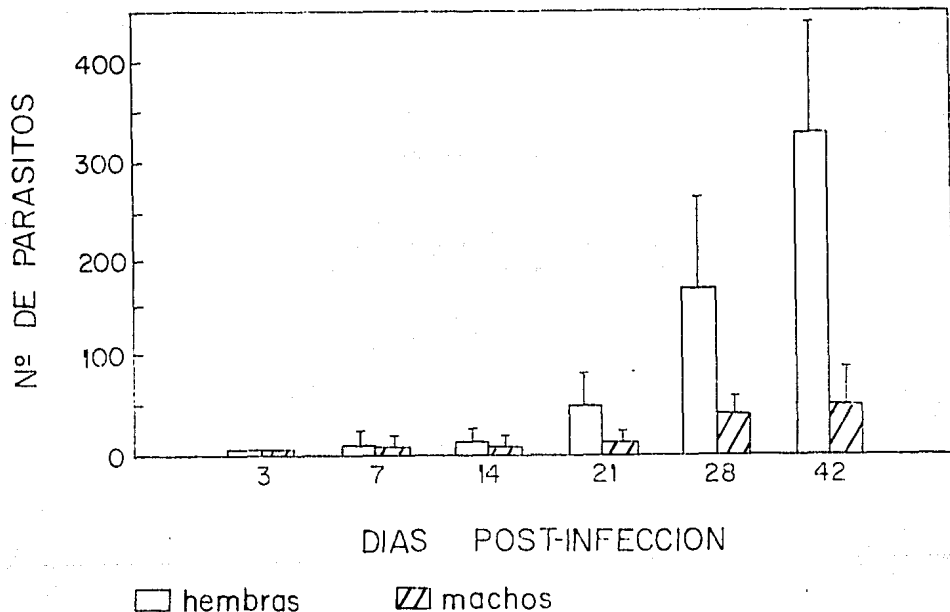


FIGURA 4.- CINETICA DEL CRECIMIENTO PARASITARIO. Aquí puede observarse como a partir de la 3a. semana de infección se inicia un crecimiento acelerado de la carga parasitaria y es también a partir de este momento que las diferencias de susceptibilidad entre sexos empiezan a acentuarse, para hacerse completamente evidentes al final de la infección.

RESULTADOS ADICIONALES

(EFECTO DE LA INDOMETACINA Y DE LAS CELULAS ADHERENTES SOBRE LA RESPUESTA A CON-A EN LINFOCITOS DE ANIMALES NORMALES Y PARASITADOS).

INTRODUCCION.

Después de haber observado que la respuesta a Con-A en los animales parasitados estaba disminuida, decidimos estudiar algún posible mecanismo que pudiera ser responsable de esta baja respuesta al mitógeno.

Es bien conocido que varias especies de parásitos ejercen una influencia inmunomoduladora sobre su hospedero; de tal forma que las respuestas inmunes potencialmente protectoras pueden ser inhibidas. Los mecanismos descritos para estas evasiones son varios, por ejemplo, inhibición de la producción de IL-2, activación de células CD-8+ y generación de supresión sensible a indometacina.

Los mecanismos de evasión inmune en la cisticercosis son poco conocidos, pero es posible que alguno de los mencionados pueda estar involucrado. Debido a: que esta parasitosis es crónica, y que la estimulación antigénica constante puede llevar a los macrófagos a secretar cantidades grandes de prostaglandinas de la serie E, las cuales inhiben la producción de IL-2; decidimos estudiar si este mecanismo participa en la respuesta a Con-A en los animales parasitados. Para lo cual utilizamos una

droga (indometacina) que inhibe la secreción de prostaglandinas.

MATERIALES Y METODOS.

Animales hembras de la cepa BALB/c con 8 y 24 semanas de infección fueron sacrificados y sus células esplénicas obtenidas y sembradas de la misma forma que se mencionó anteriormente, solo que además se agregaron en los pozos de cultivo 20 μ l de una solución de 2 μ g/ml de Indometacina (Sigma). En un experimento realizado en forma simultánea, con células de los mismos animales, se procedió a eliminar las células adherentes por incubación en placas de petri durante 3 h a 37 C y 5 % de CO₂. Al término de este lapso, las células no adherentes fueron recuperadas, ajustadas y sembradas de la misma forma que se mencionó antes. Se les agregó la misma cantidad de indometacina, se incubaron 72 h, recibieron 3H-timidina, fueron cosechadas y procesadas tal como se mencionó anteriormente.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA RESPUESTA A CON-A *IN VITRO*.

Después de observar que los animales parasitados tenían inhibida su respuesta linfoproliferativa a Con-A, y para determinar el posible origen de tal inhibición se hicieron los experimentos *in vitro* del efecto de la indometacina sobre la proliferación de linfocitos en los animales parasitados.

Se utilizaron ratones hembras con 8 y 24 semanas de infección, sus células esplénicas fueron estimuladas con Con-A y, como se esperaba, su respuesta al mitógeno se encontró significativamente inhibida en ambos experimentos (Figura 5a y 6a). Sin embargo, al agregar indometacina en el medio de cultivo, se observó una recuperación de la respuesta proliferativa a Con-A en los animales parasitados ($P < 0.01$), de modo que las diferencias con los controles desaparecieron (Figuras 5a y 6a), la indometacina no tuvo ningún efecto sobre la proliferación en las células de los animales normales ($P > 0.05$).

Como se sabe, la indometacina inhibe la producción de prostaglandinas (PG), y los macrófagos son productores de PG; conociendo lo anterior decidimos determinar si los macrófagos de los animales parasitados pudieran estar involucrados en la inhibición de la respuesta a Con-A. Así que, los macrófagos fueron eliminados de los cultivos por adherencia y la indometacina fue probada nuevamente en estas condiciones. Los resultados obtenidos pueden apreciarse en las figuras 5b y 6b, donde la

indometacina ya no tuvo ningún efecto sobre la proliferación de los linfocitos de los animales parasitados, y además, la ausencia de los macrófagos iguala la capacidad de respuesta de los linfocitos en los animales parasitados con respecto a sus controles. Esto sugiere un papel de los macrófagos en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina, posiblemente a través de la liberación de prostaglandinas inhibitorias de la secreción de IL-2.

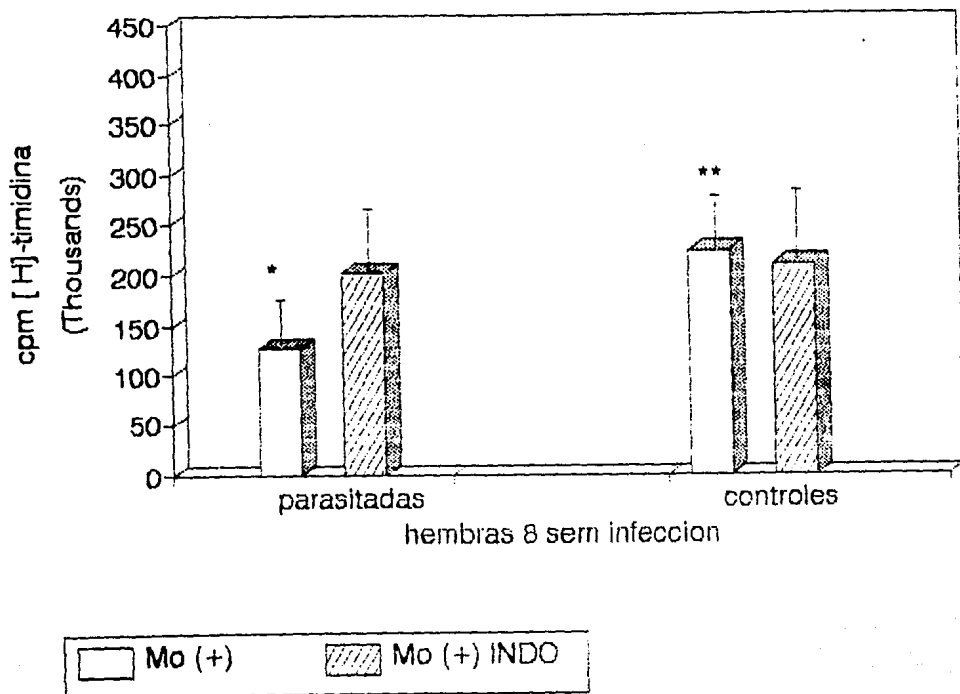


FIGURA 5a.- EFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA RESPUESTA A CON-A IN VITRO. En esta gráfica puede observarse cómo ratones hembras con 8 semanas de infección tienen una respuesta linfoproliferativa a Con-A mucho menor que aquellos animales normales. Nótese como la adición de indometacina al medio de cultivo generó un incremento significativo de la respuesta en las células de los animales parasitados, mientras que en los normales la indometacina no tuvo efecto alguno.

* P < 0.05 con respecto al control.

