

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y POSGRADO
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**INMUNOSUPRESION PARASITARIA:
PERFIL Y TRASCENDENCIA DE LA
INMUNOSUPRESION DE RATONES PARASITADOS
POR *Taenia crassiceps*.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMÉDICA
BÁSICA PRESENTA

MIGUEL RUBIO GODOY

CIUDAD UNIVERSITARIA, OCTUBRE DE 1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3
2ej.
BIBLIOTECA DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
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.

"Apenas expresamos algo lo empobrecemos singularmente. Creemos que nos hemos sumergido en las profundidades de los abismos y cuando volvemos a la superficie la gota de agua que pende de la pálida punta de nuestros dedos ya no se parece al mar del que procede. Creemos que hemos descubierto en una gruta maravillosos tesoros y cuando volvemos a la luz del día sólo traemos con nosotros piedras falsas y trozos de vidrio; y sin embargo en las tinieblas relumbra aún, inmutable, el tesoro"

Maeterlinck

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, por su ejemplo de voluntad y su inmensa generosidad.

A mi madre, por siempre estar ahí impulsándome a seguir adelante.

A mis hermanos Verena, Gabriela, Alvaro, Rogelio y Emilio, por enseñarme a convivir y ser un inmejorable ejemplo de la diversidad de los seres vivos.

A Adriana, por ser una formidable y generosa amiga.

A Alvaro, por las incontables enseñanzas y ratos agradables.

A mis abuelos, los presentes y los recordados, por haberme forjado desde pequeño.

A Alejandra, por ser mi amiga, fabulosa compañera y más severa crítica.

A los Microchips, por haber hecho de los últimos 5 años una preciosa experiencia.

A Francisca Berrondo y Moritz Bühlmann, por haber marcado desde temprano mi personalidad.

A Ma. Elena Flores, por confiar en mí y llevarme de la mano en mis pininos científicos.

A Luis Servín, por su amistad y por enseñarme la sana virtud del orden y la constancia.

A Carlos Larralde, por su amistad y su confianza, y por forjar en mí una visión más amplia y crítica del quehacer científico.

A Antonio Lazcano, por ser el amigo que me abrió los ojos al perpetuo e inmenso mundo de la biología, y por impulsarme en mis primeras letras.

A todos los amigos en los distintos laboratorios, por haber hecho mucho más divertido el proceso del aprendizaje.

A Guillermo Alfaro y Emma Verástegui, por compartir conmigo su saber, tiempo y amistad.

A José Luis Molinari y Patricia Tato, por su siempre amistosa disposición para ayudar y compartir.

A Alejandro García Carrancá y Carla Santana, por ayudarme en los experimentos con HeLa.

A Rafael Saavedra, por ayudarme en los experimentos con *Toxoplasma gondii*.

A los Dres. Larralde, Alfaro, Molinari, Saavedra y Lamoyi, por acceder a formar parte de mi jurado de tesis y sus muy valiosas aportaciones a este trabajo.

A la DGAPA, por apoyarme con una beca durante la elaboración de este trabajo.

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. MATERIAL Y METODOS	5
IV. RESULTADOS	
1. INMUNIDAD DE TRANSPLANTE	
A.- Alotransplantes de piel	13
B.- Ensayos de reacción mixta de linfocitos	16
2. INMUNIDAD Y CANCER	
A.- Inoculación con células HeLa	20
B.- Actividad de células NK y CTL	22
3. INMUNIDAD CONTRA INFECCIONES	
A.- Coinfección con <i>Toxoplasma gondii</i>	25
B.- Coinfección con <i>Salmonella thyphimurium</i>	31
V. DISCUSION GENERAL	38
VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
VII. APENDICES	
1. SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION PARASITARIA	
A.- Cisticercosis murina por <i>Taenia crassiceps</i> : Un modelo experimental	45
B.- Diferente susceptibilidad a la infección asociada a factores genéticos	47
C.- Diferente susceptibilidad a la infección asociada al sexo	48
D.- Factores inmunológicos en el control de las parasitosis	51
E.- Tolerancia	56
2. INMUNOPARASITOLOGIA	
A.- Introducción	60
B.- La diversidad biológica de los organismos parásitos	61
C.- Inmunopatología asociada a las parasitosis	62
D.- Mecanismos de alteración inmunológica causados por el parásito	64
1.- Mecanismos inmunorregulatorios	
2.- Mecanismos evasivos de la respuesta inmune	
E.- Mecanismos efectores de la respuesta inmune contra los parásitos	72
1.- Mecanismos efectores dependientes de anticuerpos	
2.- Inmunidad mediada por células	
F.- Inactivación de las funciones efectoras del hospedero	74
G.- Perspectiva biológica del parasitismo	77
VIII. REFERENCIAS	79

