

37
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO in vitro DE LA RESPUESTA
INMUNE CELULAR EN LA CISTICERCOSIS
EXPERIMENTAL MURINA POR
Taenia crassiceps
(VARIEDAD ORF)

TESIS MANCOMUNADA
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA
B I O L O G A
P R E S E N T A N :
VERA DE LA CRUZ BALTAZAR
LORENA LEMUS RIVERA



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	PAG.
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- OBJETIVO.....	9
3.- MATERIALES Y METODOS.....	10
4.- RESULTADOS.....	31
5.- DISCUSION.....	40
6.- APENDICE I.....	50
7.- APENDICE II.....	85
8.- APENDICE III.....	92
9.- BIBLIOGRAFIA.....	101

INTRODUCCION

INTRODUCCION

La cisticercosis es una parasitosis que afecta la salud humana y la economía de la porcicultura en México (Aluja, A. et al. 1986). Es una enfermedad causada por el establecimiento de las formas larvarias de *Taenia solium* en los tejidos de sus huéspedes intermediarios, el cerdo y el hombre.

Taenia solium es un helminto cuya reproducción sexual se lleva a cabo en el hombre (huésped definitivo) y su estadio larvario, el cisticerco, se aloja preferentemente en tejido muscular y cerebral, tanto del hombre como del cerdo (huéspedes intermediarios). La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevecillos de *Taenia solium* excretados en las heces de los portadores del parásito adulto, que después eclosionan en el intestino. Los embriones liberados (oncósferas) penetran a la mucosa intestinal y los que logran llegar al sistema circulatorio se distribuyen a sitios extraentéricos donde se desarrollan hasta metacéstodos (cisticercos).

En el hombre, los cisticercos se localizan principalmente en el Sistema Nervioso Central (neurocisticercosis), y también en músculo esquelético, tejido subcutáneo y corazón. (Tabla 1).

La cisticercosis puede presentarse de una manera sintomática o asintomática, sus manifestaciones clínicas dependen del número y de la localización de los cisticercos así como de la extensión y severidad de la respuesta inflamatoria que el huésped establece ante la presencia del parásito. Como las alteraciones histopatológicas son tan variables en tipo y severidad y la localización topográfica es muy dispersa, los signos y síntomas causados son rara vez diagnósticos, excepto cuando la cisticercosis es cutánea, subcutánea u ocular, casos en que el parásito es fácilmente identificable en la exploración.

El tiempo entre la infección inicial y la aparición de los síntomas es también muy variable y puede ser de algunos meses o de años (Aluja, A. et al 1986).

LOCALIZACION DEL PARASITO EN 2188 CASOS DE
CISTICERCOSIS EN LATINO AMERICA

	N U M E R O	%
Encéfalo	1719	78.6
Columna vertebral	72	3.3
Ojos y anexos	368	16.8
Tejido subcutáneo	159	7.3
Músculo	79	3.6
Corazón	31	1.4
Otros	124	5.7
Generalizado	23	1.1

*Tomado de Flisser, A., et al., Cysticercosis, Present State of Knowledge and Perspectives, New York 1982.

Tabla 1.

Actualmente se cuenta con algunos fármacos que destruyen al cisticerco con los que se han logrado buenos resultados. Figuran entre ellos el Praziquantel y el Albendazol (Aluja, A. et al. 1986).

Esta enfermedad se encuentra predominantemente en zonas en la que se practica la porciculturá rústica, el fecalismo al aire libre, existe hacinamiento en la vivienda, la inspección sanitaria es insuficiente y hay insalubridad ambiental y conductual. Las anteriores son características que se presentan principalmente en países subdesarrollados, por lo que las zonas más afectadas se encuentran en Asia, Africa y América Latina. En México, es un padecimiento frecuente, siendo las regiones centro occidental y sureste las zonas de mayor seroprevalencia.

Como se señaló anteriormente, la porcicultura constituye un factor determinante en la prevalencia de la cisticercosis. El cerdo desempeña un importante papel como huésped intermediario en el ciclo teniasis-cisticercosis por *T. solium*. Cuando el hombre ingiere carne infectada con cisticercos, el

metacéstodo se transforma en una tenia o solitaria, con lo que constituye una reserva potencial de la cisticercosis humana y porcina. La crianza de cerdos en libertad provoca que éstos consuman excretas humanas o alimentos contaminados con los huevecillos de la tenia, lo que ocasiona el desarrollo posterior de los cisticercos en el animal. Esta posibilidad no es factible en áreas donde la porcicultura es altamente tecnificada y la inspección sanitaria es rigurosa con mecanismos de comercialización controlados. Naturalmente, el ciclo de la enfermedad se interrumpe en poblaciones que no consumen carne de cerdo por razones religiosas, culturales o geográficas.

Las manifestaciones clínicas de la cisticercosis en el cerdo no han sido bien estudiadas y generalmente pasan inadvertidas, sin embargo, se han referido casos graves en los que los cerdos presentan disnea, marcha vacilante y caquexia. Cuando los cisticercos se localizan en el encéfalo, pueden causar algunos disturbios neurológicos funcionales como agresividad, somnolencia, indiferencia y otros.

De acuerdo al Código Sanitario, las canales afectadas por cisticercosis deben ser decomisadas. Numerosos estudios demuestran la elevada frecuencia de decomiso de canales de cerdo en México, las que al ser sometidas a incineración pierden el 81% de su valor económico y cuando son enviadas a fritura, el 56% (Aluja, A. et al. 1986).

Considerando la frecuencia de la cisticercosis en nuestro medio, sus consecuencias en la salud humana y las pérdidas económicas que ocasiona en la porcicultura, su estudio resulta de interés práctico además del interés biológico implícito.

Para llevar a cabo el estudio de la relación huésped-parásito en este padecimiento se ha considerado el uso de un modelo experimental, con el fin de orientar la investigación inmunológica en el humano y en el cerdo, en los que el acceso a información sistemática y controlada se dificulta. Así, en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento de factores biológicos involucrados en la relación entre cisticerco y hospedero utilizando el modelo experimental murino de *T. crassiceps*. Este modelo ofrece varias características que hacen atractivo su uso y entre ellas figuran, la capacidad

del parásito para reproducirse asexualmente por gemaciones exógenas en su estadio larvario, propiedad que ha permitido mantenerlo fácilmente en ratones de laboratorio por pases intraperitoneales sucesivos (Freeman, R.S., 1962), además, ya que casi exclusivamente, infecta a cánidos como gusano adulto, y a roedores en su forma larvaria (Freeman, R.S., 1962); [aún cuando se ha reportado un solo caso de infección en el hombre (Freeman, R.S., 1973)], se puede considerar que no ofrece ningún daño potencial para el humano. Finalmente, un aspecto muy importante, es que al estudiar la composición antigénica del cisticerco de *T. crassiceps* (Larralde, C. et. al. 1989), se ha encontrado que existe antigenicidad cruzada entre el metacéstodo de *T. crassiceps* y el de *T. solium*, y que los antígenos que comparten pueden ser importantes tanto para su uso diagnóstico como en la vacunación.

La susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* está fuertemente asociada a genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Los últimos resultados obtenidos en el estudio del determinismo genético de la susceptibilidad sugieren que la proteína Qa2 del

MHC así como el haplotipo de las proteínas de histocompatibilidad están involucradas en la resistencia o susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina. Los ratones (Qa2⁺) y de haplotipo D^b parecen ser resistentes, mientras que en los ratones Qa2⁻ no se ha logrado dilucidar que genes participan y es probable que sean varios, no pudiendo aún descartar la participación de genes localizados fuera del MHC.

Estudios de la respuesta inmune humoral en ratones susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (BALB/B) sugieren que ésta no participa al menos de una manera directa en la susceptibilidad a la cisticercosis murina.

OBJETIVO

OBJETIVO

Considerando la asociación que existe entre la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps* y los genes H-2 y que los productos de estos genes median interacciones celulares que determinan eventos complejos de la respuesta inmune celular, decidimos estudiar esta respuesta en ratones genéticamente susceptibles y resistentes antes y durante la infección.

MATERIALES
Y
METODOS

MATERIALES Y METODOS

1. Material biológico y soluciones empleados

1.1. Obtención de los parásitos

En la realización del presente trabajo se emplearon cisticercos de *Taenia crassiceps* variedad ORF, obtenidos a partir de ratones hembras de la cepa BALB/c infectados en la cavidad peritoneal a las 4-5 semanas de edad.

Para la obtención de los parásitos se realizó el siguiente procedimiento:

-Sacrificio de los ratones por dislocación cervical aproximadamente a los 60 días después de la infección.

-Extracción de los cisticercos contenidos en la cavidad peritoneal.

-Lavado de la cavidad peritoneal con solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

1.2. Obtención de antígeno

El antígeno empleado fue el líquido vesicular del cisticerco, el cual se obtuvo como a continuación se indica:

-Se lavaron los cisticercos con PBS para eliminar al máximo las proteínas murinas adheridas a su superficie.

-Se suspendieron en una mínima cantidad de PBS y se centrifugaron a 30 000 g 60 minutos.

-Se determinó la concentración de proteínas en el líquido vesicular del cisticerco por el método de Lowry.

-El antígeno se esterilizó por filtración.

1.3. Determinación de proteínas por el método de Lowry

-Reactivos:

Solución A: 50 ml de NaCO_3 al 2% en NaOH 0.1N (P/V).

0.5 ml de tartrato de sodio al 2% (P/V).

0.5 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1%.

Solución B: Reactivo de Folin-cicalteu (dil 1:2 V/V).

Solución estándar de albúmina.

El método es confiable en un rango de 20 a 200 $\mu\text{g/ml}$.

-Método:

Curva patrón:

Tubo	albúmina $100\mu\text{g/ml}$	H ₂ O destilada	Sol.A	Sol.B
1	1.0 ml	0.0 ml	3 ml	0.3
2	0.8	0.2	3	0.3
3	0.6	0.4	3	0.3
4	0.4	0.6	3	0.3
5	0.2	0.8	3	0.3
Blanco	0.0	1.0	3	0.3

Al añadir la solución A se agita fuertemente y se espera 10 minutos.

Después se agrega la solución B se agita fuertemente y se espera de 30 a 120 minutos.

Las soluciones problema se tratan de manera similar a las de la curva patrón.

Se lee espectrofotométricamente a 500 o 750 nm.

1.4. Ratones utilizados

Se emplearon ratones de las cepas B10 (H-2b), B10.D2 (H-2d), hembras y machos, BALB/cByJ y BALB/cAnN (H-2d, Qa2⁻) hembras mayores a las 4 semanas de edad, proporcionados por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

1.4.a. Inoculación

Los cisticercos seleccionados para la inoculación fueron aquellos con un diámetro aproximado de 1 a 1.5 mm y que no presentaban gemaciones. Los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos suspendidos en aproximadamente 0.5 ml de PBS.

2. Proliferación linfocitaria

2.1. Soluciones.

2.1.a. Preparación de Concanavalina A:

La Concanavalina A (Con A) fue uno de los mitógenos empleados para evaluar la proliferación linfocitaria, su preparación se efectuó de la siguiente manera:

-Se pesaron 40 mg de Con A tipo IV (Sigma).

-Se disolvieron en 2 ml de NaCl 6.1M.

-Se dejó reposar 18 horas a 4°C.

-Se separó el sobrenadante.

-Se esterilizó por filtración.

-Su concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría, considerando que una densidad óptica de 1.5 corresponde a 1 mg/ml.

2.1.b. Amortiguador de fosfatos (PBS).

Fosfato de sodio dibásico.....1.22 g

Fosfato de sodio monobásico0.39 g

Cloruro de sodio7.40 g

Ajustar a ph 7.2 y aforar a 1 litro.

2.1.c. PBS-Tween 0.05%

PBS1 litro
Tween0.50 g

2.1.d. PBS albúmina 1 % (PBS-BSA 1%)

PBS.....1 litro
Albúmina10 g

2.1.e. Solución salina isotónica (SSI)

Cloruro de sodio8.5 g
Aforar a un litro.

2.1.f. Solución hemolizante

-KHCO₃0.01 M
-NH₄Cl0.155M
-EDTA0.1 mM

La solución anterior se esterilizó en autoclave.

2.1.g. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue RPMI-1640 el cual se prepara y se esteriliza por filtración 24 horas antes de ser utilizado y cada 100 ml se complementan con:

-Suero fetal bovino	10 ml
-Piruvato de sodio	1 ml
-Aminoácidos no esenciales.....	1 ml
-Penicilina/Estreptomina.....	1 ml
-L-glutamina (220mM).....	0.1ml
-NaHCO ₃	2 g/l

El RPMI 1640 es un medio que fue desarrollado específicamente para el cultivo de linfocitos, su composición es excelente para los linfocitos de la mayoría de las especies y también para el cultivo de otro tipo de células. El componente mas lábil de este medio es la L-glutamina, por ello es recomendable añadirla poco antes de que el medio sea utilizado. La penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 µg/ml) previenen el desarrollo de bacterias contaminantes del medio y la estimulación linfocitaria que causan es mínima. El bicarbonato de sodio es empleado como amortiguador de pH.

2.1.h. Líquido de centelleo

- PPO.....4 g.
- POPOP.....0.4g.
- Tolueno.....1l.

2.2. Técnica

-Sacrificar al ratón en estudio por dislocación cervical.

-Sumergir al ratón en alcohol al 70% o en benzal y extraerle el bazo en condiciones de esterilidad en la campana de flujo laminar.