** P < 0.05 con respecto al parasitado sin indometacina.

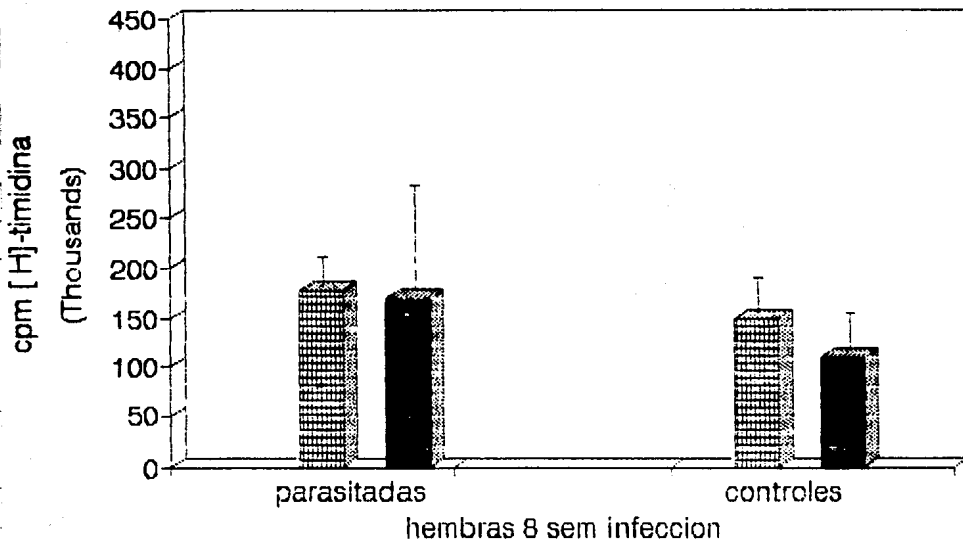


FIGURA 5b.- EFECTO DE LAS CELULAS ADHERENTES SOBRE LA RESPUESTA A CON-A *IN VITRO*. Aquí puede observarse como la eliminación de los macrófagos (células adherentes) iguala la capacidad de respuesta de los animales parasitados con los controles. Por otro lado, puede notarse que ya no hay efecto de la indometacina en este experimento.

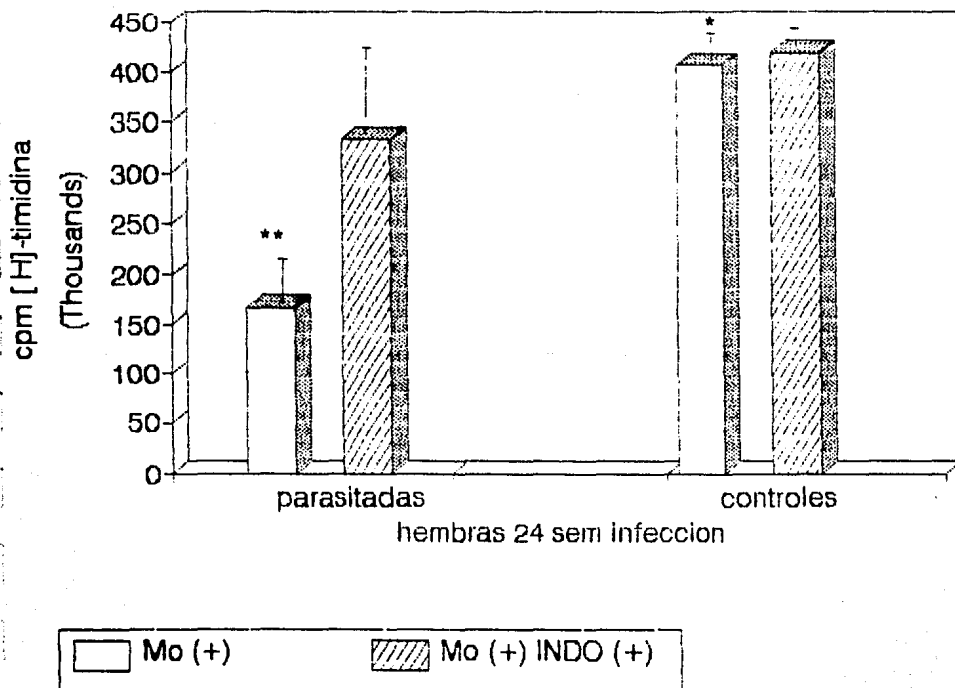


FIGURA 6a.- EFECTO DE LA INDOMETACINA SOBRE LA RESPUESTA A CON-A EN ANIMALES CON 24 SEMANAS DE INFECCION. Idem que Fig. 5a.

**** P < 0.01 con respecto a normales.**

*** P < 0.05 con respecto a parasitados sin indometacina**

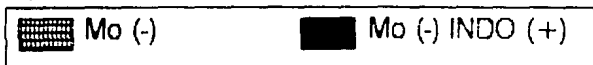
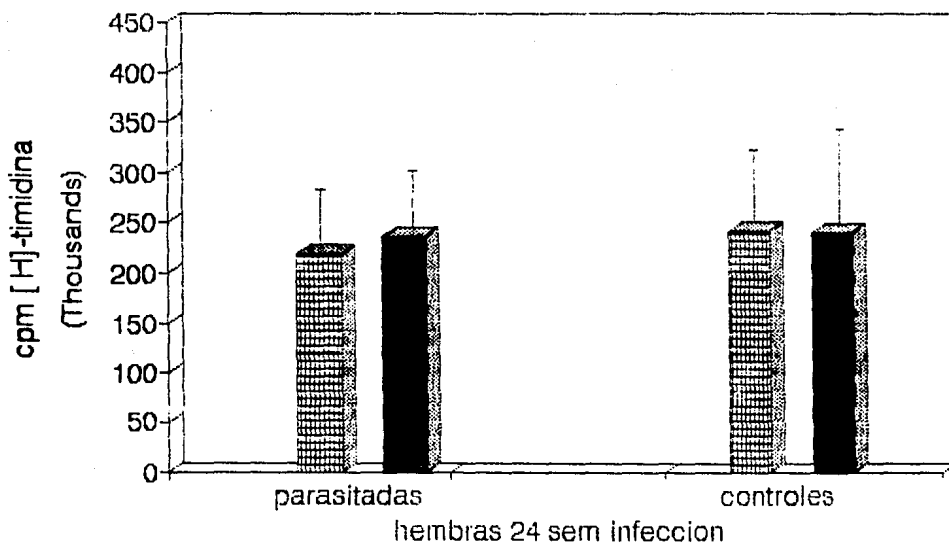


FIGURA 6b.- EFECTO DE LOS MACROFAGOS SOBRE LA RESPUESTA A CON-A IN VITRO, EN ANIMALES CON 24 SEMANAS DE INFECCION. Idem a Fig. 5b.

DISCUSSION

GENERAL

DISCUSION GENERAL

Los cambios significativos en el número de cisticercos de *Taenia crassiceps* encontrados en los ratones gonadectomizados, confirman que los factores gonadales pueden modificar la susceptibilidad del hospedero hacia el parásito, tal como ya había sido comunicado previamente por Huerta y cols. (1992, Bojalil y cols. 1992; apéndice 1). Por otro lado, el aumento de la carga parasitaria en los ratones timectomizados neonatalmente, sugiere que la presencia del timo es fundamental para mantener una respuesta antiparasitaria de tipo celular y limitar la tasa de multiplicación de los cisticercos. Este resultado se correlaciona con la observación de que en los animales timectomizados neonatalmente, la reacción de DTH específica contra los antígenos de *T. crassiceps*, se inhibió significativamente, generando un aumento en la carga parasitaria de ambos sexos. Sin embargo, el incremento fue mayor en los machos (351% vs. 75% en hembras), de manera que las diferencias de susceptibilidad entre sexos tendieron a desaparecer con la timectomía. Todo lo anterior parece indicar que el timo (que es un órgano blanco para las hormonas sexuales) debe tener una función importante en la regulación de la cisticercosis experimental murina. La proposición anterior se confirmó posteriormente cuando los experimentos se repitieron en animales que habían sido timectomizados y gonadectomizados. Los resultados encontrados en estos ratones indican que la actividad antiparasitaria dependiente del timo puede estar influida

negativamente por los estrógenos, puesto que en las hembras timentomizadas y gonadectomizadas la carga parasitaria no se modificó significativamente con respecto a sus controles. Este resultado implica, además, que el efecto de los estrógenos se da a través del sistema inmune, como lo habían sugerido antes otros trabajos de nuestro laboratorio (Huerta y cols. 1992; Bojalil y cols. 1992), en los cuales la mayor susceptibilidad de las hembras solo se apreciaba cuando éstas conservaban el sistema inmune intacto.

Si consideramos que el timo es necesario para mantener las diferencias de susceptibilidad entre sexos, y que los estrógenos pueden reducir la actividad de los linfocitos T que tienen receptores para éstas hormonas (Grossman 1985, Grossman y cols.1991) se puede explicar que las hembras presentan una modificación en la maduración de ciertas subpoblaciones de linfocitos T (Screpanti y cols. 1991, Sukabe y cols. 1990). Además de su acción sobre timo, los estrógenos pueden actuar extratímicamente, puesto que la gonadectomía aunada a la timentomía generó un decremento en la carga parasitaria en hembras con respecto a aquellas sólo timentomizadas. Sin embargo, es posible que algunas células T que pudieran haber madurado antes de la timentomía (48 h después del nacimiento) (Shimamoto y cols. 1983) hayan sido el blanco posterior de los estrógenos y conferir una menor respuesta en las hembras. Pero al no haber niveles elevados de estrógenos esta influencia negativa sobre timo y células circulantes no generó el aumento esperado en la

carga parasitaria. En los machos pudo haber sucedido lo contrario, ya que para este grupo sí hubo un incremento significativo en la carga parasitaria. Este resultado implica que los andrógenos pueden tener un efecto positivo sobre la respuesta inmune al parásito y al no estar presentes, la susceptibilidad al cisticerco aumentó en los machos.