I. RESUMEN

La infección experimental murina por *Taenia crassiceps* genera una cisticercosis crónica y masiva, en la que la carga parasitaria llega a pesos que igualan los del hospedero. Hemos documentado que algunos desarreglos inmunológicos que afectan principalmente a las células TH1 se presentan en el hospedero, lo que permite la íntima coexistencia del parásito a pesar de la magnitud de su carga antigénica. Sin embargo, el sistema inmune no parece estar deprimido ni total ni inespecíficamente, pues los animales parasitados no sufren infecciones oportunistas ni desarrollan neoplasias espontáneamente en condiciones de bioterio. Se realizó un estudio para sondear si los ratones masivamente cisticercosos respondían menos eficientemente ante confrontaciones inmunológicas que los controles. Se estudió un panel de respuestas inmunes generales: 1) Se transplantó piel de ratones BALB/c a BALB/k parasitados y controles de ambas cepas; 2) En otro grupo se inocularon subcutáneamente ratones BALB/c con células HeLa; 3) Un tercer diseño consistió en coinfectar con *Toxoplasma gondii* y *Salmonella typhimurium* a ratones de ambos sexos con distintos tiempos de infección por *T. crassiceps*. Nuestros resultados muestran que : a) Los trasplantes de piel son rechazados por los animales parasitados y control en tiempos similares (las pruebas de MLR apoyan esta conclusión); b) Todos los ratones bloquean finalmente el crecimiento neoplásico de las células HeLa, aunque éstas crecen considerablemente más en los animales hembra parasitadas que en las normales y siempre más en las hembras que en los machos (las actividades de células CTL correlacionan con estas observaciones); c) La infección por *T. crassiceps* resulta en una protección parcial ante la infección intraperitoneal por *T. gondii*, pero esta protección desaparece cuando el protozoario se administra subcutáneamente; d) Los animales parasitados son menos resistentes a *S. typhimurium* que los controles (muestran mayores tasas de mortalidad y mayores cifras de bacteremia). Estos resultados sugieren que la infección por *T. crassiceps* no altera drásticamente la responsividad inmunológica general del hospedero, sino que afecta la inmunidad de manera sectorial y variada según el desafío, algunas modificaciones promoviendo y otras interfiriendo con la respuesta inmune a los variados desafíos. La lección importante es que la cisticercosis por *T. crassiceps* viola los mecanismos de rechazo inmunológico del hospedero sin afectar fatalmente las respuestas a otros retos potencialmente dañinos, siendo entonces el resultado de la

parasitosis una inmunosupresión específica. De aquí que de este trabajo podrían surgir normas potencialmente aplicables en las terapias de inmunosupresión específica para trasplantes de órganos.

II. INTRODUCCION

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo para determinar si la infección experimental murina por *Taenia crassiceps* causa un estado de inmunosupresión generalizada en los animales parasitados y para evaluar la profundidad y trascendencia del mismo.

La observación que nos incitó a profundizar en este tema es, en cierto modo, una paradoja. Por un lado, tras algunas semanas de infección los ratones afectados albergan gran cantidad de parásitos en su seno, lo que podría ser indicativo de que *Taenia crassiceps* induce un estado inmunológicamente permisivo. Por el otro, los ratones, aparte de la parasitosis, no presentan infecciones por ningún organismo oportunista, no desarrollan neoplasias espontáneamente, presentan un buen estado general, y viven más de un año, como cualquier otro ratón sano en cautiverio.

La cisticercosis peritoneal causada por metacéstodos de *Taenia crassiceps* en ratones es un modelo experimental que ofrece gran facilidad para este tipo de proyectos dado el sencillo manejo tanto de hospederos como de parásitos, ambos bien conocidos genética e inmunológicamente. En la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* se han encontrado algunos indicios de un estado de inmunosupresión del hospedero: los ratones parasitados presentan altos títulos de anticuerpos, una baja tasa de proliferación linfoide en respuesta a la estimulación por ConA y una respuesta celular DTH deprimida (Bojalil *et al.*, 1993; Terrazas *et al.*, 1994). Los perfiles de secreción de citocinas de los animales parasitados indican que la inmunidad está sesgada hacia la de tipo humoral (TH2), lo que inhibe la de tipo celular (TH1) (Terrazas *et al.*, 1994).

Las interacciones entre distintos tipos de organismos que infectan a un solo individuo, que podría ser considerado como un nicho biológico, son un campo de estudio relativamente nuevo y muy interesante (Seed, 1993; Wassom, 1993). La realización de coinfecciones representa una primera aproximación de nuestro grupo de trabajo a este campo.

El enfoque principal que se utilizó fue el llevar a cabo un sondeo general de las respuestas de animales de ambos sexos tanto normales como parasitados con *T. crassiceps* ante retos antigénicos

arquetípicos, los que podían ofrecer una visión global de la afectación de los distintos tipos de respuesta inmune.

Para sondear la inmunidad de trasplante llevamos a cabo alotrasplantes de piel entre las cepas murinas BALB/c y BALB/k. sometimos a los animales a alotrasplantes de piel con el objetivo de establecer si la parasitosis, al suprimir al sistema inmune, permitía la implantación de un tejido con haplotipo distinto. También se realizaron ensayos de reacción mixta de linfocitos (MLR) para cuantificar la responsividad celular de los ratones contra distintos haplotipos.