-Obtener las células esplénicas mediante perfusión recibiendo en RPMI completo.

-Dejar sedimentar durante 20 minutos para eliminar partículas de tejido.

-Separar el sobrenadante y centrifugarlo a 200 g durante 5 a 10 minutos.

-Al paquete celular agregarle 2 o 3 ml de solución hemolizante y dejar actuar durante 3 minutos a 4°C con agitación suave.

-Agregar 5 volúmenes de RPMI.

-Centrifugar 10 minutos a 200 g, descartar el sobrenadante.

-Resuspender el paquete celular en 5 ml de RPMI suplementado.

-Realizar una dilución final de 1:100 de las células con RPMI (sin suero fetal bovino). Emplear azul tripano al 2% para determinar viabilidad y contar los linfocitos no teñidos en una cámara de Neubauer.

-Ajustar la concentración de las células a 5.5×10^5 /100 μ l/pozo.

-Añadir 100 μ l del mitógeno o del antígeno a cada pozo por triplicado.

-Incubar la placa a 37°C con humedad a saturación y 5 % de CO₂.

-Después de 48 horas de cultivo, . agregar 1 μ Ci/pozo de timidina tritiada (³H-Tdr) en un volumen no excedente de 25 μ l.

-Cosechar las células 18 horas después sobre papel de fibra de vidrio mediante un cosechador automático.

-Medir la incorporación de marca radioactiva en viales con 5 ml de líquido de centelleo en un contador de centelleo β .

La adición de timidina tritiada proporciona un nucleótido que puede ser incorporado en la síntesis de DNA. En los cultivos no existe otra fuente significativa de timidina, la cantidad añadida equivale a la cantidad disponible, por ello se debe añadir una cantidad suficiente de timidina, ya que en el caso contrario la cantidad de timidina tritiada reflejaría no sólo la síntesis de DNA sino también la disponibilidad del precursor. Esto no significa, que se pueda añadir el nucleótido tritiado en forma indiscriminada ya que una elevada actividad específica puede matar a las células en división. Al usar la timidina tritiada para medir la síntesis de DNA la actividad específica debe ser tan baja como sea posible para minimizar el daño radiológico en las células que la incorporen.

3. Cisticercosis experimental murina.

3.1. Determinación de la susceptibilidad

Con la finalidad de determinar cuales cepas de ratones son susceptibles y cuales resistentes se infectaron en la cavidad peritoneal con 10 parásitos ratones BALB/cByJ, BALB/cAnN, B10 y B10.D2 y su carga parasitaria fue medida después de 5 y 30 días de infección.

3.2. Cuantificación de la carga parasitaria

Se sacrificaron los ratones, se extrajeron los parásitos de la cavidad peritoneal y se contaron en una caja petri con ayuda de una jeringa.

4. Proliferación linfocitaria en ratones susceptibles y resistentes a la cisticercosis usando diferentes concentraciones de Con A

Este experimento se realizó con 12 ratones hembras y 4 ratones machos de la cepa B10; un ratón hembra y 3 ratones machos de la cepa B10.D2; 2 ratones hembras de la cepa BALB/cByJ y 2 ratones hembras de la cepa BALB/cAnN. Cada uno de los ratones

se estudió por separado. Se probaron las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Con A para los ratones hembras de la cepa B10 y 0.1, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ para los ratones restantes. En cada caso se emplearon como control células incubadas con RPMI (sin Con A) para comprobar que el medio de cultivo no inducía activación.

5. Determinación de la activación linfocitaria inducida por Con A en ratones con diferentes tiempos de infección.

Ratones B10 hembras no infectados y con 1, 5, 12 y 30 días de infección fueron sacrificados y sus linfocitos esplénicos se emplearon en los ensayos de proliferación linfocitaria. Se utilizaron las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Con A.

Para cada tiempo de infección se utilizaron 5 ratones infectados y tres no infectados.

Se decidió estudiar a las cepas restantes empleando ratones no infectados y con cinco y treinta días de infección y añadir la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de Con A.

Para los ratones B10 machos se usó un ratón no infectado como control para cada tiempo de infección, dos ratones con uno y cinco días de infección y tres ratones con 12 y treinta días de infección.

En el estudio de la cepa B10.D2 se utilizaron un ratón no infectado y tres con cinco y treinta días de infección en el caso de las hembras y en el caso de los machos se usaron un ratón no infectado y dos con cinco días de infección y dos no infectados y tres con treinta días de infección.

Las cepas BALB/cAnN y BALB/cByJ se estudiaron empleando un ratón no infectado para cada tiempo de infección y tres ratones con cinco y treinta días de infección.

6. Determinación de la dosis óptima de antígeno para la inducción de la proliferación linfocitaria en ratones susceptibles y resistentes a la cisticercosis.

7. Determinación de la activación linfocitaria inducida por el antígeno vesicular del cisticerco en ratones con diferentes tiempos de infección.

Para la realización de estos experimentos se emplearon los mismos grupos de ratones utilizados para estudiar el efecto de Con A. Las concentraciones de antígeno usadas fueron 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$, excepto para los ratones machos B10 y B10.D2 en los que se utilizó a 0.01, 1, y 10 $\mu\text{g/ml}$.

8. Estudio del efecto de la infección o de la inmunización con antígenos de Taenia crassiceps sobre la proliferación linfocitaria.

Con el objeto de estudiar si algún proceso relacionado con la infección y/o con la inmunización influye en el grado de proliferación, se emplearon 5 ratones B10.D2 machos inmunizados con 100 μg de antígeno soluble de cisticerco en 500 μl de SSI y 5 ratones B10.D2 machos infectados en la cavidad peritoneal con 10 cisticercos cada uno. Cinco días después del tratamiento se sacrificaron los ratones y se obtuvieron sus células esplénicas.

Para evaluar la proliferación linfocitaria se empleó como agente estimulante Con A a 0.1, 1, 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

9. Efecto in vitro de los antígenos parasitarios sobre la proliferación linfocitaria.

Para evaluar la posibilidad de que los antígenos del cisticerco tuvieran alguna capacidad de disminuir la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos, se añadieron diferentes concentraciones de antígeno soluble de cisticerco (0.01, 0.1 y 10 $\mu\text{g/ml}$) a células obtenidas de tres ratones B10 machos no infectados y previamente estimulados con la dosis óptima de Con A (1 $\mu\text{g/ml}$). La adición de antígeno se realizó simultáneamente y a las 3 y 17 horas después de haber agregado la Con A. Se emplearon como control linfocitos incubados en presencia de Con A, pero sin antígeno.

10. Estudio del efecto de la vacunación y de la primoinfección en el establecimiento y desarrollo de la infección.

Para observar si hay alguna relación entre el nivel de proliferación linfocitaria y el establecimiento y desarrollo de los cisticercos, se realizó el siguiente experimento:

-Cinco ratones B10 machos fueron infectados en la cavidad peritoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps*.

-Seis ratones B10 machos fueron vacunados con antígeno total de cisticercos de *T. crassiceps* (empleando $Al(OH)_3$ como adyuvante).

-Seis ratones B10 machos se emplearon como control, por lo que al inicio no se les dio ningún tratamiento.

-Cinco días después de empezado el experimento a cada uno de los 5 ratones infectados al día cero se les inocularon en la cavidad peritoneal 10 cisticercos y a los doce ratones restantes se les inocularon 20.

-Treinta días después de esta última inoculación, se contó el número de parásitos existentes en la cavidad peritoneal.

11. Estudio de los mecanismos relacionados con el estado de supresión.

-Evaluación del efecto *in vitro* de la adición de interleucina 2 sobre la proliferación linfocitaria.

En un intento por dilucidar el mecanismo responsable de la falta de respuesta proliferativa observada en los ratones infectados, se decidió adicionar IL-2 a cultivos de linfocitos de ratones no infectados e infectados. Tres ratones B10 hembras no infectados y tres con cinco días de infección se sacrificaron y se obtuvieron sus células esplénicas. Unas células se cultivaron solo con medio de cultivo y con 0.1, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de Con A, mientras que a otras, además se les añadió un 20 % del sobrenadante de células sobreproductoras de IL-2.

12. Cuantificación de los anticuerpos anti DNPBSA. producidos por ratones parasitados con cisticercos de Taenia crassiceps.

Con la finalidad de conocer si la falta de respuesta observada en los ratones infectados eran solo ante antígeno del cisticerco de *Taenia crassiceps* o era generalizada, se decidió inocular DNP-albúmina (DNPBSA) a ratones infectados y cuantificar la cantidad de anticuerpos producidos contra este antígeno.

Se emplearon ratones B10 machos, 5 como grupo problema, tres como control positivo y uno como control negativo. A los ratones problema se les inocularon 10 parásitos por ratón, y a los cinco días se les administró 10 μg de DNPBSA y adyuvante completo de Freund (1:1). Los ratones del grupo control positivo no se parasitaron, solo fueron inoculados con 10 μg de DNPBSA y adyuvante completo de Freund y el control negativo no recibió tratamiento. Quince días después, los ratones fueron anestesiados, sangrados por el plexo retro-orbital y sacrificados. Se obtuvieron los sueros (por centrifugación 10 minutos a 500 g), se hizo un pool

con los sueros de los grupos de ratones y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Los anticuerpos formados se cuantificaron por medio de un método inmunoenzimático.

Ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Se emplearon placas de microtitulación de Inmulon de fondo en U siguiendo el siguiente procedimiento:

-Sensibilizar los pozos añadiendo $100\ \mu\text{l}$ de DNPBSA purificada a una concentración de $10\ \mu\text{g/ml}$ en Tris HCl 0.01M pH 7.5.

-Incubar a 37°C 2 horas y toda la noche a 4°C . Lavar 4 veces con PBS Tween al 0.05% para eliminar las proteínas no adheridas.

-Bloquear la placa adicionando $100\ \mu\text{l}$ de BSA purificada al 1 % en PBS. Incubar 1 hora a 37°C y lavar 4 veces con PBS Tween al 0.05%

-Incubar cada pozo con $100\ \mu\text{l}$ de los sueros problema (se emplearon diluciones 1:50, 1:100 y 1:500 en PBS Tween por sextuplicado) 2 horas a 37°C . Lavar 4 veces con PBS Tween al 0.05%.

-Añadir a cada pozo 100 μ l de IgG-Fosfatasa alcalina humana en dilución 1:500 (en PBS Tween) incubar 90 minutos a 37°C. Lavar 4 veces con PBS Tween al 0.05%.

-Adicionar a cada pozo 100 μ l de sustrato (1mg/ml de p-nitrofenilfosfato diluido en dietanol amina). Incubar a 37°C de 30 minutos a 1 hora.

-Detener la reacción adicionando 50 μ l de NaOH 2N.

-Leer la absorbancia a 405 nm en el lector de ELISA Behering.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Proliferación linfocitaria en ratones susceptibles y resistentes a la cisticercosis usando diferentes concentraciones de Con A.

Se eligieron las siguientes concentraciones de Con A para realizar los ensayos de proliferación linfocitaria en las diferentes cepas y sexos (Fig. 1 y 2).

CEPA	SEXO	Con A $\mu\text{g/ml}$
BALB/cByJ	Hembras	10
BALB/cAnN	Hembras	10
B10.D2	Hembras	10
B10.D2	Machos	5
B10	Hembras	1
B10	Machos	1

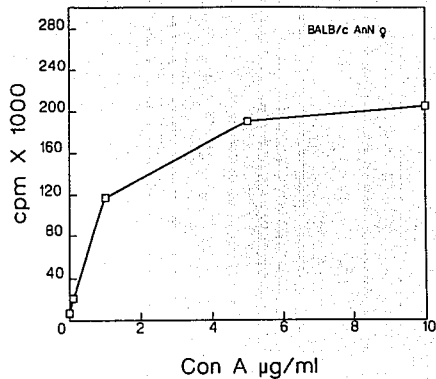
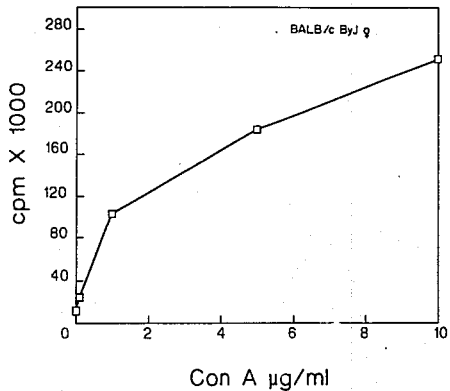


Figura 1. Estimulación de células esplénicas de diferentes cepas de ratones por diferentes concentraciones de Con A.

a. Ratones BALB/cByJ hembras.

b. Ratones BALB/cAnN hembras

Se seleccionó la dosis de Con A de 10 $\mu\text{g/ml}$.