Los datos obtenidos con los experimentos de reconstitución hormonal confirman que el estrógeno 17 β -estradiol es capaz de inhibir la resistencia al cisticerco de *T. crassiceps*, en animales de ambos sexos. En ellos se observó un aumento significativo de la carga parasitaria y una desaparición de las diferencias de susceptibilidad entre sexos. La reconstitución hormonal con 17 β -estradiol también provocó un decaimiento significativo en la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH). Sin embargo, la respuesta de anticuerpos no se modificó. Por otro lado, la reconstitución con 5 α -dihidrotestosterona fue irrelevante en la respuesta inmune al cisticerco y en el crecimiento de éste en ambos sexos.

De acuerdo a estos resultados, es razonable proponer que el 17 β -estradiol actúa como un inmunosupresor de la respuesta inmune celular en la cisticercosis experimental murina. Esto es consistente con otros estudios en los que también se ha observado que los estrógenos suprimen una serie de respuestas inmunes dependientes de células T, tanto *in vivo* como *in vitro* (Schuurs y Verheul 1990), y particularmente la DTH (Carlsten y

cols. 1989). Además, estudios recientes indican que en ciertas enfermedades, el 17 β -estradiol puede estimular la producción de anticuerpos, por un lado, y por otro puede suprimir la respuesta de tipo celular (Carlsten y cols. 1992). La observación anterior también apoya la hipótesis de que la respuesta inmune celular es importante en el control de la cisticercosis por *T. crassiceps* y que los anticuerpos no parecen generar inmunoprotección contra la misma.

Por otro lado, en apoyo a la proposición que se presenta, se puede mencionar que la actividad inmunosupresora de los estrógenos incrementa la susceptibilidad a diversas enfermedades infecciosas causadas por parásitos como por ejemplo, *Toxoplasma* (Pung y cols. 1986), *Trichomonas* (Alexander y Stimson 1988), *Plasmodium* (Benten y cols. 1992) *Trichinella* (Dean y cols. 1980); así también como por bacterias como *Listeria* (Pung y cols. 1984), *Chlamydia* (Rank y cols. 1982) y *Staphylococcus* (Toivanen 1967).

Es posible que, además del 17 β -estradiol, otras moléculas de origen neuroendócrino puedan estar involucradas en la respuesta a esta parasitosis; por ejemplo, la hormona luteinizante (LH), la cual tiene una importante actividad inmunomoduladora (Rouhabia y cols. 1988a), podría estar involucrada, ya que su producción en la hipófisis se aumenta después de la gonadectomía. Otra hormona hipofisiaria que puede participar en la inmunoregulación de esta parasitosis es la prolactina. Se conoce que los animales estrogenizados, expuestos

constantemente a estrógenos, pueden secretar niveles altos de prolactina (Frantz 1978), y se ha comunicado que la hiperprolactinemia puede inhibir la respuesta inmune celular debido que provoca una disminución en la producción de IL-2 (Vidaller y cols. 1986). Además, se conoce que la prolactina puede incrementar la respuesta de anticuerpos en algunas enfermedades autoinmunes (McMurray y cols. 1992). Para determinar el papel que pudieran tener estas hormonas en la cisticercosis experimental sería necesario realizar otros estudios.

En los experimentos sobre la cinética de respuesta inmune al cisticerco de *T. crassiceps*, la reducción substancial de la respuesta celular *in vivo* a antígenos específicos (denotada por el bajo incremento de la DTH) estuvo acompañada por una inhibición significativa en la incorporación de timidina tritiada por los linfocitos esplénicos de animales parasitados, después de su estimulación *in vitro*. Ambas respuestas mostraron sus niveles más bajos en el curso de la 3a. semana de infección. A partir de ese momento, el crecimiento parasitario se incrementó constantemente en ambos sexos hasta la 6a. semana de infección. Durante este período ambos tipos de respuestas (DTH e incorporación de timidina) fluctuaron de una manera no significativa y no recuperaron el nivel que presentaron durante las 2 primeras semanas de infección.

También es importante señalar que después de la 3a. semana de infección la respuesta humoral de anticuerpos IgG

anticisticerco mantuvo un incremento progresivo, lo cual podría implicar una modulación de la respuesta inmune dependiente de las células T de ayuda. Actualmente las células T de ayuda (Th) han sido subdivididas en 2 grupos de acuerdo a su perfil de secreción de linfocinas, así los linfocitos Th₁ producen IL-2 e IFN γ ; mientras que las interleucinas 4, 5, 6 y 10 son secretadas por Th₂ (Mossmann y Coffman 1987; Fiorentino y cols. 1989). Las reacciones de DTH dependen de los linfocitos Th₁, mientras que la respuesta de anticuerpos es dependiente de Th₂. Cabe mencionar que estos subtipos de células son mutuamente exclusivas.

Los resultados obtenidos revelan que una respuesta de DTH alta estuvo asociada a bajos niveles de anticuerpos; en cambio, cuando la respuesta de DTH disminuyó en el curso de la 3a. semana de infección, el nivel de anticuerpos se incrementó y posteriormente se mantuvo elevado, coincidiendo con el aumento en la carga parasitaria. Es posible que un fenómeno de esta naturaleza se encuentre asociado con la evolución natural de la cisticercosis experimental murina y que el mismo dependa de la actividad moduladora de los linfocitos Th. La suposición anterior se apoya en el conocimiento de que un incremento en la subpoblación de linfocitos Th₂ puede inhibir la respuesta de DTH generada por Th₁ (Street y Mossmann 1991). Teóricamente, esto podría haber sucedido al inicio de la infección y podría ser el "switch" para el disparo de la carga parasitaria, para el incremento observado en la producción de anticuerpos, los cuales no son protectores (Sciutto, 1989), y para la inhibición de las

reacciones de DTH que, probablemente, están involucradas en los mecanismos de protección contra esta parasitosis.

Desde un punto de vista hipotético, este posible cambio en la expresión de las subpoblaciones de células T_H podría tener dos causas:

- 1) Una expresión diferencial de antígenos parasitarios durante el desarrollo de la infección. Esta posibilidad se presenta porque fenómenos como éste ya han sido observados en otras parasitosis (*Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*).
- 2) Un mecanismo de inmunomodulación del propio hospedero; es decir que la hiperestimulación de macrófagos genera una mayor producción de IL-1 y prostaglandinas de la serie E (PGE_2) (Stenson y Parker 1980; Tomioka y Saito 1992). La IL-1 actuaría autócrinamente para estimular una mayor producción de PGE_2 y esta a su vez inhibiría la producción de IL-2 (Rappaport y Dodge 1982) por parte de las células T_{H1} , de tal modo que esta subpoblación quedaría sin el autoestímulo necesario para activarse suficientemente, dejando así de ejercer su función.

Hasta el momento no existen reportes en la literatura de que PGE_2 modifique la producción de IL-4. De este modo, T_{H2} podría seguir autoestimulándose y generando mayor producción de anticuerpos, y por otro lado, inhibiendo por medio de otras linfocinas, IL-10 (Fiorentino y cols.1989), la actividad de T_{H1} y por lo tanto manteniendo una DTH baja.

La explicación anterior se apoya en los resultados obtenidos con los cultivos *in vitro*, en donde se observó que las células del bazo de animales con 8 y 24 semanas de infección tenían una respuesta proliferativa al mitógeno Con A significativamente menor que la de los animales no infectados. Cuando a estos cultivos se les agregó indometacina (inhibidor de la síntesis de PGE₂) la respuesta proliferativa a Con A se normalizó en los animales parasitados, mientras que en los normales la proliferación no fue afectada.

Además, cuando las células adherentes de estos cultivos fueron eliminadas, la respuesta a Con A fue igual para ambos grupos de animales, y la indometacina ya no tuvo efecto alguno sobre la proliferación. Estos experimentos apoyan la idea de que la respuesta del propio hospedero puede generar esta supresión en la respuesta mitogénica de los linfocitos T. Las células responsables de este fenómeno parecen ser los macrófagos, los cuales son conocidos por secretar grandes cantidades de PGE₂ cuando se encuentran hiperestimulados ante un exceso de antígeno, como por ejemplo en el caso de las infecciones micobacterianas (Bullock y cols. 1978) y en algunas parasitosis como la toxoplasmosis (Susuki, 1981), la leishmaniasis (Howard y cols. 1981), la malaria (Riley y cols. 1989) y la esquistosomiasis (Olds y cols. 1984).

Otras parasitosis en las que se han reportado mecanismos de regulación inmunológica por T_{H1} y T_{H2} son aquellas producidas por

Leishmania (Scott, 1989) y *Schistosoma* (Scott y cols. 1989; Fidel y Boros 1990; Ratcliffe y Wilson 1991). En estas se ha determinado que los antígenos que estimulan TH_1 generan una respuesta inmune celular protectora (niveles altos de DTH), mientras que aquellos antígenos que estimulan a TH_2 favorecen la susceptibilidad al parásito (Scott, 1989). Posiblemente, un mecanismo de esta naturaleza podría estar involucrado en la cisticercosis experimental murina, de acuerdo con los datos que nosotros hemos obtenido.