Con el objeto de estudiar la posible afectación de la inmunidad contra el cáncer inoculamos distintas cantidades de células cancerosas cervico-uterinas humanas HeLa en ratones parasitados, para establecer si podían controlarlas o no. Adicionalmente se midió la actividad de las células NK y CTL, que son tipos celulares importantes para el control de los crecimientos neoplásicos (Mason y Morris, 1986; Yu *et al.*, 1992).

Finalmente, se estudió la inmunidad contra infecciones concomitantes. Utilizamos al protozoo oportunista *Toxoplasma gondii* y a la enterobacteria *Salmonella typhimurium* para nuestros ensayos de coinfección en animales con distintos tiempos de infección por *Taenia crassiceps*.

La descripción detallada de los antecedentes y el marco teórico para la realización de la presente tesis se encuentran en los apéndices. El apéndice 1 trata acerca de nuestro modelo experimental de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* y de los distintos factores asociados a la susceptibilidad a las infecciones parasitarias. En el apéndice 2 se aborda el tema de la inmunoparasitología, indicando su trascendencia en el mundo contemporáneo y describiendo los mecanismos que los organismos parásitos han desarrollado a lo largo de la evolución para contender con el sistema inmune de sus hospederos.

III. MATERIAL Y METODOS

CISTICERCOS

Se emplearon metacéstodos de *Taenia crassiceps* cepa ORF, originalmente donados por el Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg, Alemania) en 1986. Desde entonces, los parásitos se han propagado y mantenido por inoculación secuencial intraperitoneal de metacéstodos (Freeman, 1962) en ratones hembra de la cepa BALB/c, conocidos por su alta susceptibilidad a esta forma de cisticercosis experimental (Sciutto *et al.*, 1990). Las larvas empleadas para la infección experimental se obtuvieron de animales donadores con 3-6 meses de infección.

RATONES

Los experimentos se llevaron a cabo con ratones machos y hembras de las cepas BALB/c y BALB/k, con haplotipos H2^d y H2^k, respectivamente, de entre 2 y 20 semanas de edad.

En los ensayos de reacción mixta de linfocitos se emplearon ratones de la cepa C57BL/6.

INFECCION EXPERIMENTAL CON *Taenia crassiceps*

Los ratones de 4-6 semanas de edad se inocularon intraperitonealmente con 10 parásitos con un diámetro de aproximadamente 2 mm, sin gemas observables a simple vista. Los metacéstodos utilizados en el inóculo fueron lavados previamente con amortiguador PBS (solución de fosfatos 0.01 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2) (Sciutto *et al.*, 1991).

La carga parasitaria de cada ratón se determinó contando el número de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal. Nunca se observaron parásitos fuera de ésta, ni daño aparente en ningún otro tejido.

LINEAS CELULARES

Empleamos células HeLa ATCC CCL2 (ATCC Catalogue of cell lines and hybridomas, 1992) en todos nuestros experimentos con células neoplásicas. Esta línea celular proviene de un carcinoma epitelial de cervix humano. Generalmente se crece en medio mínimo esencial de Eagle adicionado con amino-ácidos no esenciales, 90% de solución salina balanceada de Earle y 10% de suero humano.

En los ensayos de actividad de linfocitos CD8⁺ citotóxicos (CTL) empleamos dos líneas celulares murinas. Como estímulo isogénico para la cepa BALB/c usamos la línea L5178Y (haplotipo H2^d) (*Ibid.*). Como estímulo alogénico utilizamos la línea EL4.4 (haplotipo H2^b) (*Ibid.*). Ambas líneas celulares se propagan en medio RPMI 1640 suplementado. Como células blanco en los ensayos de actividad NK se usaron células YAC.1 (*Ibid.*).

MICROORGANISMOS

Toxoplasma gondii

Utilizamos *Toxoplasma gondii* de la cepa RH (Sabin, 1941) en todos nuestros experimentos. Este protozoario se cultiva axénicamente en presencia de fibroblastos humanos en medio D-MEM adicionado con 10% de suero fetal bovino. El hecho de cultivar a este organismo con los fibroblastos da por resultado una atenuación de la virulencia del mismo (Saavedra, com. pers.). Una vez atenuados los parásitos es necesario emplear mayor cantidad de los mismos para obtener una cierta Dosis Letal 50.

Salmonella typhimurium

En estos experimentos se utilizó la bacteria *Salmonella typhimurium*, perteneciente al grupo B de *Salmonella* (Davis *et al.*, 1983). La cepa de laboratorio se mantiene en refrigeración mientras no se le esté utilizando y se reactiva antes de trabajar con ella infectando intraperitonealmente un ratón. Veinticuatro horas después se sacrifica al ratón y se le extrae el bazo, que es perfundido en condiciones estériles. Se toman aproximadamente 100 µl de la suspensión celular del bazo y se plaquean en una caja de Petri con medio sólido (Caldo CASOY (caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya) con