RATONES BALB/cByJ HEMBRAS

RATONES NO INFECTADOS	CONCANAVALINA A ug/ml				
	0	0.1	1	5	10
PROMEDIO	12095	24327	102905	183801	251086
DESVIACION ESTANDAR	8337	18909	98576	80471	155489

RATONES BALB/cAnN HEMBRAS

RATONES NO INFECTADOS	CONCANAVALINA A ug/ml				
	0	0.1	1	5	10
PROMEDIO	8018	20536	116377	189613	205377
DESVIACION ESTANDAR	3879	8228	104033	110285	143497

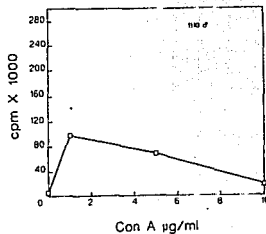
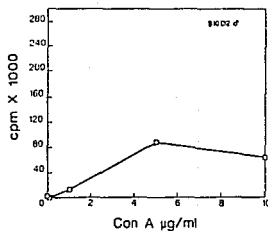
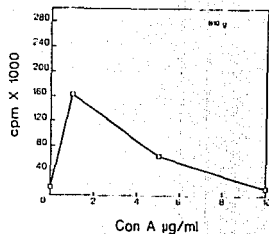
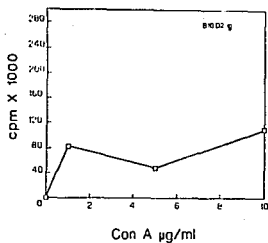


Figura 2. Estimulación de células esplénicas de diferentes cepas de ratones por diferentes concentraciones de Con A. a. Ratones B10.D2 hembras. b. Ratones B10 hembras. c. Ratones B10.D2 machos. d. Ratones B10 machos.

Se seleccionó las dosis de Con A de 10 $\mu\text{g/ml}$ para los ratones B10.D2 hembras, 1 $\mu\text{g/ml}$ para los B10 hembras, 5 $\mu\text{g/ml}$ para los B10.D2 machos y 1 $\mu\text{g/ml}$ para los B10 machos.

RATONES B10.D2 HEMBRAS

RATONES NO INFECTADOS	CONCANAVALINA A ug/ml			
	0	1	5	10
PROMEDIO	1144	83141	48576	109682

RATONES B10.D2 MACHOS

RATONES NO INFECTADOS	CONCANAVALINA A ug/ml				
	0	0.1	1	5	10
PROMEDIO	2194	249	13121	87635	64794
DEBVIACION ESTANDAR	1748	31	11877	16889	48034

RATONES B10 HEMBRAS

RATONES NO INFECTADOS	CONCANAVALINA A ug/ml			
	0	1	5	10
PROMEDIO	14453	162878	63482	12478
DEBVIACION ESTANDAR	11058	81167	34881	7496

RATONES B10 MACHOS

RATONES NO INFECTADOS	CONCANAVALINA A ug/ml			
	0	1	5	10
PROMEDIO	6009	97880	88891	19624
DEBVIACION ESTANDAR	4571	65769	9927	13843

2. Determinación de la activación linfocitaria inducida por Con A en ratones con diferentes tiempos de infección.

2.1. Resultados obtenidos en ratones BALB/cByJ (resistentes) y BALB/cAnN (susceptibles).

La infección de ratones BALB/cByJ y BALB/cAnN con cisticercos de *T. crassiceps* indujo disminución en la capacidad proliferativa frente a la estimulación *in vitro* con Con A de los linfocitos de bazo de estos ratones.

Esta inhibición de la respuesta a Con A presentó un máximo a los cinco días de infección, obteniendo en este tiempo porcentajes de estimulación similares para ambas cepas que oscilaron entre un 40 % para la cepa resistente y 56 % para la cepa susceptible respecto al máximo de estimulación obtenido en ratones no infectados (Fig.3 y 4).

A los 30 días de infección la cepa susceptible mostró una clara tendencia a la recuperación de la respuesta proliferativa con un 92 % de estimulación mientras la cepa resistente mantuvo niveles similares de inhibición (Fig. 4).

ESTUDIO CINETICO DE LA PROLIFERACION
LINFOCITARIA EN RATONES NATURALMENTE
SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES, SANOS E INFECTADOS
CON CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*

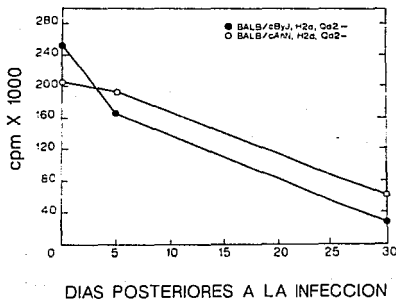


Figura 3. ● cpm incorporados por células esplénicas de BALB/cByJ
○ cpm incorporados por células esplénicas de BALB/cAnN

RATONES BALB/cByJ HEMBRAS

CON A	DIAS POSTERIORES A LA INFECCION		
10 ug/ml	0	5	30
PROMEDIO	251086	167592	27453
DESVIACION ESTANDAR	155489	42028	11628

RATONES BALB/cAnn HEMBRAS

CON A	DIAS PORSTERIORES A LA INFECCION		
10 ug/ml	0	5	30
PROMEDIO	205377	192693	62805
DESVIACION ESTANDAR	143497	21662	12244

cpm. obtenidas

ESTUDIO CINETICO DE LA PROLIFERACION
LINFOCITARIA EN RATONES NATURALMENTE
SUSCEPTIBLES Y RESISTENTES, SANOS E INFECTADOS
CON CISTICERCOS DE *Taenia crassiceps*

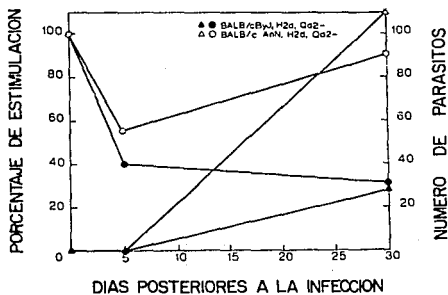


Figura 4. ● Porcentaje de estimulación de las células esplénicas de BALB/cByJ. ○ Porcentaje de estimulación de las células esplénicas de BALB/cAnN. ▲ Δ Número promedio de cisticercos recuperados de ratones con 5 y 30 días de infección.

A los 5 días de infección no se observaron formas parasitarias macroscópicas en la cavidad peritoneal.

La baja respuesta proliferativa observada al día 5 de infección podría estar asociada a la instalación de formas parasitarias microscópicas con capacidad de reproducirse en la cavidad peritoneal. Sin embargo, este estado de supresión también se observa en la cepa resistente (30 días), y es sólo ésta la que logra controlar el crecimiento parasitario (Fig. 4). Esta observación sugiere que si bien la disminución de la respuesta proliferativa observada en el día 5 de infección podría ser relevante en la fase de instalación del parásito en el huésped, una vez instalados los parásitos, su crecimiento estaría relacionado con otros fenómenos que permitan la proliferación más controlada en el hospedero resistente que en el susceptible.

2.2. Resultados obtenidos utilizando ratones B10.D2 (H-2d) y B10 (H-2b).

En ambas cepas se observó una disminución en la respuesta proliferativa de linfocitos esplénicos frente a Con A, obteniéndose la menor respuesta proliferativa a los cinco días de infección. A los 30 días las dos cepas presentaron una tendencia a la recuperación (Fig. 5 y 6).

Se trabajó con ratones hembras y machos B10.D2 y B10 encontrándose lo siguiente:

Para la cepa B10.D2 .-

a) La tendencia a la recuperación a los 30 días de la respuesta proliferativa es mayor en machos (48%) que en hembras (15%).

b) Tanto en hembras como en machos no se observaron macroscópicamente parásitos en la cavidad peritoneal a los cinco días de infección.

A los 30 días las hembras presentaron un promedio de 1.6 parásitos, en tanto que en los machos no se presentó ningún parásito (Fig 6).

ESTUDIO CINETICO DE LA PROLIFERACION LINFOCITARIA EN RATONES
NATURALMENTE RESISTENTES, SANOS E INFECTADOS CON CISTICERCOS
DE *Taenia crassiceps*

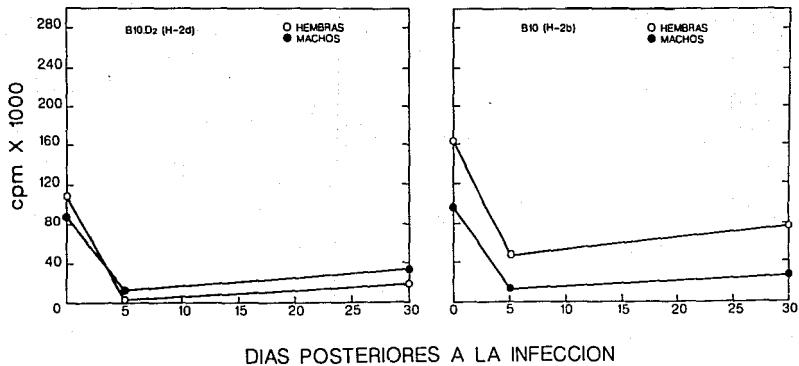


Figura 5. \circ \bullet cpm incorporadas por células esplénicas de ratones B10.D2 y B10 sanos y a los 5 y 30 días después de la infección con 10 cisticercos por ratón.

RATONES B10.D2 HEMBRAS

CON A	DÍAS POSTERIORES A LA INFECCION		
10 ug/ml	0	5	30
PROMEDIO	109682	1806	19160
DESVIACION ESTANDAR		1229	11408

RATONES B10.D2 MACHOS

CON A	DÍAS POSTERIORES A LA INFECCION		
5 ug/ml	0	5	30
PROMEDIO	87835	12291	33038
DESVIACION ESTANDAR	16889	7607	14050

RATONES B10 HEMBRAS

CON A	DÍAS POSTERIORES A LA INFECCION		
1 ug/ml	0	5	30
PROMEDIO	182676	44659	75709
DESVIACION ESTANDAR	61167	16065	23424

RATONES B10 MACHOS

CON A	DÍAS POSTERIORES A LA INFECCION		
1 ug/ml	0	5	30
PROMEDIO	97880	12929	26617
DESVIACION ESTANDAR	65769	1363	3754

ESTUDIO CINETICO DE LA PROLIFERACION LINFOCITARIA EN RATONES
 NATURALMENTE RESISTENTES, SANOS E INFECTADOS CON CISTICERCOS
 DE *Taenia crassiceps*

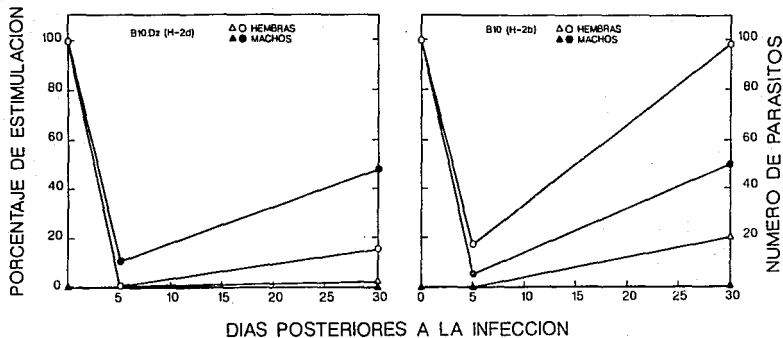


Figura 6. ○ ● Porcentaje de estimulación de células esplénicas de ratones B10.D2 y B10 sanos y a los 5 y 30 días después de la infección con 10 cisticercos por ratón. ▲ ▲ Número promedio de cisticercos recuperados de ratones con 5 y 30 días de infección.

En la cepa B10.-

a) La recuperación de la respuesta proliferativa a los 30 días fué mayor en hembras (98%) que en machos (49%).

b) No se encontraron parásitos a los cinco días de infección. A los 30 días los machos continuaron sin presentar parásitos, mientras que en las hembras se recuperó un promedio de 20 parásitos (Fig. 6).

Estos datos sugieren que no hay una relación entre el número de parásitos obtenidos y el grado de respuesta proliferativa.

En hembras.-

Las hembras de la cepa B10 a los 30 días de infección se recuperan casi en un 100%, en tanto que la recuperación de las hembras B10.D2 es inferior al 20% (Fig 6).

En machos.-

Se obtuvieron similares resultados en machos de ambas cepas, tanto a los 5 como a los 30 días de infección (Fig 6).

3. Determinación de la dosis óptima de antígeno para la inducción de la proliferación linfocitaria en ratones susceptibles y resistentes a la cisticercosis.

4. Determinación de la activación linfocitaria inducida por antígeno vesicular de cisticerco en ratones con diferentes tiempos de infección.

No se obtuvo activación linfocitaria con ninguna de las cepas estudiadas con las concentraciones de antígeno y los tiempos de infección empleados.

5. Estudio del efecto de la infección o la inmunización con antígenos de *Taenia crassiceps* sobre la proliferación linfocitaria.

El estudio fue realizado con ratones B10.D2 machos y muestra que la proliferación linfocitaria es inhibida con la infección y la inmunización con antígenos de *T. crassiceps*.

Como se observa en la figura 7 la inmunización y la infección produjeron niveles bajos de proliferación linfocitaria frente a Con A. Este resultado parece indicar que la falta de respuesta observada no solo está asociada a productos o estructuras relacionadas con la reproducción del parásito, sino que también puede ser inducida por la simple presencia de componentes del fluido vesicular del cisticerco.

6. Efecto in vitro de los antígenos parasitarios sobre la proliferación linfocitaria.

Se observó que la adición *in vitro* de antígenos no modifica la respuesta proliferativa obtenida, lo que sugiere que el nivel bajo de respuesta no se debe a la simple presencia del antígeno sobre las células (Fig. 8).