Este último punto de vista es reforzado por los hallazgos recientes del grupo de la Dra. Sciutto, en los que se ha determinado la existencia de antígenos del cisticerco de *T. crassiceps*, de distintos pesos moleculares, que facilitan el crecimiento del parásito. Sin embargo, el mecanismo por el cual se lleva a cabo dicha facilitación es aún completamente desconocido.

Tomando en conjunto todos los resultados de este trabajo, indican que la susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps* se encuentra modulada por una serie de factores hormonales e inmunológicos. Entre estos se tienen que mencionar, primero, interacciones entre el sistema inmune y las hormonas sexuales, principalmente el 17β -estradiol, cuya acción en este modelo experimental es la de inhibir la respuesta inmune celular, generando así una mayor susceptibilidad al parásito en aquellos animales que reciben esta hormona. En segundo lugar, los factores

inmunológicos estudiados sugieren una modulación diferencial de las subpoblaciones de linfocitos TH1 y TH2, cuya producción de linfocinas pueden llegar a ser las responsables de la evolución de esta parasitosis. Por último, es necesario mencionar el posible papel supresor de los macrófagos como una consecuencia de la constante estimulación antigénica. Todo lo anterior implica que la susceptibilidad a la cisticercosis depende de una compleja red de factores generados por los sistemas inmune y neuroendócrino.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Al término de este trabajo se concluye que:

- 1) La respuesta inmune dependiente de timo es fundamental en la regulación del crecimiento parasitario.
- 2) Las diferencias de susceptibilidad asociadas al sexo son mediadas por 17β -estradiol.
- 3) El estrógeno 17β -estradiol influye negativamente en los eventos inmunológicos que participan en la protección en contra de esta parasitosis.
- 4) La respuesta inmune celular específica (DTH, *in vivo*), y policlonal (Con-A, *in vitro*), son inhibidas durante el desarrollo del cisticerco.
- 5) De acuerdo con el comportamiento de la respuesta inmune en la cinética del crecimiento parasitario, es posible que las células T_H1 y T_H2 desarrollen un papel importante en la evolución de esta parasitosis.
- 6) Productos secretados por los macrófagos (PGE), inhiben la respuesta celular *in vitro* de los animales infectados. Tal supresión es revertida al agregar indometacina al cultivo; o, al eliminar a los macrófagos del mismo.

7) Es inaplazable iniciar el estudio del papel que juegan las citocinas en la cisticercosis experimental.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Ahmed, A.S.; Penhale, W.J. and Talal, N. (1985). Sex hormones, Immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. American Journal of Pathology 121: 531-51
- Alexander J. and Stimson W.H. (1988). "Sex hormones and the course of parasitic infection". Parasitology Today 4: 189-193.
- Barnes R. (1978). "Zoología de los invertebrados". Ed. Interamericana. 3a. Ed. México, D.F.
- Benten W., Wunderlich F. and Mossmann H. (1992). "Plasmodium chabaudi: Estradiol suppresses acquiring, but not once acquired immunity". Experimental Parasitology 75: 240-247.
- Berkenbosch F., Van Oers J., Del Rey A., Tilders F. and Besedovsky H. (1987). "Corticotropin-releasing factor producing neurons in the rat activated by interleukin-1". Science. 238: 524-526.
- Besedovsky H, Del Rey A. and Sorkin E. (1985). "Immune-neuroendocrine interactions" Journal of Immunology. Vol. 132, 2: 750-754.

- Besedovsky H., Del Rey A., Sorkin E. and Dinarello C. (1986).
"Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and
glucocorticoid hormones". *Science*. 233: 652-654.
- Blalock E. and Harp E. (1981). "Interferon and
adrenocorticotrophic hormone induction of
steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity".
Archives of Virology. 67: 45-51.
- Blalock E. (1989). "A molecular basis for directional
communication between the immune and neuroendocrine
systems". *Physiological Reviews*. 59: 1-32.
- Bojalil, R.; Terrazas, L.I., Govezensky, T.; Sciutto, E. and Larralde,
C. (1992). Sex associated resistance to experimental
murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*) is mediated
by thymus through cellular mechanisms. *Journal of
Parasitology* (submitted for publication).
- Bullock, W.E., Carlson, E.M., Gershon, R.K. (1978). The evolution of
immunosuppressive cell populations in experimental
mycobacterial infection. *Journal of Immunology* 120:
1709-1716.
- Buzzetti R., McLoughlin L. Scavo D. and Rees L.H. (1989). " A
critical assessment of the interactions between the

immune system and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis". Journal of Endocrinology. 120: 183-187.

Carlsten H., Tarkowski A., Holmdahl R. and Nilsson L.A. (1990). "Oestrogen is a potent disease accelerator in SLE-prone MRL lpr/lpr mice". Clinical Experimental Immunology. 80: 467-473.

Carlsten H., Nilsson N., Jonsson R., Bäckman K., Holmdahl R. and Tarkowski A. (1992). "Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T cell mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL Ipr/Ipr mice". Cellular Immunology 144: 190-202.

Carmeliet P., Vankelecom H., Van Damme J., Billau A. and Deneef C. (1991). Release of interleukin-6 from anterior pituitary cell aggregates: developmental pattern and modulation by glucocorticoides and forskolin". Neuroendocrinology. 53: 29-34.

Cohen J., Danel L., Cordier G., Saez S. and Revillard J.P. (1983) "Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells". Journal of Immunology. Vol. 131, 6: 2767-2771.

Cross R.J., Markesbery W.R., Brooks W.H. and Roszman T.L. (1984).

"Hypothalamic-immune interaction. Neuromodulation of natural killer activity by lesioning of the anterior hypothalamus". Immunology. 51: 399-403.

Eskay R., and Eiden L. (1992). "Interleukin-1 α and Tumor necrosis factor- α differentially regulate enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin and substance P biosynthesis in chromaffin cells". Endocrinology. 130: 2252-2258.

Fiorentino D.F., Bond M.W. and Mossmann T.R. (1989). "Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones". Journal of Experimental Medicine. 170: 2080-2095.

Flisser A. (1989). "*Taenia solium* cysticercosis: some mechanisms of parasite survival in immunocompetent hosts". Acta Leidensia. 57,2: 259-263.

Frantz A.G. (1978). "Prolactin". New England Journal of Medicine. 298: 201-210.

Gorospe W., Hughes F. and Spangelo B. (1992). "Interleukin-6: Effects on and production by rat granulosa cells *in vitro*". Endocrinology. Vol. 130, 3: 1750-1752.

Gross A. and Frankenburg S. (1989). "*Plasmodium berghei*:

Immunosuppression of the cell-mediated immune response induced by nonviable antigenic preparations". *Experimental Parasitology*. 68:83-92.

Grossman C. (1985). "Interactions between the gonadal steroids and the immune system". *Science*. 227: 257-260.

Grossman C. (1991). "Sex steroid regulation of autoimmunity". *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 40: 649-659.

Gulsham R. (1990). "Oestrogen receptors in macrophages". *Scandinavian Journal of Immunology*. 31: 691-697.

Hall N.R. and Goldstein A.L. (1987). "Thymosin modulation of the immune system". In *The Neuro-Immune-Endocrine Connection*". Eds. Cotman et al. Raven Press, New York.

Honegger J., Spagnoli A., D'urso R., Navarra P., Tsagarakis S., Besser G. and Grossman A.B. (1991). "Interleukin 1- β modulates the acute release of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from rat hypothalamus *in vitro* whereas tumor necrosis factor and interleukin-6 have no effect". *Endocrinology*. 129: 1275-1281.

Howard, J.G.; Hale, C. and Liew, F.Y. (1981) Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV.

Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropicana*. *Journal of Experimental Medicine* 153: 557-568.

Hu S.K., Mitcho Y.L. and Roth N.C. (1988). "Effect of estrogen on IL-1 synthesis by macrophages". *International Journal of Immunopharmacology*.

Huerta, L.; Terrazas, L.I.; Sciutto, E. and Larralde, C. (1992). Immunological Mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Parasitology*. 78 (3): 471-76.

Koff W.C. and Dunegan M.A. (1985). "Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones". *Journal of Immunology* Vol. 135, 1: 350-354.

Kroemer G., Brezinschek H.P., Faessler R., Schauenstein K. and Wick G. (1988). "Physiology and pathology of an immunendocrine feedback loop". *Immunology Today*. Vol. 9, 6: 163-165.

Larralde C., Laclette J.P., Owen C.S., Sciutto E., Montoya R.M.,

Díaz M.L., Govezensky T., Bojalil R., and Coltorti C. (1986). "Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests". American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 35: 965-973.

Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Díaz M.L., Govezensky T., and Coltorti E. (1989). "Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients". American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 40: 282-290.

Larralde, C., Sciutto, E., Huerta, L.; Terrazas, I.; Fragoso, G.; Trueba, L.; Lemus, D.; Lomelí, C.; Tapia, G.; Montoya R.M., Díaz M.L., and Govezensky T. (1989). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. Acta Leidensia. 57 (2): 131-34.