1% de CASO-Agar (agar peptona de caseína-peptona de harina de soya), Merck-México,S.A.) que se incuba durante 24 horas. Antes de comenzar a reactivar la cepa bacteriana hay que realizar un frotis, teñirlo con la tinción de Gram (Difco Laboratories, Detroit, USA) y observarlo en el microscopio a 100 x para determinar por la tinción Gram-negativa y la morfología que la bacteria es la correcta y que tenemos un cultivo puro. Además, se lleva a cabo un ensayo de aglutinación con suero anti-antígeno O del grupo B de *Salmonella* (Difco Laboratories, Detroit, USA) para tener una identificación serológica del microorganismo. Una vez cerciorados de tener la bacteria correcta, se toma con un asa un poco de las bacterias de la perfusión del bazo, y se siembran las mismas en una caja de Petri empleando estria cerrada a partir de una colonia aislada. Se incuba esta caja durante 24 hrs a 37 °C, y de una colonia aislada se hace una suspensión en 1 ml de solución salina al 0.85% estéril. De esta solución se inoculan 0.1 ml intraperitonealmente a un ratón, que es sacrificado a las 24 hrs. Al animal se le extrae el bazo en condiciones estériles y se perfunde con 5 ml de solución salina. Se siembran 0.5 y 0.1 ml de esta solución en cajas de Petri utilizando estria abierta, y se incuban durante la noche a 37°C. De una colonia aislada se inocula un matraz con 100 ml de medio de cultivo líquido (Caldo CASOY (caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya), Merck-México,S.A.) que se deja creciendo durante la noche, y de ahí se toman 5 ml para inocular otros 100 ml de medio líquido. Se dejan crecer las bacterias de este segundo matraz hasta que tenga una densidad óptica de 1.0 D.O a 560 nm. Se toma entonces el volumen requerido para llenar dos tubos de centrifuga, que se centrifugan a 12'000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se decanta en una probeta para medir su volumen, y los paquetes se resuspenden en un volumen diez veces menor de solución salina estéril al 0.85% fría. De esta solución, con una concentración celular de ca. 10^9 /ml, se hacen las diluciones necesarias, también con solución salina al 0.85% fría, y se toman 0.1 ml de las concentraciones adecuadas para inocular intraperitonealmente a cada uno de los ratones tratados. También se toman 0.1 ml de una concentración de 10^{-6} y 10^{-7} del inóculo original para sembrar un par de cajas de Petri con agar suave y determinar la concentración bacteriana de las mismas tras 24 horas de cultivo. Los animales se observan diariamente durante 21 días para cuantificar la mortalidad, ya sea para determinar la Dosis Letal 50, o para realizar un experimento.

Para realizar experimentos con vía de administración oral se emplea exactamente el mismo protocolo, sólo que se utiliza un inóculo mucho más concentrado (por ejemplo 10^{-1} , 10^{-2} o 10^{-3} a partir del volumen resuspendido en solución salina).

La bacteremia se detecta mediante sangrados periódicos de los animales. Se coloca el animal en un frasco pequeño cuya tapa esté perforada, para sacar su cola por el orificio. Con alcohol isopropílico se le limpia perfectamente la cola y se le corta con una tijera una pequeña sección. Se exprime posteriormente la cola y con una pipeta Gilson se toma un cierto volumen de sangre. Se mezcla este volumen de sangre con agar suave (Agar BPLS (USP)(Agar-verde brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa USP), Merck-México S.A.; a la mitad de la concentración normal para cultivos sólidos), y se plaquea una caja de Petri con medio de cultivo selectivo para *Salmonella* (Agar BPLS (USP)(Agar-verde brillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa USP), Merck-México S.A.). De cada animal se prepara una caja de Petri, que se deja incubando a 37° C durante 24 hrs. Pasado este tiempo se cuentan las unidades formadoras de colonias. En caso de haber contaminantes gram-positivos, no crecerán debido a la composición del medio de cultivo. De ser las contaminantes gram-negativas, pero no *Salmonella*, se podrán detectar por la coloración que adquiere el medio de cultivo a su alrededor.

ALOTRANSPLANTES

En un inicio se empleó una técnica de trasplante de piel de cola (Bailey and Usama, 1960), que es de fácil realización y requiere un mínimo de instrumental quirúrgico. No seguimos utilizando esta técnica, pues la determinación del rechazo del tejido transplantado era muy difícil, además de que los animales fácilmente lo perdían, pues no lleva sutura.

Empleamos para los experimentos una técnica de trasplante de piel (Bilingham and Medawar, 1951) del dorso de los animales. Para anestesiarse a los ratones se emplean 100 ml de una solución 1:10 de pentobarbital sódico (Anestosal, Smith Kline Norden de México) con PBS por cada 10 g de peso del animal. Una vez dormido, se rasura la zona dorsal del animal con una hoja de afeitar, y se le limpia con alcohol. Con ayuda de una pinza larga y recta que ejerza una presión constante, pero no corte, se separa