LA VACUNACION Y LA INFECCION CON *T. crassiceps*
SUPRIMEN LA PROLIFERACION LINFOCITARIA DE
CELULAS ESPLENICAS

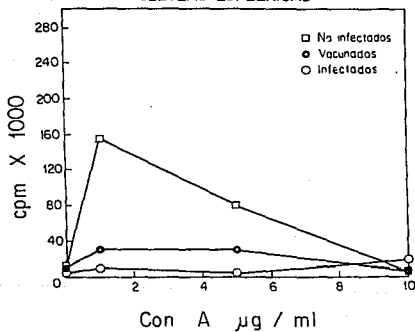


Figura 7. cpm de ratones no infectados (□), vacunados con 100 µg de antígeno total por ratón (●) y con 5 días de infección con 10 cisticercos por ratón (○).

EFFECTO *in vitro* DE LOS ANTIGENOS DE CISTICERCOS
 SOBRE LA PROLIFERACION LINFOCITARIA
 INDUCIDA CON MITOGENO (Con A) EN CELULAS
 ESPLENICAS DE RATONES B10 ♂ NO INFECTADOS

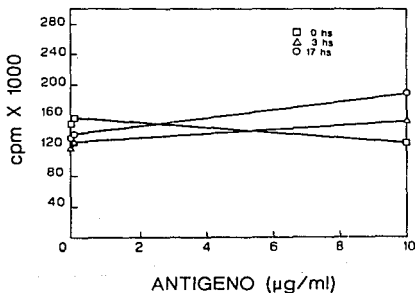


Figura 8. cpm incorporadas por células esplénicas de ratones B10 machos sanos no adicionados de antígeno y con adición de antígeno 0 (□), 3 (Δ) y 17 (○) horas después de agregado el mitógeno (Con A).

7. Estudio del efecto de la vacunación y la primoinfección en el establecimiento y desarrollo de la infección.

En este estudio se encontró que en los ratones con cinco días de parasitados la primoinfección favorece la instalación de parásitos en un segundo desafío. Así, mientras en los ratones a los que se administró SSI y en los inmunizados se recuperaron a los treinta días un promedio de 0.5 parásitos, en los ratones previamente infectados se encontraron en promedio 5.6 parásitos.

8. Estudio de los mecanismos relacionados con el estado de supresión.

-Evaluación del efecto *in vitro* de la adición de IL-2 sobre la proliferación linfocitaria.

Se encontró que la adición de IL-2 a los cultivos de linfocitos origina un aumento en las cpm obtenidas. Este aumento no significa una recuperación de la respuesta proliferativa de los ratones infectados ya que la adición de IL-2 a cultivos de células de ratones infectados no reestablece los niveles de estimulación alcanzados por los ratones no infectados. (Fig. 9).

LA SUPLEMENTACION CON IL-2 NO MODIFICA LOS NIVELES MAXIMOS DE PROLIFERACION CELULAR

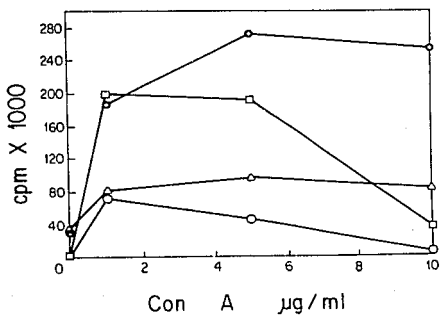


Figura 9. cpm incorporadas por células esplénicas de ratones no infectados (□, △) e infectados (○, ◇), con medio normal (□, ○) y medio enriquecido con IL-2 (△, ◇).

9. Cuantificación de los anticuerpos anti DNPBSA producidos por ratones parasitados con cisticercos de Taenia crassiceps.

Los resultados obtenidos muestran una gran diferencia entre la cantidad de anticuerpos anti-DNPBSA producidos por los ratones parasitados y el grupo control positivo, mientras el promedio de absorbancias de los ratones parasitados es de 0.0306, el de los controles positivos es de 0.5341 (absorbancias de la dilución del suero 1:50).

Estos resultados sugieren que el estado de inmunosupresión observado en los ratones parasitados no es solo ante antígenos del propio cisticercos sino que es generalizado.

DISCUSSION

DISCUSION

En la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps* las diferentes cepas de ratones ofrecen ambientes que favorecen diferencialmente el establecimiento y desarrollo de los parásitos en la cavidad peritoneal. Estas diferencias en la capacidad de establecimiento y desarrollo las identificamos comparando el número de parásitos recuperados en cada cepa después de treinta días de la infección. Con base en esta comparación concluimos que los ratones presentan diferentes susceptibilidades a la infección según el sexo y la cepa. Al respecto de las diferencias asociadas al sexo, las hembras son más susceptibles que los machos, respecto a las cepas las diferencias de susceptibilidad encontradas parecen estar determinadas por genes del MHC. En este sentido, los últimos resultados obtenidos en el laboratorio sugieren que las cepas Qa2⁺ y de haplotipo D^b son resistentes, sin embargo en el caso de las cepas Qa2⁻ no se ha logrado dilucidar qué genes determinan la resistencia o susceptibilidad.

Considerando que el sistema inmune juega un papel importante en la susceptibilidad o resistencia al crecimiento parasitario, según se ha reportado en diferentes parasitosis, se decidió evaluar su participación en la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*.

Estudios previos habían evaluado la respuesta inmune humoral asociada a esta parasitosis y encontraron que las diferencias de susceptibilidad no parecen estar mediadas por anticuerpos. (Fragoso, G. et al, 1988; Sciutto, E. 1990). Contrariamente a lo esperado se observó que los mayores títulos de anticuerpos se presentan cuando el ratón se encuentra con mayor cantidad de parásitos. Tampoco se observaron diferencias cualitativamente importantes entre los antígenos reconocidos por los ratones susceptibles y resistentes. Considerando esta información, decidimos estudiar la respuesta inmune celular inducida en esta parasitosis con la esperanza de identificar mecanismos inmunológicos asociados a la susceptibilidad o resistencia.

En nuestro trabajo de tesis evaluamos la respuesta inmune celular de diferentes cepas de ratones: B10, B10.D2, BALB/cByJ (resistentes) y BALB/cAnN (susceptible), empleando hembras y machos para las dos primeras cepas y solo hembras para las segundas.

Estas cepas se seleccionaron considerando diferencias en el haplotipo de los genes H-2 (B10, H-2b; B10.D2, H-2d), así como diferencias no localizadas aún en el genoma pero manifiestas en la susceptibilidad a la parasitosis (BALB/cAnN, BALB/cByJ). Se incluyeron en el diseño cepas de ambos sexos considerando las diferencias de susceptibilidad entre hembras y machos.

A fin de evaluar la respuesta inmune celular asociada a la cisticercosis murina, utilizamos la técnica de proliferación linfocitaria. Esta técnica consiste en medir activación celular frente a un mitógeno y/o a antígeno a través de la incorporación de timidina tritiada en el DNA recién sintetizado a consecuencia de la activación celular. Así, se estimularon linfocitos esplénicos de ratones de las diferentes cepas, infectados y no infectados con diferentes concentraciones de mitógeno (Con A) y de

antígeno soluble del cisticerco. Comenzamos evaluando la proliferación celular a los 0, 1, 5, 12 y 30 días de infección con la cepa B10. Observamos que los principales efectos se registraron a los 0, 5 y 30 días por lo que el resto del estudio incluyó sólo estos tres tiempos.

Observamos que la parasitosis producía una disminución en la capacidad proliferativa de linfocitos activados con Con A tanto en las cepas resistentes como en las cepas susceptibles. Esta disminución presentó un máximo a los cinco días de infección, tiempo en el cual todos los ratones infectados independientemente de cepa y sexo registraron activaciones significativamente menores que los ratones sanos, y tiende a desaparecer al aumentar el tiempo de la infección, con excepción de la cepa BALB/cByJ en la que se encontró que los niveles de supresión se prolongaron hasta el día treinta después de la infección. Como lo indican las diferencias significativas registradas ($P < 0.0001$) las hembras B10 se recuperan totalmente del estado de inmunosupresión a los treinta días de infección mientras que los machos B10 y hembras y machos B10.D2 se recuperan solo parcialmente. No se

encontraron diferencias significativas ($P < 0.9742$) entre los niveles de supresión observados en los ratones BALB/cByJ y BALB/cAnN (siendo la primera cepa resistente y la segunda susceptible). Las cepas anteriores mostraron menor supresión que la B10 y ésta a su vez menor que la B10.D2 (% de estimulación, Fig 4 y 6).

Ante estos resultados decidimos realizar algunos experimentos para tratar de identificar si la disminución de la respuesta encontrada estaba asociada directamente a productos, estructuras o procesos relacionados con el desarrollo y/o presencia del parásito. Para tal efecto se evaluó la respuesta proliferativa de linfocitos de ratones de la cepa B10 machos a los cinco días de inmunización y a los cinco días de infección con 10 parásitos por ratón. Los resultados obtenidos indican un estado de bajo nivel de estimulación tanto en los ratones infectados como en los inmunizados, sin embargo, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.0152$) entre los ratones parasitados e inmunizados estando los parasitados más suprimidos. Esto sugiere que la inmunosupresión observada no se encuentra solamente relacionada con

el desarrollo y reproducción del cisticerco, sino también con productos intrínsecos al mismo.

Considerando la baja respuesta proliferativa obtenida con el mitógeno y el estado de supresión generalizado en el que se encontraban los ratones infectados, era de esperar que al evaluar la respuesta proliferativa ante diferentes concentraciones de antígeno se encontrara un estado generalizado de baja respuesta para todas las cepas y en ambos sexos.

Pensando que el antígeno pudiera tener *in vitro* alguna actividad que afectara la proliferación linfocitaria, como por ejemplo ocupar receptores de membrana que participan en la activación, agregamos antígenos del cisticerco en diferentes concentraciones a linfocitos de ratones normales B10 machos, 0, 3 y 17 horas después de estimulados con Con A. No se observó estadísticamente ($P < 0.1987$ y $P < 0.0806$) una influencia sobre la proliferación, esto implica que la adición *in vitro* del antígeno no modifica la respuesta inducida por Con A, lo que sugiere que la falta de respuesta ante el antígeno no se debe a la simple presencia de éste ante los linfocitos.

Con el fin de asociar la cantidad de parásitos con este estado de supresión, se estudió la carga parasitaria a los 5 y 30 días de infección en las diferentes cepas. A los cinco días de infección se recuperaron muy pocos parásitos solo en la cepa susceptible, mientras que a los treinta días de infección se registraron claras diferencias en el número de parásitos de las cepas susceptibles y resistentes a pesar de que los niveles de supresión eran similares entre ellas. Lo anterior sugiere que este fenómeno no es relevante para el crecimiento del parásito y que las diferencias de susceptibilidad observadas podrían estar relacionadas con procesos posteriores a su instalación que sean los que determinen las diferencias en el desarrollo parasitario obtenido en cepas susceptibles y resistentes.

Consideramos entonces lo que ocurre en otras parasitosis como en la causada por *Trypanosoma cruzi*. En esta parasitosis la disminución de la respuesta proliferativa se debe a una deficiencia en la producción de IL-2 (Beltz, 1988; Tarleton y Kunh, 1984). Así, decidimos medir la proliferación linfocitaria de ratones B10 machos no infectados y

con 5 días de infección adicionando al medio de cultivo IL-2. La IL-2 se administró añadiendo al medio de cultivo sobrenadante de fibroblastos transfectados sobreproductores de IL-2.

La activación linfocitaria de ratones infectados y no infectados se elevó al suplementar con IL-2, sin embargo, la estimulación de los ratones no infectados no alcanzó niveles de proliferación equivalentes a los obtenidos en los ratones no infectados (fig. 9). Este resultado sugiere que no es la deficiencia de IL-2 la responsable de la inmunosupresión observada. Queda aún por evaluar si la cantidad de IL-2 adicionada fue suficiente para recuperar la activación celular, cuantificando la cantidad de IL-2 contenida en el sobrenadante utilizado.

Decidimos evaluar si el estado de supresión es relevante en el fenómeno de instalación del parásito en el huésped. Para ello utilizamos ratones altamente resistentes (B10 machos), en los cuales, después de 30 días de infección con 20 parásitos por ratón no esperábamos recuperar ningún parásito. Reinfectamos ratones B10 machos al día 5 de la parasitosis (tiempo en el cual los ratones presentan

la máxima supresión) para evaluar el efecto de la supresión asociada a la primoinfección. Los resultados obtenidos parecen indicar que el estado de supresión favorece la instalación del parásito.

A fin de conocer la relevancia de este fenómeno de supresión decidimos inmunizar ratones infectados y suprimidos y no infectados con una sustancia muy antigénica (DNPBSA) y evaluar los anticuerpos producidos en estas diferentes condiciones. Encontramos que los ratones suprimidos por presencia del parásito también están suprimidos en su capacidad de responder a este antígeno a través de la producción de anticuerpos. Este resultado sugiere que los ratones infectados serían probablemente más susceptibles a subsiguientes infecciones, lo que probablemente iría contra la vida del hospedero y el nicho ecológico de este parásito. Podríamos entonces especular que ésta no parece precisamente una estrategia de supervivencia ya que parece no resultar conveniente ni para el propio parásito ni para el huesped. Así, la relevancia biológica de éste hallazgo queda aún por aclararse.

Si bien en este trabajo de tesis se ha avanzado en el conocimiento de la respuesta inmune celular asociada a la parasitosis, queda aún por contestar: ¿Cuáles son los mecanismos inmunológicos responsables del desarrollo parasitario diferencial entre cepas susceptibles y resistentes?