Larralde C., Sotelo J., Montoya R.M., Palencia G., Padilla A., Govezensky T. Díaz M.L. and Sciutto E. (1990). "Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*". Archives of Pathology and

- Larralde C., Padilla C., Hernández M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia R., Salvatierra B, and Sepúlveda J. (1992). "Seroepidemiología de la cisticercosis humana en México". *Salud Pública de México*. 34: 197-210.
- Luebke R.W., Luster M.I., Dean J.H. and Hayes H.T. (1984). "Altered host resistance to *Trichinella spiralis* infection following subchronic exposure to diethylstilbestrol". *International Journal of Immunopharmacology*. 6: 609-618.
- McMurray R., Keisler D., Kanuckel K., Izui S. and Walker S. (1991). "Prolactin influences autoimmune disease activity in the female B/W mouse". *Journal of Immunology*. 147: 3780-3787.
- Milencovik L., Rettori V., Sydner G.D., Beutler B. and McCann S. (1989). "Cachectin alters anterior pituitary hormone release by a direct action *in vitro*". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 86: 2418-2422.
- Mossmann T.R. and Coffman R.L. (1987). "Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation". *Immunology Today*. 8: 223-227.

- Ohmichi M., Hirota K., Koike K., Kurachi H., Ohtsuka S., Matsuzaki N., Yamaguchi M., Miyake A. and Tanizawa O. (1992). "Binding sites for interleukin-6 in the anterior pituitary gland". *Neuroendocrinology*. 55: 199-203.
- Olds, G.R. and Ellner, J.J. (1984). Modulation of macrophage activation and resistance by suppressor T lymphocytes in chronic murine *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology* 133: 2720-24.
- Ottaway C.A. (1987). "Selective effects of vasoactive intestinal peptide on the mitogenic response of murine T cells". *Immunology*. 62: 291-297.
- Paavonen T., Andersson L. and Adlercreutz H. (1981). "Sex hormone regulation of *in vitro* immune response". *Journal Experimental Medical*. 154: 1935-1945.
- Payan D., McGillis J. and Goetzl E. (1986). "Neuroimmunology". *Advances in Immunology*. 39: 299-323.
- Provinciali N. and Fabris N. (1991). "Models and mechanisms of neuroendocrine-immune interactions during ontogeny". *Advances in Neuroimmunology*. 1: 124-138.
- Polan H. (1988). "Gonadal steroids modulate human monocyte IL-1

activity". *Fertility and Sterility*. 49: 964-968.

Pung O., Luster M., Hayes H. and Rader J. (1984). "Influence of steroidal and nonsteroidal sex hormones on host resistance in mice: increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* after exposure to estrogenic hormones". *Infection and Immunity*. Vol. 46, 2: 301-307.

Pung O. and Luster M. (1986). "*Toxoplasma gondii*: Decreased resistance to infection in mice due to estrogen". *Experimental Parasitology* 61: 48-56.

Ramos-Kuri M., Montoya R.M., Padilla A., Govezensky T., Díaz M.L., Sciutto E., Sotelo J. and Larralde C. (1992). "Immunodiagnosis of neurocysticercosis. Disappointing performance of serology (ELISA) in an Unbiased sample of neurological patients". *Archives of Neurology*. 49: 633-636.

Ratcliffe, E.C. and Wilson, R.A. (1991). The magnitude and kinetics of delayed type hypersensitivity responses in mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 103: 65-75.

Rettori V., Jurcovicova J. and McCann S.M. (1987). Central action of interleukin-1 in altering the release of TSH, growth hormone and prolactin in the male rat". *Journal*

Rocklin R.E. Brown A.P. and Warren K.S. (1980). Factors that modify the cellular-immune response in patients infected by *Schistosoma mansoni*. Journal of Immunology 125: 1916-23.

Roitt I., (1988). Essential Immunology. Blackwell Scientific publications. Oxford, England.

Rouabhia M., Ghanmi Z. and Deschaux P.A. (1988a). "Interaction between luteotrophic hormona (LH) and thymosin on natural killer cell activity in BALB/c mice". Immunology. 65: 125-128.

Rouabhia M., Chakir J., Othmane O. and Deschaux P.A. (1988b). "Relationship between immune and neuroendocrine systems: synergic effect of luteotrphic hormone and thymosin fraction V on surface antigens Thy 1.2, Lyt1, Lyt2) expression". Thymus.

Schuurs A. and Verheul H, (1990). "Effects of gender and sex steroids on the immune response". Journal of Steroid Biochemistry. 35: 157-172.

Sciutto E. (1989). "Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de

los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *T. solium*". Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. México, D.F.

Sciutto, E.; Fragoso, G.; Trueba, L.; Lemus, D.; Montoya, R.M.; Díaz, M.L.; Govezensky, T.; Lomeli, C. and Larralde, C. (1990). Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687-96.

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

Scott P. (1989). The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous Leishmaniasis". *Experimental Parasitology*. 68: 369-372.

Scott P., Pearce E., Cheever A.W., Coffman R.L. and Sher A. (1989). "Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease". *Immunological Reviews*. 112: 161-182.

Street N.E. and Mossman T.R. (1991). "Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns". *FASEB Journal*. 5: 171-176.

Suzuki, Y.; Watanabe, N. and Kobayashi, A. (1981a). Nonspecific suppression of initiation of memory cells in *Toxoplasma gondii*-infected mice. *Infection and Immunity* 40: 1-7.

Suzuki, Y. and Kobayashi, A. (1981b) Suppression of unprimed T and B cell in antibody responses by irradiation-resistant and plastic adherent suppressor cells in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Infection and Immunity* 34: 36-42.

Sztein M.B., Washington R. and Kierszenbaum (1990). "*Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes". *Journal of Immunology* 144: 3558-3562.

Tabibzadeh S., Santhanam U., Sehgal P., and May L. (1989). "Cytokine-induced production of IFN- β /IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells. Modulation by estradiol-17 β ". *Journal of Immunology*. 142: 3134-3139.

Terrazas L.I. (1989). "Efecto de la gonadectomía en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*". Tesis de

- Tomioka H. and Saito H. (1992). "Characterization of immunosuppressive functions of murine peritoneal macrophages induced with various agents. Journal of Leukocyte Biology. 51: 24-31.
- Turk J.L. (1980). Delayed hypersensitivity. Research Monographs in Immunology 1. 3rd. Edn. Amsterdam, Elsevier.
- Vidaller A., Llorente L., Larrea F., Méndez J.P., Alcocer-Varela J. and Alarcón -Segovia D. (1986). "T-cell dysregulation in patients with hyperprolactinemia: Effect of bromocriptine treatment". Clinical Immunology and Immunopathology. 38: 337-340.
- Weigent D. and Blalock E. (1987). "Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors". Immunological Reviews. 100: 79-108.
- Weinsten Y., Ran S. and Segal S. (1984). "Sex associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse". Journal of Immunology. Vol. 132, 2: 656-661.

A P E N D I C E I

ARTICULOS PUBLICADOS EN LOS QUE SE PARTICIPO COMO COAUTOR

A P E N D I C E I I

LA FUNCION DUAL DEL TIMO

INTRODUCCION

Actualmente se ha aceptado que el sistema inmune, aunque es regulado por una gran cantidad de eventos celulares y humorales intrínsecos, es sensible a señales generadas fuera de la red inmunológica, como las provenientes del sistema neuroendócrino. Lo anterior es apoyado por dos líneas experimentales: 1) las alteraciones espontáneas o inducidas en el sistema neuroendócrino pueden causar modificaciones funcionales en la respuesta inmune (Ejem. estrés, Blalock y cols. 1985, 1987; niveles altos o bajos de hormonas sexuales, Grossman 1985, y Grossman y cols. 1991) y 2) la presencia de receptores para hormonas peptídicas de origen neuroendócrino (β endorfinas, prolactina, FSH, LH, GH) en las membranas de células linfoides (Buzzetti y cols. 1989). Por otro lado, el sistema neuroendócrino no solo puede actuar como un modulador del sistema inmune, sino que también puede ser blanco de las señales generadas por el aparato inmune (Blalock, 1989; Ohmichi y cols. 1992). Ejemplos de tales interacciones son las alteraciones que pueden ser inducidas en el balance neuroendócrino por la extirpación de órganos linfoides relevantes, como el timo (Rebar y cols 1980), o por el funcionamiento mismo del sistema inmune ante la presencia de distintas dosis de antígenos, o bien por enfermedades infecciosas (Blalock y Harp 1981; Berkenbosh, 1987).

Un órgano clave en esta comunicación bidireccional es el timo, el cual tiene dos funciones fundamentales. La primera

relaciona al timo exclusivamente con el sistema inmune (maduración de linfocitos T, deleción de clonas de linfocitos T autorreactivas), y la segunda relaciona al timo con la homeostasis del sistema neuroendócrino.

1) EL TIMO COMO ORGANO INMUNOLOGICO.

El timo es un órgano fundamental para el desarrollo óptimo del sistema inmune en los vertebrados. Se encuentra localizado en la porción superior del mediastino, atrás del esternón. Su función inmunológica primordial es la de llevar a cabo la maduración de linfocitos T, la cual depende de factores anatómicos, hormonales y de interacciones celulares intratímicas.