un pedazo de piel. Con otra pinza se sostiene el tejido, que se corta con un solo movimiento firme de una hoja de bisturí. Se deposita el tejido en una caja de Petri con PBS estéril, y con la cara interna viendo hacia arriba, con la hoja del bisturí se le raspa ligeramente, a fin de eliminar el pániculo adiposo. Mientras se realiza el mismo proceso en el animal receptor de este primer tejido, y donador de la piel para el primer ratón, se puede quedar el trasplante en la caja de Petri. Es importante que el tamaño de los tejidos transplantados sea similar, para que no se tengan que estirar demasiado ni la piel circundante ni el tejido, una vez que se haya suturado. Se sutura con aguja oftálmica atraumática empleando sutura quirúrgica 6/0 y un nudo doble que no se corra. Si el tamaño del ojal en el dorso del animal receptor y el tejido son similares, cuatro puntos de sutura son suficientes. Se limpia la herida con una gasa humedecida con PBS estéril y, una vez seco, se cubre con gasa estéril adherida con algún tipo de goma antiséptica (Por ejemplo, New Skin, Medtech Laboratories, Inc.). Finalmente, se cubre la gasa con tela adhesiva, para evitar que el animal o sus compañeros de jaula se muerdan el trasplante. Para evitar infecciones de la herida se mantiene a los animales operados en una jaula con papel manila en vez de aserrín.

PREPARACION DE SUSPENSIONES CELULARES DEL BAZO

Utilizamos una técnica ligeramente modificada de la descrita en el libro de Coligan *et al.* (1991). Se sacrifica al animal mediante dislocación cervical y se le disecciona en condiciones estériles para extraer el bazo. Se deposita el órgano linfóide en una caja de Petri estéril con 5 ml de medio Dulbecco y se perfunde con una jeringa con 5 ml del mismo medio y aguja de 25 X 16 mm. Se colectan los 10 ml de medio con las células en un tubo de centrifuga estéril con tapa de rosca y se centrifugan 10 minutos a 1500 rpm. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el botón y se le añaden 4 ml de solución hemolisante (8 partes de una solución de NH_4Cl 0.16 M por 2 partes de una solución de Tris Base 0.17 M, esterilizadas por filtración) fría. Se agita levemente la suspensión celular y tras un par de minutos se le añaden 5 ml de medio Dulbecco, y después se centrifugan 10 minutos a 1500 rpm. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el botón, y se le añade 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado

(que contiene medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 10 % de suero fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 0.5 % de amino ácidos no esenciales (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 1 % de Solución de penicilina/estreptomicina/amfotericina 100 µg/ml (Flow Laboratories, Scotland), 1 % de amortiguador HEPES 1 M pH 7.2-7.4 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), y 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)). De esta suspensión se toma una alícuota, se le añade azul tripano (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) para contar las células viables y se determina la concentración.

REACCION MIXTA DE LINFOCITOS

En una placa de cultivo de 96 pozos de tipo "U", de la suspensión celular de bazo se añaden 5×10^5 a 4×10^5 células efectoras en un volumen de 0.1 ml a cada pozo. Se hacen pruebas por triplicado para cada concentración.

Para preparar las células estimuladoras, las células de bazo se resuspenden a una concentración de $4-5 \times 10^6$ células/ml en medio Dulbecco y se agregan 40 µg/ml de mitomicina C (Sigma chemical company, Saint Louis, MO, USA). Se incuba a 37°C en oscuridad durante 1 h y posteriormente se lava tres veces con un exceso de medio Dulbecco para retirar cualquier traza del antibiótico. Se resuspenden las células en 1 ml de RPMI 1640 suplementado y se toma una alícuota para determinar la concentración. Se añade a los pozos con las células efectoras la concentración adecuada (que debe ser determinada mediante una curva patrón) de células estimuladoras en 0.1 ml de medio. Los cultivos control se preparan igual, pero como estímulo se añaden a cada pozo células singénicas mitomizadas, que no deberían estimular a las células efectoras.

Se dejan las placas de 3 a 6 días en una incubadora a 37°C, con una tensión del 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo de estimulación, se añaden 10 µl de medio de cultivo con 0.5 µCi de [³H] timidina a cada pozo y se incuban durante 18 hrs. Posteriormente se cosechan las células y se miden las cpm en un contador de centelleo beta. Los datos se presentan como la relación de las cpm obtenidas en los cultivos control y estimulados. Se divide el promedio de las cpm de los cultivos estimulados entre el

promedio de las cpm de los cultivos control y el resultado se expresa como "índice de estimulación" (IE).

ENSAYO DE CELULAS NK

Este ensayo de actividad de células asesinas naturales (NK) está basado en el método de Coligan et al. (1991), con pequeñas modificaciones.

Se ajusta con RPMI 1640 suplementado una suspensión celular, a la que en vez de agregarle solución hemolisante se le hizo pasar por un gradiente de Ficoll-Hypaque, para obtener la concentración de células efectoras adecuada para el ensayo.