APENDICE I

LINFOCITOS

Dentro del conjunto de células que intervienen en la respuesta inmune se encuentran los linfocitos, estos se clasifican en dos categorías principales: los linfocitos B y T. Los linfocitos B son los progenitores de las células formadoras de anticuerpos. Los linfocitos T participan en la respuesta inmune mediando diferentes mecanismos inmunológicos que van desde funciones citotóxicas hasta funciones reguladoras de las actividades de linfocitos B y de otros linfocitos T. Estas funciones reguladoras pueden ser positivas o negativas, de acuerdo a que característica se les asocie y según estas funciones se les clasifica en:

RESPUESTA DE UN LINFOCITO T CITOTOXICO ANTE UNA CELULA
INFECTADA POR VIRUS

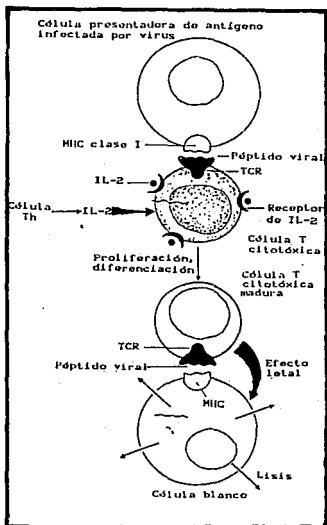


Figura 10

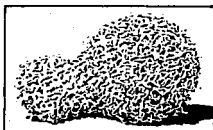
Representación de uno de los fenómenos en los que participan las moléculas de clase I. Se observa su asociación con el antígeno, en este caso viral durante la presentación antigénica.

-Linfocitos T colaboradores (helper), intervienen en la regulación de la actividad de linfocitos B y en la de otros linfocitos T (Fig. 10). Los linfocitos T colaboradores se identifican por presentar en su superficie ciertos marcadores celulares, como son para el caso del ratón Lyl y para el humano CD4.

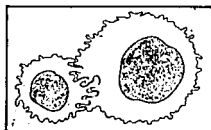
-Linfocitos T supresores, son capaces de inhibir la respuesta inmune, sin embargo a la fecha no se ha encontrado ninguna molécula de superficie que se pueda asociar a una población de células con funciones supresoras, es por ello que algunos autores aún dudan de su existencia.

LINFOCITOTOXICIDAD MEDIADA POR CELULAS.

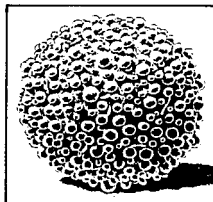
Figura 11



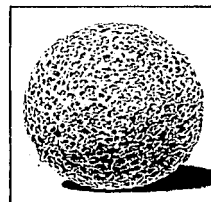
Contacto entre la célula T citotóxica (izquierda) y la célula blanco (derecha).



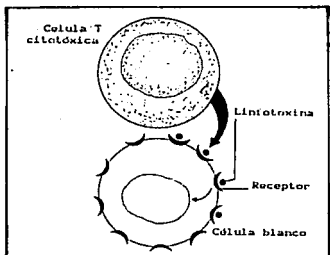
Proceso citoplásmico de invasión de la célula blanco e inicio de la actividad letal.



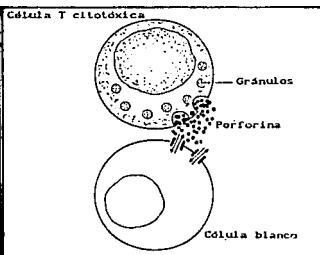
La membrana de la célula blanco parece "hervir".



Aparición de numerosos poros en la membrana de la célula blanco.



Inducción de la muerte de la célula blanco por la linfotoxina liberada por la célula T citotóxica.



Formación de poros en la célula blanco por la acción de proteínas liberadas durante la degranulación de la célula T citotóxica.

-Existen otros linfocitos T que pueden actuar como linfocitos T citotóxicos y que tienen la capacidad de lisar otras células, son conocidos también como linfocitos T K (killer) o citolíticos. Estos linfocitos expresan en su superficie en el ratón moléculas Ly2 y en el humano moléculasCD8, las que permiten su identificación. Los mecanismos por los que estos linfocitos lisar células blanco se esquematizan en la figura 11.

ANTIGENOS CD HUMANOS

ANTIGENO	DISTRIBUCION
CD1a, b, c	Timocitos.
CD2	Linfocitos T.
CD3	Linfocitos T.
CD4	Subpoblación de linfocitos T.
CD5	Linfocitos T y subpoblaciones de linfocitos B
CD6	Linfocitos T.
CD7	Linfocitos T.
CD8	Subpoblación de linfocitos T.
CD9	Monocitos, células pre-B, plaquetas, linfocitos T activados.
CD10	Células pre-B.
CD11a	Leucocitos.
CD11b, c	Monocitos, granulocitos.
CDw12	Monocitos, granulocitos, plaquetas.
CD13	Granulocitos, monocitos.
CD14	Monocitos.
CD15	Granulocitos.

CD16	Granulocitos.
CD17	Granulocitos, monocitos, plaquetas.
CD18	Leucocitos.
CD19	Linfocitos B.
CD20	Linfocitos B.
CD21	Linfocitos B.
CD22	Linfocitos B.
CD23	Linfocitos B activados.
CD24	Linfocitos B, granulocitos.
CD25 (IL-2R)	Linfocitos T activados.
CDw26	Linfocitos T activados.
CD27	Linfocitos T, células plasmáticas.
CD28	Linfocitos T activados.
CDw29	Subpoblación de linfocitos T.
CD30	Linfocitos T y B activados.
CD31	Monocitos, granulocitos, plaquetas.
CDw32	Monocitos, Granulocitos, plaquetas, linfocitos B.
CD33	Monocitos.
CD35	Granulocitos, monocitos.

CD36	Monocitos, plaquetas.
CD37	Linfocitos B.
CD39	Linfocitos B, macrófagos, células plasmáticas
CDw40	Linfocitos B.
CDw41	Plaquetas.
CDw42	Plaquetas.
CD43	Linfocitos T, granulocitos, eritrocitos.
CD44	Linfocitos T, células pre-B, Granulocitos.
CD45	Leucocitos.
CD45R	Linfocitos B, subpoblaciones de linfocitos T granulocitos, monocitos.

MARCADORES QUE DISTINGUEN A LOS LINFOCITOS T DE LOS

B.

MARCADOR	EXPRESADO EN CELULAS	
	T	B
-Receptores de antígeno		
Receptor de célula T	+	
Receptor de célula B	-	+
-Receptores para Fc		
FcγR11	-	+
FcγR10	(+)	-
FcμR	(+)	+
FcαR	-	+
FcεR	-	+
-Receptores para complemento		
CR1	(+)	(+)
CR2	-	+
CR3	(+)	-
C1q-R	-	+

-Receptores para mitógenos

Fitoheماغلوتينينا	+	(+)
Concanavalina A	+	-
Lipopolisacaridos	-	+

-Receptores para eritrocitos de

Carnero (CD2)	+	-
Ratón	-	+
Chango	-	+

-Receptores para virus

Epstein-Barr	-	+
VIH	(+)	-

PRINCIPALES MOLECULAS DE SUPERFICIE QUE SE EXPRESAN EN LOS
LINFOCITOS T DE RATON.

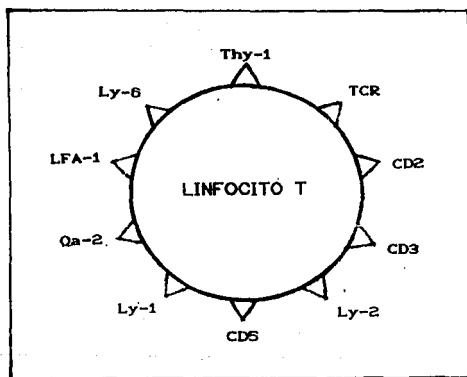


Figura 12

Los linfocitos presentan en su membrana una serie de moléculas que funcionan como receptores. Los receptores son moléculas capaces de unirse fisicoquímicamente, de manera específica, a ciertas sustancias del exterior celular, esta unión origina una señal que va al interior de la célula y que puede ser estimuladora o inhibitoria (Margni, 1980). Estos receptores así como otras moléculas de superficie cuyas funciones no están aún completamente dilucidadas, se utilizan para identificar poblaciones y subpoblaciones linfocíticas. Algunos de estos receptores pueden detectarse tanto en linfocitos B como en T, mientras otros, son específicos para una determinada población, este tipo de moléculas son las que se utilizan como marcadores (Fig. 12).

ACTIVACION LINFOCITARIA MEDIADA POR ANTIGENO.

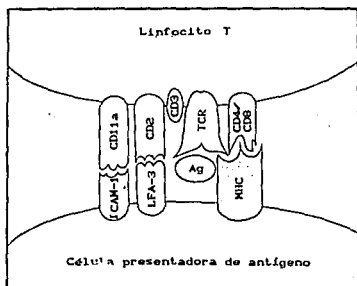


Figura 13

La activación linfocitaria es un fenómeno desencadenado por la estimulación de los linfocitos con antígenos o mitógenos, los antígenos que entran en contacto con un organismo se unen selectivamente a las células que contienen los receptores adecuados (teoría de selección clonal). Como consecuencia de esta unión los linfocitos son activados y conducidos a la serie de eventos que constituyen la división y diferenciación celular. La diferenciación incluye el desarrollo de funciones efectoras, tales como la producción de anticuerpos por células B, y la actividad citotóxica de algunas células T (Fig. 13). La activación mediada por antígenos involucra un conjunto de moléculas de superficie entre las que se encuentran:

En el linfocito T.- CD11a, CD2, CD3, TCR, y CD4 o CD8.

En la célula presentadora de antígeno.- ICAM-1, LFA-3, y MHC.

Activación es un término que en general se refiere al conjunto de procesos mediante los cuales las células son inducidas al ciclo de división celular (Paul, 1984). La activación se inicia cuando la célula (que se encuentra en la fase G₀) interactúa con un agente estimulante.

ACTIVACION LINFOCITARIA
FASES DEL CICLO CELULAR

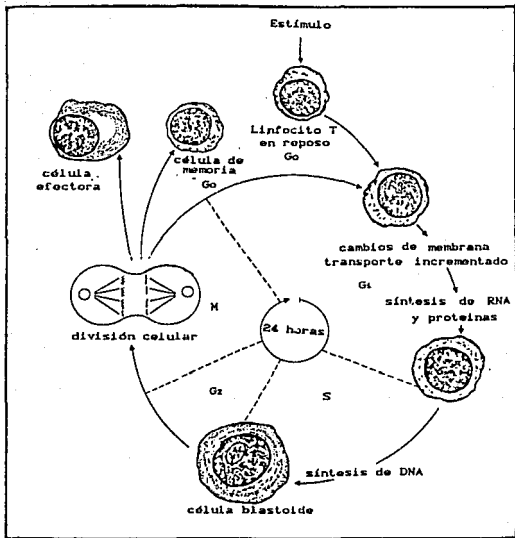


Figura 14

De una manera simplificada podemos decir que el ciclo celular se lleva a cabo en cuatro etapas: En la primera, que es la fase G₁, se sintetizan proteínas estructurales, catalíticas y reguladoras para la replicación del DNA, en ésta etapa las células contienen una cantidad diploide de DNA, y una cantidad variable de RNA.

En la segunda etapa, o fase S se replican las cadenas de DNA.

La tercera etapa es la G₂, en ella la célula contiene 2 veces la cantidad normal de DNA y se hacen los preparativos para distribuir los conjuntos de cromosomas replicados a los núcleos hijos.

La última es la fase M o mitótica, en la que las células se dividen, originando células hijas, las cuales regresan a la fase G₁, o a la G₀ cuando no se encuentran en el ciclo de división celular (Fig 14).

Las células que se han activado pueden reconocerse fácilmente al ser observadas al microscopio, por los cambios morfológicos que presentan, los cuales se conocen como transformación blastoide. Después de 12 a 24 hrs de iniciada la fase G1 se puede observar en los linfocitos B y T un aumento en la intercromatina nuclear debida a la acumulación de proteínas sintetizadas de novo, entre ellas, proteínas contráctiles como la actina, además de la aparición de un gran nucleolo. El citoplasma es notable por su riqueza en polirribosomas, el aparato de Golgi aumenta de tamaño, las mitocondrias son numerosas y dilatadas. La transformación blastoide es, usualmente, el antecedente de la síntesis de DNA (Paul, 1984 y Bach, 1984).

Una característica importante en la activación linfocitaria es la síntesis de DNA, dicha característica se observa a partir de las 36, 48 y 72 hrs o más dependiendo del mitógeno en cuestión, el origen de las células y su relación con el mitógeno. El ensayo más empleado para medir la activación linfocitaria se basa en la medición de la incorporación de ^3H -timidina por las células durante la síntesis de DNA. Más adelante se comentarán algunos detalles de los procedimientos empleados para la medición de la proliferación celular.

MITOGENOS

Podemos definir a un mitógeno como aquella sustancia que es capaz de activar a células e inducir su proliferación, de esta forma, estrictamente hablando aquella sustancia que induce a una célula a eventos tempranos en la activación y no llega hasta la fase de mitosis, no es un mitógeno (Paul, 1984).

Dentro de los mitógenos se encuentra una gran cantidad de agentes capaces de activar a los linfocitos, entre los que podemos citar:

-Ag solubles: Antígenos bacterianos, micóticos o virales, pólenes, proteínas, medicamentos, péptidos sintéticos, etc; en los animales sensibilizados contra esos antígenos.

-Células alogénicas: Cultivo mixto de linfocitos.