El microambiente tímico es un tejido complejo y especializado. Su complejidad se debe a que el timo se origina de tres fuentes embrionarias distintas: endodermo del tercer saco faríngeo, ectodermo del tercer grupo branquial y células estromales del mesénquima derivadas del mesodermo embrionario (Auerbach, 1960, 1961; Corrier y Haumont, 1980). El endodermo faríngeo y el ectodermo branquial dan lugar a los componentes epiteliales, mientras que las células derivadas del mesénquima forman la cápsula tímica, los vasos sanguíneos y el septum interlobular.

Esta variedad de células da origen a distintos compartimentos anatómicos : 1) Corteza subcapsular; 2) Corteza interna; 3) Médula; 4) Cápsula fibrosa y septum interlobular. Cada una de estas regiones tiene distintas funciones en la maduración de los timocitos. En general, los timocitos maduran

durante su migración de la corteza hacia la médula pasando por varios estadios de desarrollo (von Boehmer, 1988).

Las células precursoras hematopoyéticas provenientes de la médula ósea entran al timo por la corteza subcapsular, aquí inician su maduración. Las células epiteliales de esta región estimulan la mitosis de los timocitos (Mandel 1969, 1970), esta es la zona con mayor actividad mitótica en el timo, ya que los timocitos proliferan rápidamente (6-9 h/ciclo). Por otro lado, se ha demostrado que en esta región existen hormonas tímicas que no se han detectado en otros sitios del timo (Goldstein y cols. 1981; Haynes, 1984), y cuya función aún no esta claramente dilucidada, pero parecen estimular la proliferación de estos timocitos, así como inducir en ellos la expresión de receptores para IL-1 e IL-2 (Bach y Papiernik 1981; Hadden y cols. 1992).

La corteza externa se caracteriza por la presencia de linfocitos pequeños no proliferativos, que se encuentran intercalados con grandes células interdigitantes, cuya función es la de expresar moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con las cuales entran en contacto los timocitos. La maduración de los linfocitos T se define por la expresión del receptor de las células T (TCR), el heterodímero $\alpha\beta$ ó $\gamma\delta$, así como los llamados co-receptores CD₄ y CD₈ (von Boehmer, 1988). En esta zona del timo la mayoría de los timocitos no expresan CD₄ ni CD₈ (doble negativos), son aún inmunoincompetentes y más del 95% mueren *in situ* (Scollay y cols. 1980), por lo que únicamente la minoría de estos timocitos corticales doble negativos migran lentamente hacia la médula

tímica (Cantor y Weissman 1976; Sprent, 1988). En este momento los timocitos inmaduros pueden diferenciarse en timocitos intermedios que expresan CD4+ y CD8+ y algunas de éstas células llegan a desarrollarse en timocitos maduros expresando únicamente uno de sus co-receptores, finalizando entonces como CD4-8+ ó CD4+8-, este último proceso se lleva a cabo en la médula tímica.

La médula tímica contiene más células epiteliales que timocitos. En esta zona los timocitos son inmunocompetentes y expresan una alta densidad de moléculas del MHC, así como de su receptor, principalmente el dímero α/β . Es también en esta región donde los linfocitos T adquieren su fenotipo maduro, ya sea CD4+ o CD8+, así como su especificidad restringida para MHC. Es aquí donde se selecciona el repertorio de células T que habrán de colonizar los órganos linfoides periféricos, a través de complejos mecanismos de interacciones entre células epiteliales tímicas que expresan distintas moléculas de MHC a las cuales son confrontados los linfocitos T. Debido a que la maduración de los linfocitos T no es el tema central de este apéndice sólo se menciona muy someramente este fenómeno. Actualmente existen datos experimentales sólidos que implican que el mecanismo de maduración de los linfocitos T puede generarse por una señal específica dada por la unión del TCR $\alpha\beta$ expresado en timocitos inmaduros (CD4+8+) a moléculas del MHC ya sean clase I ó II. Este contacto da una "instrucción" a la célula para desarrollarse posteriormente en CD8+ o CD4+, respectivamente. Es decir, si la célula T inmadura (CD4+CD8+) se une a través de su receptor $\alpha\beta$ y su co-receptor CD8 a una molécula del MHC clase I, entonces da

una instrucción a la célula para "apagar" la expresión del gene para el co-receptor CD4 (Borgulya y cols. 1991; Wujcicich y cols. 1992), generandose así un linaje de células T CD4-CD8+.

Por otro lado, existe en el timo otro fenómeno no menos complejo e importante que la maduración de los linfocitos T; el mecanismo de autotolerancia, cuya función primordial es la eliminación de clonas de células T potencialmente auto-reativas. Actualmente se han descrito dos mecanismos de selección de las células T que emigrarán del timo hacia el interior del organismo: 1) Selección negativa: aquellos linfocitos que reaccionen con MHC propio serán eliminados por ser auto-reativos y posibles generadores de enfermedades autoinmunes (Klein y Nagy 1982; Kronenberg 1991); 2) Selección positiva: aquellos linfocitos que sean exportados del timo requieren tener algún grado de especificidad de unión a las regiones polimórficas de las moléculas del MHC expresadas en el timo; las células T con esta especificidad son seleccionadas para sobrevivir, mientras las otras células T morirán *in situ* (Zinkernagel y Doherty 1979; Möller 1978, Sprent y cols. 1988).

Al final de estos procesos los linfocitos T salen del timo ya con un fenotipo maduro y una función específica CD4+ (ayudadoras) o CD8+ (citotóxicas) . Estas células son capaces de colonizar el tejido linfoide periférico, y así llevar a cabo la vigilancia inmunológica.

2) EL TIMO COMO ORGANO ENDOCRINO.

Desde hace algunas décadas se conoce que el timo produce varios péptidos que pueden localizarse tanto intratímicamente como en la circulación sanguínea (Goldstein y cols. 1966; Hooper y cols. 1975; Haritos y cols. 1984); estos péptidos son conocidos como hormonas tímicas y son producidas por el epitelio tímico.

El primer paso en el aislamiento de una hormona tímica fue hecho por el grupo de Goldstein (1966); sin embargo, fué hasta 1975, cuando Hooper pudo purificar parcialmente un grupo de péptidos a los que llamó Fracción 5 de timosina (TF5), obtenida a partir de timo de ternera. Posteriormente algunos de los péptidos de TF5 fueron purificados y secuenciados. Los más conocidos son timosina $\alpha 1$ (T $\alpha 1$) y timosina $\beta 4$ (T $\beta 4$); la primera es altamente ácida y consiste de 28 aminoácidos (aa), la segunda consiste de 43 aa, ambas han sido consideradas como hormonas tímicas y los niveles en suero humano son de 500 a 1000 pg/ml para T $\alpha 1$, y 300 a 1000 mg/ml para T $\beta 4$.

Las propiedades inmunológicas de TF5 son numerosas (Goldstein y cols. 1981), entre las más destacadas se encuentran: incrementa la sobrevivencia en ratones neonatalmente timectomizados; acelera el rechazo de injertos de piel; incrementa la producción de anticuerpos; aumenta la respuesta en el cultivo mixto de linfocitos y la respuesta a concanavalina A cuando los animales son tratados *in vivo* con TF5; en macrófagos, aumenta la producción de citocinas; finalmente, Zats y colaboradores en 1984, demostraron que TF5 puede incrementar la producción de IL-2 *in vitro* en linfocitos humanos. Su acción

intratímica parece ser la de coadyuvar a la maduración de los linfocitos de una manera secundaria, aunque existen datos en la literatura que no apoyan esto (Andrews y cols. 1985). Recientemente se ha reportado que TF5 puede reestablecer la población de células T maduras en ratones viejos tratados con hidrocortisona. Sin embargo, este reestablecimiento de la competencia inmunológica sólo se obtiene cuando TF5 es administrada conjuntamente con una mezcla de linfocinas (Hadden y cols. 1992).

Por otro lado, los péptidos purificados T α 1 y T β 4 también tienen propiedades inmunopotenciadoras. Además, T β 4 parece actuar en estadios tempranos del desarrollo de las células T (Rebar y cols. 1981).

La localización intratímica de estas hormonas se ha llevado a cabo principalmente con heteroantisueros dirigidos contra distintos factores derivados del timo. Así, se ha determinado que T α 1 y timopoyetina (otro péptido derivado de TF5) parecen ser producidas por células del epitelio tímico de dos regiones, en la corteza subcapsular y en la médula. T β 4 se encuentra únicamente en la región epitelial de la corteza subcapsular (Haynes, 1984).

Además de las propiedades inmunológicas de las hormonas tímicas, distintos estudios indican que algunas de ellas pueden actuar sobre circuitos neuroendócrinos.

Las primeras observaciones de que el timo podía afectar otros órganos fueron hechas entre los años 60's y 70's, pero mejor dilucidadas en los 80's. Los ratones congénitamente atímicos presentan varias alteraciones a nivel ovárico y

reproductivo, como son retardo en la apertura vaginal y primera ovulación, su fertilidad es reducida y presentan atresia folicular (Besedovsky y Sorokin 1977). Con la timestomía neonatal se presentan las mismas irregularidades.