Las células blanco YAC.1 se resuspenden en 0.7 ml de suero fetal bovino (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) con una concentración de $1-2 \times 10^7$ células/ml. Se les añaden 0.3 ml de una solución acuosa de ^{51}Cr (cromato de sodio ($\text{Na}_2\text{CrO}_4^{31}$), Amersham International, Buckinghamshire, England) y se dejan incubando a 37°C , 5% CO_2 durante 2 horas. Se lavan las células tres veces con medio Dulbecco y se resuspenden en 1 ml de RPMI 1640 suplementado. Se tiñen con azul tripano (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) para contar las células viables y se determina la concentración de la suspensión. A los pozos de tipo "U" con las células efectoras se añade en 0.1 ml la cantidad de células blanco que experimentalmente se haya determinado funcionen mejor. También por triplicado se cargan con células marcadas con ^{51}Cr pozos con 0.1 ml de una solución al 2% de SDS y de medio solo, para obtener los valores de "liberación total" y "liberación espontánea", respectivamente. Se centrifugan las placas brevemente a 1800 rpm para bajar las células al fondo de los pozos, y se dejan incubando durante 4 horas a 37°C , 5% CO_2 . Tras este periodo de incubación se toma, con cuidado de no llevarse las células, el sobrenadante y se deposita en un tubo para el contador de radiación gamma. Con las cuentas por minuto se realiza la siguiente operación para obtener el porcentaje de citólisis (Actividad NK):

$$\% \text{ Lisis} = \frac{\text{cpm experimentales} - \text{cpm liberación espontánea}}{\text{cpm liberación total} - \text{cpm liberación espontánea}} \times 100$$

Donde: cpm experimental = células efectoras + células blanco

cpm liberación total = células blanco con SDS al 2%

cpm liberación espontánea = Células blanco con RPMI 1640 suplementado

ENSAYO DE CELULAS CTL

Este ensayo para medir la actividad de los linfocitos T citotóxicos (CTL) es una leve modificación del método de Coligan et al. (1991).

De hecho, es una mezcla de los dos protocolos anteriores, pues consiste en co-cultivar 1 parte de células efectoras con 2 partes de células estimuladoras tratadas con mitomicina C durante 6 días en una incubadora a 37°C, 5% CO₂. Se emplean cajas de cultivo de 24 pozos con fondo plano, con 2 ml de medio RPMI 1640 suplementado por pozo, y una concentración celular máxima de 2 X 10⁶/ml. Transcurridos los 6 días de co-cultivo, se enfrentan las células efectoras a células blanco marcadas con ⁵¹Cr. Tanto la metodología, como los cálculos a realizar son iguales a los de los protocolos anteriores, por lo cual se omiten.

IV. RESULTADOS

1.- INMUNIDAD DE TRANSPLANTE

A. ALOTRANSPLANTES DE PIEL

La primera serie de operaciones que se llevó a cabo fue siguiendo la técnica de Bailey y Usama (1960), que emplea pequeñas secciones de piel de cola. Esta técnica es de fácil y rápida realización, pero tiene el inconveniente de que los trasplantes, al no estar suturados, frecuentemente se desprenden. Además, al ser muy pequeña la cantidad de piel transplantada, a veces es necesario inspeccionarla con la ayuda de una lupa. Además, se ha reportado que el rechazo de un alotransplante es más rápido utilizando piel del cuerpo que de la cola del animal, pues la primera tiene una mayor concentración de células de Langerhans que la segunda (Rosenberg y Singer, 1992). Por lo anterior, decidimos trabajar siguiendo la técnica de Billingham y Medawar (1951), que utiliza secciones de piel del dorso de los animales.

El curso del rechazo de alotransplantes lo cuantificamos arbitrariamente asignando un valor numérico al aspecto del tejido transplantado (0 = normal (coloración normal), 1 = bien (bordes rojizos), 2 = regular (irritado y rojizo), 3 = mal (inflamado), 4 = necrosado, 5 = despegado).

Como se aprecia en la figura 1.1, tanto los animales BALB/k parasitados como controles rechazaron los alotransplantes en un lapso de 7 días. No se detectó ninguna diferencia significativa en el curso del rechazo de los alotransplantes entre los animales infectados y los que habían controlado la parasitosis. No se detectó rechazo en animales BALB/k transplantados con piel de BALB/k.

TRANSPLANTES

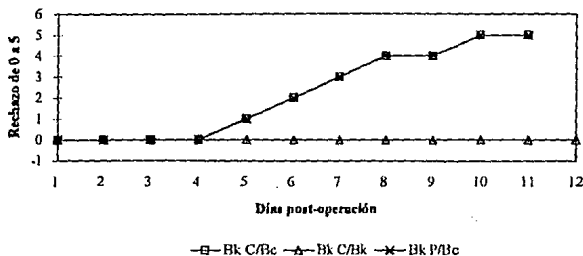


FIGURA 1.1 Transplantes de piel con animales BALB/k como receptores. Se utilizaron lotes con $n = 10$. BkC/Bk = Animal BALB/k control con piel de BALB/k; BkC/Bc = Animal BALB/k control con piel de BALB/c; BkP/Bc = Animal BALB/k parasitado con piel de BALB/c.

Los resultados obtenidos con los transplantes de animales BALB/c esencialmente son iguales a los anteriores (véase la figura.1.2). Se observó una cinética de rechazo de los alotransplantes con diferencia de un día entre los animales parasitados y los controles. Puesto que nuestro método para adjudicar valores de rechazo es subjetivo, la diferencia de un día entre los grupos control y parasitados no puede ser considerada significativa.