-Fitomitógenos (lectinas): Fitohemaglutinina (PHA), Concanavalina A (Con A), mitógenos de la *Fitolaca americana* (PWM).

-Productos bacterianos: Lipopolisacáridos (LPS), enterotoxina estafilococcíca, estreptolisina S, tuberculina agregada, Nocardia, etc.

-Anticuerpos: Anti-linfocitos, anti-inmunoglobulinas, anti-B2 microglobulina, etc.

-Complejos antígeno anticuerpo.

-Químicos: Periodato de sodio, sulfato de dextrán, metales pesados, forbol ésteres, etc.

-Enzimas proteolíticas.

-Agentes quelantes: ionóforos (Bach, 1984).

Las lectinas son glicoproteínas derivadas de plantas y animales, capaces de asociarse a glicoproteínas de moléculas de superficie celular. Son precisamente estos fenómenos de unión los que generan cambios e inducen la activación celular.

La fijación de algunas lectinas a restos glicosilados de proteínas de superficie puede inducir activación linfocitaria semejante a la activación dependiente de antígeno, pues involucra además de moléculas glicosiladas otros receptores de linfocitos T.

Las lectinas no son específicas para un tipo de células ya que las moléculas a las que se unen pueden presentarse en diferentes tipos celulares (Sharon, 1972). Existen mitógenos que activan preferentemente a células T y/o B, dependiendo de las moléculas que presenten estas células en su superficie.

DOSIS-RESPUESTA DE POBLACION DE CELULAS
ESPLENICAS A MITOGENO (Con A)

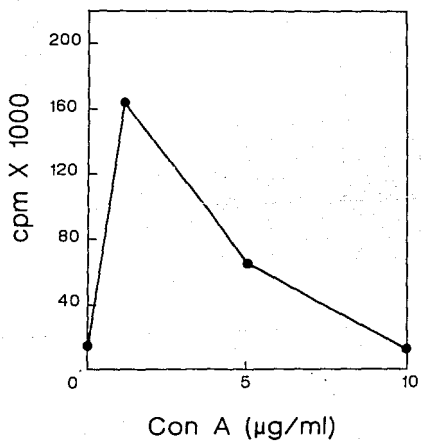


Figura 15

Otra característica importante, es que la mayoría de los mitógenos tienen la propiedad de estimular a los linfocitos siguiendo una curva de dosis/respuesta en forma de campana, es decir que en concentraciones mas altas o más bajas que la dosis óptima se obtiene menor estimulación (Fig. 15).

La acción de las lectinas puede ser inhibida por monosacáridos o bien por oligosacáridos, estos últimos inhiben mas eficazmente, ya que por su gran tamaño interactúan con mayor número de restos de aminoácidos glicosilados de las lectinas, evitando que éstas puedan unirse a las moléculas de la superficie de las células (Paul, 1984).

FITHEMAGLUTININA (PHA)

Usualmente este nombre designa a la lectina de *Phaseolus vulgaris*, el frijol rojo.

La mitogénesis que induce esta lectina ocurre principalmente aunque no exclusivamente en los linfocitos T.

El monosacárido que mejor inhibe las uniones de la PHA con los linfocitos es N-acetil-D-galactosamina. Pero los oligosacáridos que contienen además de N-acetil-D-galactosamina, un núcleo de manosa una galactosa subterminal, y un ácido siálico terminal, inhiben aún más efectivamente las uniones. (Debray, 1981).

CONCANAVALINA A

Es derivada de *Canavalia ensiformis*, a pH > 7 existe en forma de tetrámero con subunidades de 25.5kd cada una .

A pH 6, el tetrámero se disocia en dímeros, cada subunidad contiene un sitio activo con residuos hidrofóbicos, los cuales se unen a los extremos no reducidos de los sacáridos, estas uniones están influidas por iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , se ha observado que estos iones inducen un cambio en la conformación de las subunidades de Con A (Becker, 1975).

Los oligosacáridos que inhiben mas efectivamente su interacción con la superficie celular son α -D-manopiranosidos, α -D-glucopiranosidos, α -N-acetil-D-glucosaminidas y α -metil-manósidos (Debray, 1981). A concentraciones adecuadas la Con A tetramérica es mitogénica para linfocitos T, si se polimeriza o se fija a un soporte también puede estimular a células B. Los dimeros de Con A pueden producir fenómenos de "capping" y activar a células T. Los monómeros de Con A son capaces de unirse a la superficie celular, pero no de llevar a cabo el fenómeno de "capping" y de activar a las células (Paul, 1984).

Cuando el tetrámero de Con A se une a la superficie celular, se presenta un fenómeno llamado "cooperatividad positiva". En este fenómeno el segundo sitio al que se une una molécula de Con A presenta una mayor avidéz que la que mostró el primer sitio de unión ocupado. Otros mitógenos, incluyendo aglutininas de cacahuete y PHA, muestran la misma propiedad.

Recientemente se ha observado que la síntesis de DNA depende críticamente de la presencia de Con A durante las primeras 3 horas y también durante un segundo período de alrededor de 16 a 24 horas. En el período entre 3 y 16 horas, la presencia de Con A tiene poca influencia en la síntesis de DNA (Paul, 1984).

PWM

Cinco mitógenos han sido aislados de las raíces de *Phytolaca americana* (Pa-1 hasta 5) y todos ellos estimulan a los linfocitos T.

Pa-1 también puede estimular a células B a dividirse y a secretar inmunoglobulinas en presencia de células T y macrófagos.

La Pa-1 y Pa-2 son inhibidas por di-N-acetil chitobiosa.

LPS

Los lipopolisacáridos derivados de paredes celulares de varias cepas de *Escherichia coli*, o *Brucella abortus* estimulan a células B de roedores a dividirse y a mantener una producción de inmunoglobulinas, en cambio las células T no son estimuladas.

La eficiencia de la estimulación por lipopolisacáridos es afectada por la densidad de la suspensión celular y por la presencia de células accesorias.

AGENTES OXIDANTES DE GRUPOS HIDROXILO EN CARBOHIDRATOS

Dentro de estos agentes podemos citar al periodato de sodio el que en concentraciones de 0.1 a 1 M activa a los linfocitos B.

Esta activación es inhibida por otras sustancias oxidables que compiten por el agente oxidante, y por agentes reductores como el borhidruro de sodio.

Las células que son pretratadas con neuraminidasa (la cual remueve los residuos de ácido siálico terminal de carbohidratos), presentan una menor estimulación por periodato, y ello hace que se crea que las moléculas que median la señal de inducción son probablemente sialoglicoproteínas.

SULFATO DE DEXTRAN

Es un carbohidrato cargado negativamente, es mitogénico para algunas subpoblaciones de células B que también son estimuladas por LPS, y actúan sobre algunas células inmaduras tales como las de la médula ósea.

METALES PESADOS

Se ha observado que la transferrina férrica influye favorablemente en la respuesta celular a mitógenos, sin embargo no se ha demostrado que el fierro sea mitogénico.

Por otra parte, se ha sugerido que el zinc tiene un papel importante en la síntesis de DNA, se ha visto que es un cofactor de las DNA polimerasas en bacterias y que en linfocitos humanos estimula la síntesis de DNA.

A diferencia de la Con A, la que puede ser removida después de 24 horas sin afectar la respuesta, el Zn^{2+} debe estar presente en todo el periodo de máxima estimulación.

PROTEASAS

Solo mencionaremos que las serin proteasas incluyendo tripsina y quimotripsina pueden estimular la síntesis de DNA en algunos linfocitos.

PHORBOL ESTERES

Los forbol ésteres tales como el acetato de forbol miristato (PMA) y el forbol éster 12-o-tetradecanoil forbol 13-acetato (TPA) originan varios efectos en diferentes tipos celulares. Su sitio de acción primario es la membrana celular, uniéndose a receptores específicos inician reacciones bioquímicas de las que resulta la activación, proliferación, y diferenciación celular. Son mitogénicos para linfocitos T y B humanos en los que causan alteraciones en la membrana, modulan la expresión de receptores celulares y activan diversos genes entre ellos los que codifican para algunas citocinas.

La proteína cinasa C (PKC) es el receptor celular para los forbol ésteres, al unirse inician la señal de transducción, la fosfolipasa C hidroliza al fosfatidil inositol 4,5 difosfato (IP₃), el cual al ser liberado al citoplasma moviliza Ca²⁺ y diacilglicerol, este último activa a la PKC, aumentando su afinidad por el Ca²⁺, así, al actuar simultáneamente con el IP₃ se induce una activación completa de la PKC.

Los forbol ésteres sustituyen al diacilglicerol y activan a la PKC sin afectar la concentración intracelular de Ca²⁺ (Isakov, 1987).

IONOFOROS

Los ionóforos de calcio, tales como el A23187 (el cual es un antibiótico ácido carboxílico), se insertan en la membrana plasmática formando un canal a través del cual permite que haya una entrada de calcio.

Cuando se emplean simultáneamente ionóforos de calcio y forbol ésteres se da la activación de células T, la cual se cree está regulada por lo menos por dos señales intracelulares sinérgicas, el aumento en la concentración de calcio intracelular libre y la activación de la PKC. Generalmente la adición de cualquiera de los dos agentes por separado induce una respuesta mínima o nula (Imboden, 1988).

ENSAYOS USADOS PARA LA EVALUACION DE LA ACTIVACION LINFOCITARIA

Como habíamos mencionado, el método tradicional para cuantificar la activación linfocitaria consiste en medir la incorporación de timidina tritiada por las células activadas.

La timidina tritiada al entrar a la célula es fosforilada por la enzima timidina fosforilasa formando timidina trifosfato, precursor inmediato de DNA. La timidina es el precursor de elección porque es rápidamente transportado del medio al interior de la célula (mientras que los nucleótidos fosforilados no lo son), y es la única base que forma parte del DNA y no del RNA. Posteriormente podemos medir la activación linfocitaria cuantificando la incorporación de timidina tritiada en un contador de centelleo.

Aunque el método de incorporación de timidina tritiada presenta muchas ventajas, tiene la desventaja de que no se puede asegurar que el índice de incorporación de timidina tritiada a macromoléculas sea directamente proporcional a la nueva síntesis de DNA, considerando que existen otras variables que afectan la incorporación de timidina tritiada, entre ellas podemos encontrar: las diferencias en la capacidad de las células para transportar la timidina tritiada a su interior; las diferencias en los índices de intercambio de nucleótidos y nucleósidos entre diferentes compartimentos; las diferencias en los índices de fosforilación de los nucleótidos entre las células; la incorporación diferencial de timidina debida a la ruptura y reparación más que a la síntesis de DNA, etc.

Existen otros métodos útiles para medir la activación linfocitaria, entre los que se encuentran:

-Cuenta de linfoblastos.- Las células que se encuentran en transformación blastoide pueden ser identificadas y cuantificadas por su morfología y tamaño característicos por microscopía y mediante el uso de hemocitómetros o por contadores de células volumétricos o electrónicos (el volumen de las células blastoides es de 3 a 30 veces mayor que el de las células en reposo).

-Prueba de la replicación viral o prueba de Bloom.- Algunos virus, como los de la parotiditis, sarampión, poliomielitis, se replican en linfocitos T activados, pero no en linfocitos en reposo. Los linfocitos T pueden ser medidos mediante la formación de placas de lisis sobre una capa mononuclear de células indicadoras sensibles al efecto citopático viral (Bach, 1984).

-Incorporación de nucleótidos trifosfatados por células permeabilizadas.- En este ensayo se aumenta la permeabilidad de la membrana celular del linfocito mediante el uso de una solución amortiguadora hipotónica, y posteriormente se añade nucleótidos trifosfatados radioactivos, finalmente la activación linfocitaria se cuantifica con un contador de centelleo (Buckley, 1987).

Al aumentar la permeabilidad de la membrana linfocitaria se permite el paso de nucleótidos trifosfatados al interior de la célula. Este hecho elimina algunas de las desventajas que el método de proliferación linfocitaria tradicional presenta.

Sin embargo, a pesar de las limitaciones que presenta el método de incorporación de timidina tritiada, continúa siendo el más empleado.

APENDICE II

EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD DEL RATON

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) es un conjunto de genes ubicados en serie, que codifican para proteínas de superficie celulares y participan a distintos niveles en la respuesta inmune.

En el ratón, el Complejo Mayor de Histocompatibilidad se localiza en el cromosoma 17 y desde 1938 fue designado por Peter Gorer como H-2 (Gorer, 1938). Por mucho tiempo el término H-2 se consideró como sinónimo de MHC del ratón, sin embargo en la actualidad, existe la tendencia a dividir al MHC del ratón en dos regiones: H-2 y Q/TL/Hmt. De todos los genes que se ubican en el MHC del ratón, sólo algunos codifican para las moléculas clásicas de histocompatibilidad mientras que el resto de los genes codifican para diversas proteínas, algunas de las cuales se sabe que desempeñan funciones en el sistema inmune. A pesar de que éste conjunto génico ha sido estudiado muy extensamente, aún no se conoce la función de algunos de sus productos fenotípicos.

MECANISMO DE ACTIVACION DEL LINFOCITO TH
MEDIADO POR ANTIGENO.