Sin embargo, hasta ese momento no se conocían las bases hormonales de los defectos reproductivos en estos animales. Fueron Rebar y sus colaboradores en 1981 quienes realizaron el primer estudio hormonal en ratones hembras BALB/c atímicos, demostrando que presentaban bajos niveles circulantes de FSH y LH y por consiguiente una reducida producción de andrógenos y estrógenos en los animales adultos. A pesar de esto, no dilucidaron el posible mecanismo de acción del timo sobre la función reproductiva.

Las primeras evidencias directas de una relación causa-efecto entre hormonas tímicas y función neuroendócrina se establecieron con experimentos *in vitro*, en los cuales Spangelo (1985) determinó que TF5 estimulaba la secreción de prolactina y de la hormona liberadora de gonadotropinas por células de la hipófisis anterior. Poco después, cultivos de hipotálamo-hipófisis se pusieron en contacto con TF5. Lo que se observó fue una liberación elevada de hormona luteinizante (LH). Pero cuando el hipotálamo se removió, TF5 ya no tuvo efecto sobre la liberación de LH. Lo que sugirió que TF5 actuaba sobre el hipotálamo estimulando la secreción de la hormona liberadora de LH (Hall y Goldstein 1987). Posteriormente, se comprobó que el péptido biológicamente activo en esta situación era T β ; el cual modulaba la liberación de LHRH con el consiguiente incremento en

la producción de LH, hormona responsable de la esteroidogénesis en las glándulas sexuales. Así se explicaba el bajo nivel de hormonas sexuales en animales atímicos o neonatalmente timectomizados.

Por otro lado, se ha demostrado que la $T_{\alpha 1}$ también puede participar en las interacciones entre timo-sistema nervioso, ya que es capaz de generar un aumento en la producción de corticosterona. Tal acción no es directa sobre células de las glándulas suprarrenales, lo que implica su acción a nivel del SNC (Vahouny y cols. 1983). Además, la inyección intravenosa *in vivo* de TF5 elevó los niveles de ACTH, β -endorfinas, cortisol y corticosterona, tanto en monos como en roedores (Hall y Goldstein 1987). La acción de TF5 a nivel neuroendócrino se confirmó cuando TF5 fue agregada a cultivos de células suprarrenales y no se registró liberación de glucocorticoides (Vahouny y cols. 1983).

Otras hormonas tímicas que han sido bien caracterizadas son: timulina (antes factor tímico sérico) es un nonapéptido que requiere zinc para llevar a cabo su actividad biológica (Dardenne y cols. 1984); timopoyetina (49 aa) y el factor tímico humoral γ_2 , todos estos péptidos son derivados de TF5, pero en ellos no se ha encontrado actividad sobre el sistema neuroendócrino.

3) EL TIMO COMO ORGANO BLANCO.

La glándula tímica no solo puede influir con sus productos hormonales a otras glándulas del organismo para que estas modifiquen su patrón de secreción, sino que también puede ser blanco de las hormonas producidas por otros órganos y así estos

últimas pueden modificar la función del timo, cerrándose un circuito hasta el momento poco conocido.

La primera observación de que el timo podía ser afectado por otros órganos la hizo Calzolari (Grossman, 1985), al observar que el timo de conejos castrados antes de la pubertad era mayor que el de los controles. A pesar de que esta observación tiene un siglo, solo hasta recientemente ha tomado auge el estudio de los factores que pueden modular al timo, tanto a nivel de la maduración de linfocitos T, como en la producción de hormonas tímicas. El timo es blanco para una serie de hormonas tanto esteroides como peptídicas, la acción de estas es variada y afecta distintas funciones del timo.

TIROIDES.- Las hormonas tiroideas tienen un efecto positivo sobre la producción de timulina, ya que, cuando los niveles de hormonas tiroideas son bajos o bien se inhibe la producción de tiroxina y triiodotironina, la síntesis de timulina disminuye, al mismo tiempo las células productoras de timulina en el timo decrecen (Savino y cols. 1984). Por otro lado, en ratones tiroidectomizados la timulina en suero se reduce y en animales viejos tratados con tiroxina los niveles séricos de timulina regresan a su nivel normal (Fabris y Moncchegiani 1985). La acción de las hormonas tiroideas en el timo parece ser sobre las células epiteliales tímicas productoras de timulina, ya que las hormonas de la tiroides incrementan el número de este tipo de células. Sin embargo, los receptores para estas hormonas no han sido detectados en el epitelio tímico.

SUPRARRENALES.- Los glucocorticoides son las hormonas

esteroideas más conocidas que influyen en el timo, modificando su peso y celularidad. Su acción más importante es la inducción de muerte celular en timocitos inmaduros (Claman 1972), de tal modo que la extirpación de éstas glándulas incrementa el peso tímico en ratones. Por otro lado, existen datos que indican que la extirpación de las glándulas suprarrenales puede inhibir la producción de timulina de una manera indirecta y transitoria, implicando a las hormonas suprarrenales como moduladoras de la función tímica (Dardenne y cols. 1986).

GONADAS.- Los esteroides sexuales pueden modificar la función del timo de dos maneras: afectando su producción de hormonas tímicas por las células epiteliales, y actuando en la maduración de las subpoblaciones de linfocitos T.

Actualmente es bien conocido que el timo sufre un involución después de la pubertad, tiempo en el que los niveles de hormonas sexuales se incrementan de manera importante, tanto en roedores como en humanos. De modo que, en la vida adulta el timo casi ha desaparecido. Estas observaciones guiaron a la búsqueda de receptores para diferentes hormonas sexuales sobre el epitelio tímico. Una serie de trabajos han demostrado la presencia de receptores citosólicos para estrógenos (Grossman y cols. 1979, Grossman, 1985, Grossman y cols. 1991), para andrógenos (Grossman y cols. 1979, Grossman, 1985) y progesterona (Pearce y cols. 1983) en timo completo, pero no en timocitos disociados. Esto implica que los receptores para estas hormonas se encuentran en las células reticuloepiteliales del timo. Sin embargo, Kovacs y Olsen (1987) han demostrado que la presencia de receptores

androgénicos no está restringida al componente epitelial del timo, sino que también se encuentran en los timocitos.

Los estrógenos pueden modificar la producción de hormonas tímicas, principalmente de timulina, así también como alterar la maduración de las subpoblaciones de linfocitos T, preferentemente la ayudadora (Sakabe y cols. 1990). Por otro lado, los estrógenos modifican la expresión del receptor α/β en timocitos CD4-CD8-, lo cual puede estar relacionado con ciertas enfermedades autoinmunes (Screpanti y cols. 1991).

La gonadectomía tanto en machos como en hembras provoca un incremento significativo en el peso del timo (Fitzpatrick y cols. 1991), así como alteraciones en las subpoblaciones de timocitos principalmente en células doble negativas y doble positivas. La gonadectomía en machos puede generar un mayor número de células CD8+ (Fitzpatrick y cols. 1991).

HIPOFISIS.- Las hormonas de origen hipofisiario tienen un papel relevante en la respuesta inmune, la acción de estas hormonas es principalmente sobre células maduras circulantes. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la prolactina (PRL) actúa sobre las células epiteliales tímicas, tanto humanas como murinas, generando una producción óptima de timulina. Por otro lado, la administración de bromocriptina (inhibidor de la síntesis de PRL) en ratones suprime la secreción de timulina (Dardenne y cols. 1989)

Como puede apreciarse en este apéndice, el timo tiene una doble función en el organismo: no solo tiene que aportar un número constante de linfocitos T maduros para mantener un buen

sistema inmune, sino que además debe producir una serie de péptidos cuya función primordial parece ser la de mantener un nivel constante de hormonas gonadotróficas, lo que implica su importancia reproductiva además de inmunológica. Sin embargo, el timo no escapa del control neuroendócrino pues es blanco de varias hormonas que modulan su funcionamiento, cerrándose así una comunicación bidireccional.

BIBLIOGRAFIA

- Auerbach R. (1960). Development Biology. 2: 271-279.
- Auerbach R. (1961). Development Biology. 3: 336-343.
- Bach J.F. and Papiernik M. (1981). Ciba Found Symposium. 4:
215-219.
- Baxevanis C.N., Thanos D., Reclos G., Anastopoulos E., Tsokos G.,
Papamatheakis J. and Papamichail M. (1992).
"Prothymosin α enhances human and murine MHC class
II surface antigen expression and messenger RNA
accumulation". Journal of Immunology. 148: 1979-1984.
- Besedovsky H.O. and Sorkin E. (1977). "Network of
immune-neuroendocrine interactions". Clinical
Experimental Immunology. 27: 1-8.
- Berkenbosch F, Van Oers J., Del Rey A., Tilders F and Besedovsky
H. (1987). Corticotropin-releasing factor-producing
neurons in the rat activated by interleukin-1". Science
238: 524-526.
- Blalock E. and Harp E. (1981). "Interferon and
adrenocorticotropic hormone induction of
steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity".

Blalock E., Harbour-McMenamim D. and Smith E.M. (1985). "Peptide hormones shared by neuroendocrine and immunologic systems". Journal of Immunology. 135: 858-863.

Blalock E. (1989). "A molecular basis for directional communication between the immune and neuroendocrine systems". Physiological Reviews. 69: 1-32.