Siempre se observó que los animales BALB/k rechazaban los alotransplantes más rápidamente que los animales BALB/c. La diferencia entre los animales BALB/c y BALB/k controles fue mínima, pues de nueva cuenta sólo fue de un día (véase la figura 1.3). La diferencia en la cinética de rechazo entre los animales de ambas cepas parasitados sí es un poco más notoria, pues hay una diferencia de dos días (véase la figura 1.4). Sin embargo, tomando en cuenta que los animales BALB/k en general rechazan los alotransplantes un día antes que los BALB/c, la diferencia entre ambos grupos disminuye notablemente, y no se le puede considerar muy significativa.

TRANSPLANTES

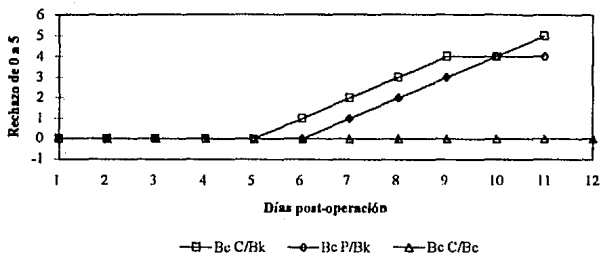


FIGURA 1.2 Transplantes de piel con animales BALB/c como receptores. Se utilizaron lotes con $n = 10$. BcC/Bc = Animal BALB/c control con piel de BALB/c; BcC/Bk = Animal BALB/c control con piel de BALB/k; BcP/Bk = Animal BALB/c parasitado con piel de BALB/k.

TRANSPLANTES

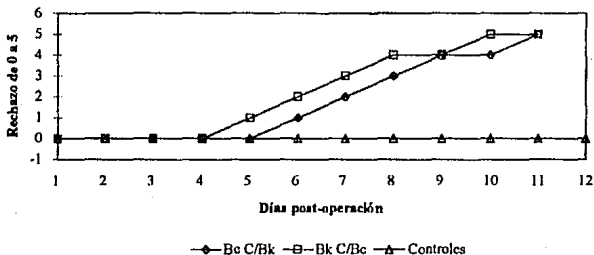


FIGURA 1.3 Transplantes de piel con animales BALB/c y BALB/k controles como receptores. Se utilizaron lotes con $n = 10$. BcC/Bk = Animales BALB/c control con piel de BALB/k; BkC/Bc = Animales BALB/k control con piel de BALB/c.

TRANSPLANTES

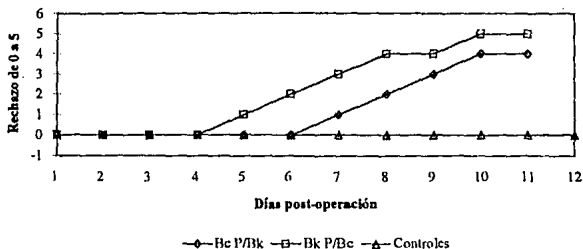


FIGURA 1.4 Transplantes de piel con animales BALB/c y BALB/k parasitados como receptores. Se utilizaron lotes con $n = 10$. BcP/Bk = Animales BALB/c parasitados con piel de BALB/k; BkP/Bc = Animales BALB/k parasitados con piel de BALB/c.

B.- REACCION MIXTA DE LINFOCITOS

Los ensayos de proliferación celular son un método confiable y de sencilla realización que permiten diagnosticar la inmunocompetencia de un animal, a pesar de que la proliferación no es una medida directa de la función efectora de los linfocitos. En general se basan en la activación específica o inespecífica de células T vírgenes, lo que lleva a la producción de citocinas, a la expresión de los receptores para las mismas, y finalmente, a la proliferación de los linfocitos activados.

El método de reacción mixta de linfocitos se basa en utilizar un tipo celular como estímulo para la proliferación de un segundo tipo celular con distinto haplotipo. El grupo de células que se emplea como estímulo antigénico es tratado con mitomicina C, que se une covalentemente al DNA e inhibe su proliferación. El grupo celular efector reconoce como antígenos ajenos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de las células estimuladoras. En nuestro caso empleamos las células de bazo de ratones BALB/k como efectoras y las de ratones BALB/c como estimuladoras.

Este experimento se llevó a cabo en ratones transplantados con el objeto de detectar si había una diferente capacidad celular de reconocimiento de aloantígenos entre los grupos parasitados y controles. Los animales BALB/k sin ninguna manipulación de cualquier modo hubiesen reaccionado contra las células de BALB/c pues tienen distinto haplotipo. Se quería determinar si la presencia constante del trasplante sensibilizaba a las células efectoras del ratón receptor durante el proceso de rechazo, y si su actividad correlacionaba con el mismo.

La técnica de reacción mixta de linfocitos requiere que se determinen experimentalmente las mejores condiciones para cada cepa murina en particular. Se ensayaron cultivos mixtos con 0.5 , 1 , 2 y 4×10^5 células efectoras y 2 , 4 y 8×10^5 células estimuladoras por pozo, cultivadas durante 4 , 5 y 6 días antes de agregar la timidina tritiada al medio de cultivo. Decidimos utilizar en nuestras determinaciones experimentales 4×10^5 células estimuladoras por pozo, y a pesar de saber que la mejor respuesta se obtiene con 2×10^5 células efectoras, también utilizamos en el ensayo 0.5 , 1 y 4×10^5 células efectoras para tener una visión más completa del fenómeno y un punto de referencia interno. La proporción $1:2$ de células efectoras:estimuladoras consistentemente presenta un buen índice de estimulación (IE).