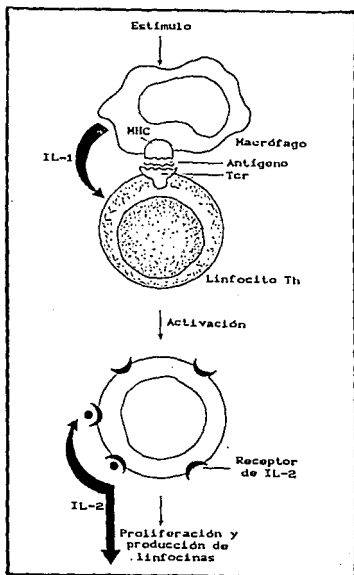


Figura 16

Los genes del MHC del ratón se han agrupado en tres clases en función de la homología estructural que presentan sus productos genotípicos: genes clase I, II y III.

De esta clasificación, las moléculas codificadas por los genes H-2 de clase II y III no se han reconocido como determinantes en los fenómenos de rechazo rápido de transplantes, estando sus funciones más asociadas con la respuesta inmunológica humoral que se desencadena contra antígenos (Weiss et al., 1984). Así, los genes Clase II codifican para proteínas que son reconocidas junto con el antígeno, por receptores presentes en los linfocitos T cooperadores permitiendo fenómenos complejos de activación celular que influyen en la activación de las células B. Los genes clase III codifican para algunos de los componentes del sistema del complemento como C2, C4 y el factor B (responsables de la destrucción celular mediada por anticuerpos).

Considerando que en este trabajo de tesis se involucran la participación de antígenos de clase I, nos referiremos principalmente a estos genes y sus productos. (Fig.16).

Los genes del MHC que codifican para los antígenos clásicos de histocompatibilidad, pertenecen a la región H-2 y se han agrupado en tres subregiones: H-2D, H-2K y H-2L localizadas en la región más proximal del MHC. Estas tres subregiones no se encuentran en serie, ya que H-2K se encuentra separado de H-2D y H-2L por genes clase II y III.

Los antígenos clásicos Clase I son dímeros formados por una cadena pesada de naturaleza glicoprotéica de 45 kD unida no covalentemente a una cadena ligera de aproximadamente 12 kD (la β_2 microglobulina) no codificada en el H-2 (Lew et al. 1986a). El polipéptido de 45 kD está constituido por tres dominios, denominados α_1 , α_2 y α_3 cada uno con un resto hidrocarbonado asociado covalentemente. Los dominios α_1 y α_2 son los más polimórficos y en ellos residen las funciones antigénicas y biológicas de la molécula, el dominio α_3 es el más conservado.

Los antígenos clásicos se expresan en casi todos los tipos celulares como glicoproteínas de superficie, aunque más abundantemente en macrófagos y células linfoides. Son elementos de restricción

cuya función se encuentra relacionada con su alto grado de polimorfismo. Estos antígenos son los elementos de reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos de marcadores celulares de lo no propio (rechazo rápido de trasplantes) (Zinkernagel and Doherty, 1989) así como de células alteradas.

Los antígenos clase I no clásicos de histocompatibilidad son un conjunto de proteínas que también se codifican en el MHC del ratón.

Los loci que codifican para los antígenos no clásicos de histocompatibilidad, se ubican en las regiones Q, TL (también designadas como Qa y Tla, respectivamente) y Hmt, localizadas en la región más distal del MHC, adyacentes a la región D del H-2.

Estos antígenos no clásicos, constituyen un grupo de proteínas que se han incluido dentro del grupo de Clase I (Fig. 17), dado la gran homología estructural y genómica que presentan con los antígenos clásicos (Lew et al., 1986b; Robinson 1985). Sin embargo, la mayor parte de ellas no parecen desempeñar las mismas funciones, como su bajo grado de polimorfismo, su expresión tejido específica y la manera como se encuentran ancladas

a la membrana de las células que las expresan. El conocimiento que se tiene sobre estos loci se ha realizado principalmente en dos cepas congénicas de ratones: BALB/c y C57BL/10.

Una de las características más sobresalientes de los antígenos Clase I no clásicos es que la mayor parte de ellos presentan una distribución tejida específica, a diferencia de los antígenos clásicos que se localizan en casi todos los tipos celulares del organismo. Esta distribución característica, en células principalmente de origen linfoide, es uno de los factores que contribuyen a considerar que sus funciones pueden estar asociadas con procesos de diferenciación celular y suponer que no desempeñan las mismas funciones que los antígenos clásicos de histocompatibilidad.

En general todas las proteínas codificadas en la región Q (Qa-2, Qb-1 y Q-10) tienen una distribución limitada principalmente a células de origen hematopoyético (Vernachio et al 1989; Robinson 1985; Sharrow et al 1989). La proteína más estudiada en este grupo es Qa-2. Esta molécula ha sido detectada en nódulos linfáticos, bazo, timo, médula ósea e hígado, siendo mayor su frecuencia en

células $CD4^+/CD8^-$, $CD4^-/CD8^+$ y $CD4^-/CD8^-$ y menor en células T inmaduras, linfocitos B y macrófagos (Vernachio et al 1989). Una característica importante en la molécula Qa-2 es que no solo se expresa en la superficie de las células T activadas, sino que puede ser secretada por la célula, a diferencia de la proteína Qb-1 que sólo existe en su forma secretada o intracelular pero no se expresa en la superficie de las células (Robinson 1985).

Una característica única de los productos de la región Q (Qa-2, Qb-1 y Q10), es su capacidad para poder ser secretados, proceso que está íntimamente relacionado al hecho de que el segmento hidrofóbico transmembranal, característico de los antígenos clásicos, se encuentra reemplazado por una secuencia hidrofílica (Mellor 1984). Se sabe que la proteína Qa-2, presenta una asociación poco usual a la membrana celular, a diferencia de los antígenos H-2D, H-2L y H-2K que se encuentran unidos a la membrana celular mediante una estructura proteica glicosídica, la proteína Qa-2 lo hace a través de una unión de fosfatidil inositol, PI, (Stienberg et al.1987). Aún cuando todavía se desconocen los

eventos biológicos asociados a esta forma de unión, se han sugerido dos fenómenos relacionados con ella, el primero se refiere a su presentación en forma soluble que pudiese estar mediada por la presencia de fosfolipasas endógenas (Stienberg et al. 1987; Robinson 1987). El segundo asocia esta forma de unión con propiedades mitogénicas, considerando el hecho de que en procesos de proliferación celular se encuentran involucrados mecanismos mediados por PI (Gunter et al. 1984).

Las diferencias funcionales que existen entre los antígenos clásicos y no clásicos de histocompatibilidad puede estar asociada a una débil expresión tejida específica de éstos últimos, sin embargo, aún esto no ha sido dilucidado.

Aunque se ha avanzado mucho en el estudio de características y propiedades de los antígenos de clase I, faltan aún por conocer aspectos bioquímicos y funciones biológicas de este conjunto de moléculas.

APENDICE III

RESPUESTA INMUNE CELULAR EN OTRAS PARASITOSIS

La relación hospedero-parásito es un fenómeno biológico muy interesante, sobre el cual aún falta mucho por conocer. La resistencia a infecciones por protozoarios y helmintos no se manifiesta como un fenómeno de todo a nada, así, los términos susceptible y resistente no son usados en su sentido absoluto, sino de una manera comparativa. La resistencia del huésped a las infecciones se manifiesta por su habilidad de destruir a los parásitos, limitar su crecimiento, desarrollo y reproducción, en algunas parasitosis esta respuesta del huésped se ha podido asociar con procesos inmunológicos definidos. (Wassom, et al. 1990).

Se ha propuesto que la inmunidad humoral y celular pueden conferir cierta protección contra diversas parasitosis, originando así, hospederos con distintos grados de resistencia o susceptibilidad. Es por ésto que se ha tratado de correlacionar la respuesta inmune involucrada en parasitosis con el desarrollo y crecimiento del parásito en el hospedero.

Entre los factores que influyen en la resistencia o susceptibilidad a diferentes parasitosis se encuentran: las facultades que el parásito posea para modular o modificar la respuesta del hospedero o alterar su propia estructura (tabla 1), y los factores asociados al hospedero (tabla 2), dentro de los cuales algunos se han identificado como genéticamente determinados.

Dentro del conjunto de genes que pueden afectar la relación hospedero-parásito, se encuentran tanto genes del MHC como genes del resto del genoma (fondo genómico). Los genes del fondo genómico ejercen una importante influencia sobre el desarrollo de las parasitosis, sin embargo, lo que se conoce de ellos es poco debido a la dificultad que su estudio representa. Respecto a los genes del MHC, se conocen gran parte de las proteínas para las que codifica y las funciones que éstas median, algunas de ellas participan en interacciones celulares críticas para la respuesta inmune, por lo que se piensa pueden ser responsables de los diferentes niveles de eficiencia que presenta la respuesta inmune que se establece contra la

infección.

Con la finalidad de estudiar el determinismo genético de la susceptibilidad asociada al MHC en el control de las infecciones parasitarias, se han utilizado en modelos experimentales, cepas de ratones singénicas, congénicas y congénicas recombinantes.

Considerando que esta tesis reporta algunos estudios sobre la respuesta inmune celular asociada a la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, mencionaremos a continuación algunas de las observaciones en la respuesta inmune celular frente a algunas parasitosis:

FACTORES DEL HOSPEDERO QUE PUEDEN MODIFICAR LA RELACION HOSPEDERO-PARASITO

ASOCIADOS A GENES DE RESPUESTA INMUNE

1. Genes de Respuesta inmune humoral.
 - a) Anticuerpos.
 - b) Complemento.
 - c) Factores solubles reguladores.
2. Genes de Respuesta inmune celular.
 - a) Moléculas del MHC.
 - b) Receptores de Ag.
 - c) Receptores de citocinas.
 - d) Factores solubles reguladores.

ASOCIADOS A GENES NO RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE

1. Genes relacionados con el cromosoma sexual.
2. Genes no relacionados con el cromosoma sexual.

Tabla 1.

PROPIEDADES DEL PARASITO PARA MODIFICAR LA
SUSCEPTIBILIDAD DEL HOSPEDERO

MODIFICACION DEL HOSPEDERO

1. A nivel celular.

- a) Ambiente intramacrofágico.
- b) Expresión defectuosa de H-2.

2. A nivel de los eventos que conforman la respuesta
inmune.

- a) Inmunosupresión.
- b) Efectos anticomplementarios.
- c) Efectos antiinflamatorios.
- d) Degradación de anticuerpos.

MODULACION DE COMPONENTES DEL HOSPEDERO

- 1. Producción de anticuerpos bloqueantes.
- 2. Producción de anticuerpos no específicos.

MODIFICACION DEL PARASITO

- 1. Variación antigénica.
- 2. Modulación antigénica.
- 3. mimetismo molecular.

Tabla 2.

Echinococcus multilocularis:

La inmunosupresión inespecífica se encuentra asociada a varias parasitosis, tal es el caso de la infección causada por *Echinococcus multilocularis*. Se ha observado que al principio de la infección (1 o 2 semanas) la respuesta proliferativa de las células esplénicas de ratones BALB/c a la estimulación por Con A se encuentra disminuida hasta en un 50% respecto a la que presentan los ratones no infectados, y que aproximadamente a las 4 semanas de infección se normaliza la capacidad de respuesta a Con A. En contraste, la respuesta a LPS no es alterada por dicho parásito. La capacidad de producir IL-2 en respuesta a la Con A se encuentra también disminuida. La adición de IL-2 exógena en concentraciones adecuadas iguala la respuesta proliferativa de los ratones infectados a la de los ratones normales.

Se piensa que las células T son responsables de la inmunosupresión que se presenta al inicio de la infección, y que el tiempo que este estado durafavorece el establecimiento del parásito (Kizaki, et al. 1991).

Encephalitozoon cuniculi:

En estudios realizados con las cepas de ratones C57BL/6 y BALB/c (susceptible y resistente respectivamente) se han encontrado diferencias en algunas de sus funciones inmunológicas que se piensa pudieran tener relación con su característica de resistencia o susceptibilidad.

La producción de linfocinas por los linfocitos T es uno de los mecanismos mediante el cual el ratón controla la infección por *E. cuniculi*. Las interleucinas producidas por ambas cepas son similares en su capacidad de activar a los macrófagos para matar al parásito, pero los linfocitos de la cepa susceptible requieren de un tiempo más prolongado para generar las linfocinas *in vitro* que el tiempo requerido por la cepa resistente. La existencia de un fenómeno similar *in vivo* podría explicar la mayor replicación del parásito en los ratones susceptibles. El retraso de la producción de las linfocinas *in vitro* pueden ser consecuencia de algún defecto de la función de células accesorias y de la disminución de la proliferación linfocitaria ante *E. cuniculi*, ya que

la presentación antigénica y la proliferación linfocitaria son fenómenos vitales para la inducción y sensibilización de los linfocitos T (Liu, et al.1989).

Se ha sugerido que la producción de prostaglandinas está relacionada con la disminución de proliferación linfocitaria observada en la cepa susceptible.

Leishmania mayor:

Numerosos experimentos indican que las células CD4+ desempeñan un papel fundamental en la susceptibilidad del ratón a la infección por *L. mayor* (Locksley y Scott, 1991).

Las células T CD4+ se dividen en dos subpoblaciones con base en las linfoquinas que producen después de ser estimuladas. Las células Th₁ producen IL-2 e INF- γ y las células Th₂ IL-4, IL-5 e IL-10

Los eventos iniciales que inducen la maduración de distintas subpoblaciones de células Th durante la infección por *L. mayor* aún no se conocen, sin embargo, se ha observado que en cepas resistentes, el control de la infección está asociado con la estimulación de las células Th₁ y la producción de linfoquinas como el IFN- γ , y que en las cepas susceptibles el establecimiento de la infección está relacionado con la estimulación de células Th₂. El INF- γ activa a los macrófagos infectados por *L. mayor*, lo cual parece ser el mecanismo de destrucción del parásito (Boom, 1990 ; Scott, 1989).