Borgulya P., Kishi H., Müller U., Kirberg J. and von Boehmer H. (1991). "Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection". EMBO Journal 10 (4): 913-918.

Burstein V., Buchner V., Pecht M. and Trainin N. (1988). "Thymic humoral factor γ_2 ; purification and amino acid sequence of an immunoregulatory peptide from calf thymus". Biochemistry. 27: 4066-4071.

Butcher E. and Weissman I. (1989). "Lymphoid tissues and organs". pp. 109-128. In Fundamental Immunology ed. Paul W.E. Raven Press, New York.

Buzzetti R., McLoughlin L., Scavo D. and Rees L.H. (1989). "A critical assessment of the interactions between the immune system and the hypothalamic-pituitary-adrenal

axis". Journal of Endocrinology. 120: 183-187.

Cantor H. and Weissman I.L. (1976). Progress in Allergy. 20: 1-12.

Catanzano T.D., Ardail D. and Deschaux P.A. (1992). "Testosterone inhibits the immunostimulant effect of thymosin fraction 5 on secondary immune response in mice". International Journal of Immunopharmacology. 14: 263-268.

Claman H.N. (1972). "Corticosteroids and lymphoid cells". New England Journal Medicine. 287: 388-395.

Corrier A.C., and Haumont S.J. (1980). American Journal of Anatomy. 157: 227-234.

Dardenne M., Savino W., Duval D., Kaiserlian D., Hassid J. and Bach J.F. (1986). "Thymic hormone-containing cells VII. Adrenals and gonads control the *in vivo* secretion of thymulin and its plasmatic inhibitors". Journal of Immunology. 63: 1303-1308.

Dardenne M., Savino W., Gagnerault M., Itoh T. and Bach J.F. (1989). "Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates *in vivo* and *in vitro* the production of thymulin by human and murine

thymic epithelial cells". Endocrinology. 125: 3-10.

Deschaux P. and Rouabhia M. (1987). "The thymus. Key organ between endocrinologic and immunologic systems". Annals of the New York Academy of Sciences. 496: 49-55.

Fabris N. and Moncchegiani E. (1985). "Endocrine control of thymic serum factor production in young adult and old mice". Cellular Immunology. 91: 325-331.

Fitzpatrick F., Lepault F., Homo-delarche F., Bach J.F. and Dardenne M. (1991). "Influence of castration alone or combined with thymectomy, on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse". Endocrinology 129 (3): 1382-1390.

Goldstein A.L., Slater F. and White A. (1966). "Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin)". Proceedings of National Academy of Sciences. 56: 1010-1018.

Goldstein A.L., Low L., Thurman G., Zats M.M., Hall N., Chen J., Hu S., Naylor P.H. and McClure J.E. (1981). "Current status of thymosin and other hormones of the thymus gland". Recent Progress in Hormone Research. 37: 369-377.

Greenstein B.D., Fitzpatrick F., Adcock M. Kendall M.D. and Wheeler M.J. (1986). "Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: inhibition of regeneration by testosterone". Journal of Endocrinology. 110: 417-422.

Greenstein B.D. (1987). "Regeneration of Thymus in old male rats treated with a stable analogue of LHRH". Journal of Endocrinology. 112: 345-350.

Grossman C.J., Nathan P., Taylor B. and Sholiton L. (1979). "Rat thymic dihydrotestosterone receptor: preparation, localization and physical properties". Steroids. 34: 539-553.

Grossman C.J. (1985). "Interactions between the gonadal steroids and the immune system". Science. 227: 257-262.

Grossman C.J. (1991). "Sex steroid regulation of autoimmunity". Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 40: 649-659.

Hadden E.M., Malec P., Sosa M. and Hadden J.W. (1992). "Mixed interleukins and thymosin fraction V synergistically induce T lymphocyte development in hydrocortisone treated aged mice". Cellular Immunology 144: 228-236.

Hall N.R. and Goldstein A.L. (1987). "Thymosin modulation of the

immune system". In The Neuro-Immune-Endocrine connection. Ed. Cotman et al.. Raven Press New York.

Haritos A., Goodall G. and Horecker B. (1984). "Prothymosin α : isolation and properties of the major immunoreactive form of thymosin $\alpha 1$ in rat thymus". Proceedings of National Academy of Sciences. 81: 1008-1014.

Haynes B.F. (1984). "The human thymic microenvironment". Advances in Immunology 36: 87-142.

Hooper J.A., McDaniel M., Thurman G., Cohen R., Schulof S. and Goldstein A.L. (1975). "Purification and properties of bovine thymosin". Annals of the New York Academy of Sciences. 249: 125-133.

Husmann L., Shimonkevitz R., Crispe N. and Bevan M. (1988). "Thymocyte subpopulations during early fetal development in the BALB/c mouse". Journal of Immunology 141 (3): 736-740.

Kishi H., Borgulya P., Scott B., Karjalainen K., Traunecker A., Kaufman J. and von Boehmer H. (1991). "Surface expression of the β T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD3 proteins on immature T cells". EMBO Journal. 10 (1): 93-100.

- Klein J. and Nagy Z.A. (1982). "MHC restriction and Ir genes".
Advances in Cancer Research. 37: 234-244.
- Kovacs W.J. and Olsen N.J. (1987). "Androgen receptors in human
thymocytes". Journal of Immunology. 139: 490-493.
- Mandell T. (1969). Journal of Experimental Biology Medicine
Sciences. 47: 153-160.
- Möller G. (1978). Immunological Reviews. 42: 1-27.
- Ohmichi M., Hirota K., Koike K., Kurachi H., Ohtsuka S.,
Matsuzaki N., Yamaguchi M., Miyake A. and Tanizawa O.
(1992). "Binding sites for interleukin-6 in the
anterior pituitary gland". Neuroendocrinology. 55:
199-203.
- Pearce P., Khalid A. and Funder J. (1983). "Progesterone
receptors in rat thymus". Endocrinology. 113:
1287-1292.
- Rebar R., Morandini C. Erickson G. and Petze J. (1981). "The
hormonal basis of reproductive defects in athymic mice:
diminished gonadotropin concentrations in prepubertal
females". Endocrinology. 108 (1): 120-126.
- Rebar R., Miyake A, Low T.L.K. and Goldstein A.L. (1981).

"Thymosin stimulates secretion of LHRH". Science 214:
669-671.

Sakabe K., Kawashima I., Seiki K. and Fuji J. (1990).
Tokai-Journal Experimental Clinical Medicine. 15:
213-218.

Savino W. and Dardenne M. (1984). "Thymic hormone containing
cells: VI. Immunohistologic evidence for the
simultaneous presence of thymulin, thymopoietin and
thymosin α_1 in normal and pathological human thymuses".
European Journal of Immunology. 14: 987-991.

Scollay R., Jacobs S., Jerabek L., Butcher E. and Weissman I.L.
(1980). "Thymus cell migration: Quantitative aspects of
cellular traffic from the thymus to the periphery in
mice". Eur. Journal of Immunology. 10: 210-217.

Screpanti I., Meco D., Morrone S., Gulino A., Bonnie J. and Frati
L. (1991). "Effects of estrogen on the expression of
different T cell receptor V β gene families in CD4- CD8-
thymocytes". Cellular Immunology. 134: 414-426.

Spangelo B.L. (1987). "Thymosine Factor 5 stimulates prolactin
and GHr from anterior pituitary cells *in vitro*".
Endocrinology. 121: 2035-2043.

- Spangelo B.L., Hall N.R. and Goldstein A.L. (1987). "Biology and chemistry of thymosin peptides". Annals of the New York Academy of Sciences. 496: 196-204.
- Sprent J., Lo D., Kai E., and Ron Y. (1988). "T cell selection in the thymus". Immunological Reviews. 101: 173-190.
- Vahouny G.V., Kyeyune-Nyombi E., McGillis J.P., Tare N.S., Huang K.Y., Tambes R, Goldstein A.L. and Hall N.R. (1982). "Thymosin peptides and lymphokines do not directly stimulate adrenal corticosteroid production *in vitro*". Journal of Immunology. 30: 791-794.
- von Boehmer H. (1988). "The developmental biology of T lymphocytes". Annual Reviews Immunology. 6: 309-326.
- Weissman I.L. (1986). "Nursing the Thymus". Laboratory Investigation. 55: 1-4.
- Wujciech S., Dessing M., Baron A., Kisielov P. and von Boehmer H. (1992). "Phenotypic changes accompanying positive selection of CD4+ CD8+ thymocytes". Eur. Journal of Immunology. 22: 2367-2372.
- Zats M.M., Oliver J., Samuels C., Skotnicki A.B., Sztejn M.B. and Goldstein A.L. (1984). Thymosin increases production of T cell growth factor by normal peripheral blood

lymphocytes". Proc. Nat. Acad. Sci. 81:2882-2885.

Zats M.M. and Goldstein A.L. (1985). "Mechanism of action of thymosin. I. Thymic factor 5 increases lymphokine production by mature T cells responding in a mixed lymphocytes reaction". Journal of Immunology. 134:1032-1038.

Zinkernagel R.M. and Doherty P.C. (1979). "MHC-restricted cytotoxic T cells: Studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function and responsiveness". Advances in Immunology. 27: 51-59.