Schistosoma mansoni:

Se ha sugerido que en esta parasitosis, al igual que en la Leishmaniasis, son fundamentales los macrófagos activados para la resistencia a la infección y dado que el INF- γ es la principal linfocina responsable de la activación de los macrófagos, las células Th₁, productoras de dicho factor soluble también son importantes en la resistencia.

Trypanosoma cruzi:

La respuesta inmune en los ratones infectados por *T. cruzi* se encuentra muy suprimida. Se ha observado que durante la infección se presentan varias anomalías que facilitan el establecimiento y diseminación del parásito en el huésped, entre ellas se encuentran que los niveles de linfocitos supresores y macrófagos se elevan, los de células T esplénicas disminuyen, se presenta deficiencia en la respuesta a mitógenos, disminución en la capacidad de sintetizar anticuerpos y baja producción de IL-2.

Diversos estudios han demostrado que la adición de IL-2 exógena a linfocitos de ratón corrige la supresión observada, lo que sugiere que los receptores para IL-2 se expresan normalmente. En contraste, en humanos, el parásito inhibe la expresión de los receptores para IL-2 sin afectar la producción de dicha interleucina (Beltz, 1988 ; Tarleton y Kuhn 1984).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

-Ahmed A. y Allan H. Smith (1982). Surface markers, antigens, and receptors on murine T and B cells: Part 1. *Crit. Rev. Immunol.* 3:331. -Aldrich, C. J., Rodgers, J. R. and Rich, R.R. (1988). Regulation of Qa-1 expression and determinant modification by and H-2D-linked gene, *Qmd. Immunogenetics* 28:334

-Aluja., Escobar, A., et al. (1986) Cisticercosis. Edit. Fondo de cultura Económica, México D.F.

-Bach, J. F. (1984). *Inmunología*. Edit. Limusa, México, 1a.ed.

-Baenziger, J. U. y Dorothy Fiete (1978). Structural Determinants of Concanavalin A Specificity for Oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 254:2400.

-Becker, J.W. et al. (1975). The covalent and three-dimensional structure of Concanavalin A. *J. Biol. Chem.* 350:1513.

-Beltz, L. A. et al. (1988). Novel Mechanism for *Trypanosoma cruzi* induced suppression of human lymphocytes. *J. Immunol.* 141:289.

-Bellanti, J.A. (1987). *Inmunología*, Edit Interamericana, México 3a. ed.

-Benacerraf, B. y Emil, R. Unanue (1986). *Inmunología*, Edit. Panamericana, Argentina 2a. ed.

-Bonneville, M. et al. (1989). Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by $\gamma\delta$ T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5928.

-Buckley, P.J. y H. James Wedner, (1978). Measurement of the DNA synthetic capacity of activated lymphocytes: Nucleotide triphosphate incorporation by permeabilized cells. *J. Immunol.* 120:1930.

-Boom, W.H. et al. (1990). Patterns of Cytokine secretion in murine Leishmaniasis: Correlation with disease progression or resolution. *Infec. Immun.* 58:3863.

-Carreño, R.J.J. Verificación genética de la cepa singénica C57BL/10 y la línea congénica resistente B10.BR H-2^k de ratón de laboratorio por métodos inmunogenéticos. Tesis Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

-Chen, Y. et al. (1985). Thymusleukemia (TL) antigens of the mouse. Analysis of TL mRNA and TL cDNA from TL⁺ and TL⁻ strains. *J. Exp. Med.* 162:1134.

-Debray, H. et al. (1981). Specificity of twelve Lectins Towards Oligosaccharides and Glycopeptides Related to N-glycosyl proteins. *Eur. J. Bioch.* 117:415.

-Farrar, W.L. et al. (1986). Biochemical and Molecular Events Associated with Interleukin 2 Regulation of Lymphocyte Proliferation. *Immunol. Rev.* 92:49

-Festenstein, H. (1973). Immunogenetic and biological aspects of *in vitro* lymphocyte allotransformation (MLR) in the mouse. *Transplantation Rev.* 15:62.

-Fisher Lindhal, K, Hausmann, B. y Chapman, W. M. (1983). A new H-2 linked class I gene Whose expression depends on maternally inherited factor. *Nature* 306: 383.

-Fisher Lindhal y Burki, K. (1982). Mta, a maternally inherited cell surface antigen of mouse, is transmitted in the egg. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5362.

-Fisher Lindahl, K., Loveland, B. y Richards, S. (1988). The end of H-2. In: H-2 antigens. David, C.S. (ed). Plenum Press. New York, pp. 327.

-Flaherty, L. (1981). Tla- region antigens. In The Role of the major histocompatibility antigens in Immunobiology. Dorf, M. (ed). Garland Press, New York, p. 33.

-Flaherty, L. et al. (1985). Characteritacion of a Q subregion gene in the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1503.

-Flaherty, L., Elliot, E., et al. (1990). Immunogenetics of the Q and TL regions on the mouse. *Crit. Rev. Immunol* 10:131.

-Flisser, A. et al. (1982). Cysticercosis. Present state of knowdlege and perspectives. New York.

-Foster, H.L. The Mouse in Biomedical Research vol. 1, Edit Harcourt Brace Jovanovich, EEUU.

-Fragoso, G.G. et al. (1988). Immunología de la cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps* variedad ORF. Tesis. Instituto de Investigaciones Biomédicas.

-Freeman, R. S. (1962). Studies on the Biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40: 969.

-Freeman, R. S., Fallis, A. M., et al. (1973). Intraocular *Taenia crassiceps* (cestoda): Part II. The Parasite. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22: 493.

-Gorer, P. A. (1938). The Antigenic basis of tumor transplantation. *Pathol. Bacteriol.* 47:231.

-Gunter, K. C., et al. (1984). T cell-activating properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 159:716.

-Harris, R. A. et al. (1984). Qa antigens and Their differential distribution of lymphoid myeloid and stem cells. *Immunogenetics* 11:265.

-Hesketh, T.R. et al. (1983). Free Cytoplasmic Calcium Concentration and the Mitogenic Stimulation of lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 258:4876.

-Hood, L., Steirmetz, M. y Malissen, B. (1983). Genes of the major histocompatibility complex. *Ann. Rev. Immunol* 1:529.

-Imboden, J.B. y Arthur Weiss, (1988). The Initiation of Human T Lymphocyte Activation. *Prog. Allergy.* 42:246.

-Isakov, N. y Amnon, Altman, (1987). Human T Lymphocyte Activation by Tumor Promoters: Role of Protein kinase C¹. *J. Immunol.* 138:3100.

-Janeway, Jr. C. A., et al. (1980). T lymphocytes responding to Mls-locus antigens are Lyt-1+, 2- and I-A restricted. *Immunogenetics* 10:481.

-Kizaki, T. et al. (1991). Immune suppression induced by protoscoleces of *Echinococcus multilocularis* in mice. *J. Immunol.* 147:1659.

-Klein, J. (1991). *Immunology* Blackwell Scientific Publications, Boston.

-Klein, J. (1979). The major histocompatibility complex of the mouse, *Science* 203:516

-Klein, J., et al. (1990). Revised nomenclature of mouse H-2 genes. *Immunogenetics* 32:147.

-Lalanne, J.L. et al. (1985). Expression of class I genes in the major histocompatibility complex: Identification of eight distinct mRNAs in DBA/2 mouse liver. *Cell* 41:469.

-Landolfi, N. F., et al. (1985). Differential glycosylation requirements for the cell surface expression of class I molecules. *J. Immunol.* 134:423.

-Larralde, C., et al. (1989). Deciphering Western Blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:228.

-Lew, A. E., et al. (1986a). Class I genes and molecules an update. *Immunology* 57:3.

-Lew, A. M., et al. (1986b). Characteristics of the expression of the murine soluble class I molecule (Q10). *J. Immunol.* 136:254.

-Liu, J.J. et al. (1989). Mechanisms of resistance/susceptibility to murine encephalitozoonosis. *Parasite Immunol.* 11:241.

-Mallisen, B. (1986). Transfer and expression of MHC genes. *Immunol. Today* 7: 106.

-Maloy, W. L., Coligan, J. E., Barra, Y. and Jay, G. (1984). Detection of a secreted form of the murine H-2 class I antigen with and antibody against its predicted carboxyl terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:1216.

-Margni, R.A. (1980). *Fundamentos de Inmunología e Inmunquímica*, Edit. Panamericana, 2a. ed.

-Matsuura, A. et al. (1987). Transcripts of Tla genes. *Immunogenetics* 25:411.

-Mellor, A. L., et al. (1984). A nonpolymorphic class I gene in the murine major histocompatibility complex. *Cell* 36:139.

-Mellor A. L., et al. (1985). Structure and expression of genes encoding murine Qa-2 class I antigens *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:5920.

-Mellor, A. L., Tomlinson, P. D., et al. (1991). Expression and Function of Qa-2 major histocompatibility complex class I molecules in transgenic mice. *Int. Immunol.* 3:493.

-Michaelson, J., et al. (1981). Further biochemical data on Qa-2. *Immunogenetics* 14:129.

-Nakayama, K., et al. (1991). MHC gene Q8/Q9^d of the BALB/cJ mouse strain can not encode a Qa-2,3 class I antigen. *Immunogenetics* 33:225.

-Old, L. J., et al (1983). Antigenic properties of experimental leukemias. I. Serological studies in vitro with spontaneous and radiation-induced leukemias. *J. Natl. Cancer. Inst.* 49:977.

-Oppenheim, J.J. (1984). Cellular Functions in Immunity and Inflammation, Edit. Elsevier/North-Holland, New York.

-Paul, W.E. (1984). *Fundamental Immunology. Lymphocyte Activation* (Robert F. Ashman) RavenPress, New York 267-300.

-Robinson, P. J. (1987). Two different biosynthetic pathways for the secretion of Qa-region-associated class I antigens by mouse lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:527.

-Robinson, P.J. (1987). Structure and expression of polypeptides encoded in the mouse Qa region. *Immunol. Res.* 6:46.

-Robinson, P. J. (1985). Qb-1, a new class I polypeptide encoded by the Qa region of the mouse H-2 complex. *Immunogenetics* 22:285.

-Rojas, M.W. (1988). *Inmunología*, Edit. Columbia, México 7a. ed.

-Sciutto, E., (1990). 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 *Taenia solium*. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. México.

-Scott, P. et al. (1989). Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol. Rev.* 112:161.

-Sharon, N. y Halina Lis, (1972). Lectins: Cell-Aglutinating and Sugar-Specific Proteins. *Science* 117:949.

-Sharrow, S. O., Arn, J. S., et al. (1989). Epitope clusters of Qa antigens defines by a panel of new monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 142:3495.

-Solosky, M. J., Hood, L. y Stroynowski, I. (1988). Qa-region class I gene expression: identification of a second class I gene, Q9, encoding a Qa-2 polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:3100.

-Song, E. S., et al. (1988). Allospecific cytotoxic T lymphocytes recognize an H-2 peptide in the context of a murine major histocompatibility complex class I molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:1927.

-Steinmetz, M., et al. (1982). Clusters of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell* 28:489.

-Stienberg, J., et al. (1987). Removal of lymphocyte surface molecules with phosphatidylinositol-specific phospholipase C: effects on mitogen responses and evidence that ThB and certain Qa antigens are membrane-anchored via phosphatidylinositol. *J. Immunol.* 138:3877.

-Strominger, J. L. (1989). The $\gamma\delta$ T cell receptor and class Ib MHC related proteins: enigmatic molecules of immune recognition. *Cell* 57:895.

-Tarleton, R.L. y R. E Kuhn, (1984). Restoration of *in vitro* immune Responses of Spleen Cells from Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* by Supernatants Containing Interleukin 2. *J. Immunol.* 133:1570.

-Vernachio, J. et al. (1989). Qa-2 expression in the adult murine thymus. *J. Immunol.* 142:48.

-Vidovic, D. et al. (1989). Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a $\gamma\delta$ T-cell hybridoma. *Nature* 340:646.

-Walkelin, D. (1985). Genetic control of immunity to helminth infections. *Parasitol. Today* 1:17.

-Wassom, D. L. y Elizabeth A. B. Kelly. (1990).
The role of the Major Histocompatibility Complex in
resistance to parasite infections. *Crit. Rev.
Immunol.* 10:31.

-Weiss, E. H., Golden, L., et al. (1984).
Organization and evolution of the class I gene
family in the major histocompatibility complex of
the C57BL/10 mouse. *Nature* 310:650.

-Widacki S. M. y Cook, R. G. (1986). Q and TL
region genes and protein products. *Immunology* 2:222.

-Winoto, A., Steinmetz, M. y Hood, L. (1983).
Genetic mapping in the major histocompatibility
complex by restriction enzyme site polymorphisms:
most mouse class I genes map to the Tla complex.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:3425.

-Wolf, P. R. y Cook, R. G. (1990). The TL
Region Gene 37 encodes a Qa-1 antigen. *J. Exp. Med.*
172:1795.

-Zinkernagel, R. M. y Doherty, P. C. (1980).
MHC-restricted cytotoxicity T cells: studies on the
role of polymorphic major transplantation antigens
determining T-cell restriction specificity,
function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27:51.