Otro factor que tomamos en consideración para elegir esta proporción, es que es la misma que se utiliza rutinariamente en ensayos de actividad de linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos (CTL). Se obtuvo una serie de curvas de dosis/respuesta del IE ascendente al utilizar las concentraciones de 0.5 , 1 y 2×10^5 células efectoras, pero al emplear 4×10^5 células, a veces se obtienen curvas descendentes (datos no mostrados). Suponemos que esto se debe a efectos inhibitorios de la excesivamente alta concentración celular en cada pozo.

El experimento se realizó con 3 grupos de tres ratones BALB/k de cada sexo cada uno, tanto controles como parasitados. Se sacrificaron a los 5 , 7 y 9 días posteriores al trasplante para obtener sus células de bazo para el ensayo de MLR. De los tres animales de cada grupo se hizo una poza de células para la determinación. En las figuras 1. 5, 6 y 7 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos con 0.5 , 1 y 2×10^5 células efectoras y 4×10^5 células estimuladoras, respectivamente.

Como se aprecia en las gráficas, y como se apoya también en el análisis de varianza, en las determinaciones de MLR con 0.5 , y 1×10^5 células efectoras no existe una diferencia significativa en la capacidad celular de reconocer aloantígenos entre los animales control y parasitados.

MLR TRANSPLANTES
 0.5×10^5 CELULAS EFECTORAS

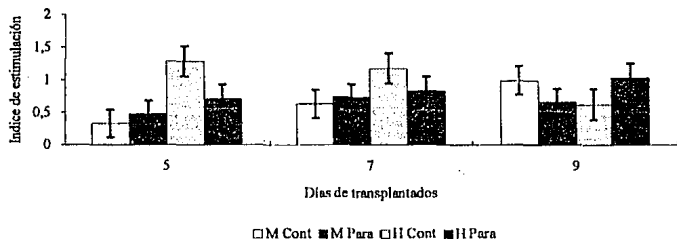


FIGURA 1.5. Reacción mixta de linfocitos empleando 0.5×10^5 células efectoras y 4×10^5 células estimuladoras. Se emplearon pozos celulares de 4 ratones cada una. M Cont = Machos control; M Para = Machos parasitados; H Cont = Hembras control; H Para = Hembras parasitadas.

MLR TRANSPLANTES
 1×10^5 CELULAS EFECTORAS

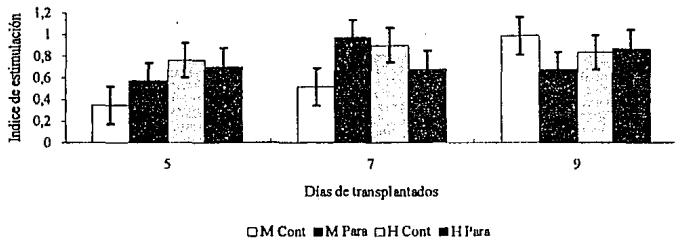


FIGURA 1.6. Reacción mixta de linfocitos empleando 1×10^5 células efectoras y 4×10^5 células estimuladoras. Se emplearon pozos celulares de 4 ratones cada una. M Cont = Machos control; M Para = Machos parasitados; H Cont = Hembras control; H Para = Hembras parasitadas.

El análisis de varianza de estas dos determinaciones MLR indica lo siguiente:

- En la determinación con 0.5×10^5 células efectoras se encontró que las diferencias entre los promedios de los índices de estimulación (IE) son significativas, con una $F = 0.0289$. Sin embargo, el análisis de la varianza atribuible a cada una de las clases indica que ningún factor (sexo, día del ensayo, ni estar o no parasitado), ni la interacción entre ninguno de ellos es significativa.
- La diferencia entre los promedios de los IE con 1×10^5 células efectoras tiene una $F = 0.1966$, y por lo tanto no es significativa.

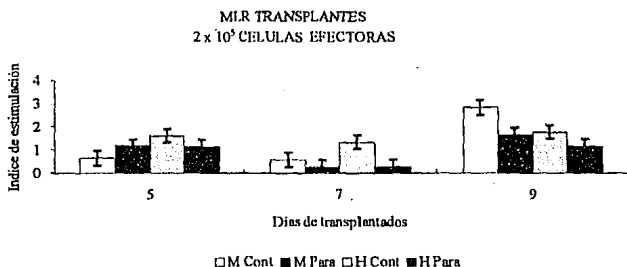


FIGURA 1.7. Reacción mixta de linfocitos empleando 2×10^5 células efectoras y 4×10^5 células estimuladoras. Se emplearon pozos celulares de 4 ratones cada uno. M Cont = Machos control; M Para = Machos parasitados; H Cont = Hembras control; H Para = Hembras parasitadas.

La determinación MLR con 2×10^5 células efectoras indica que los animales parasitados de ambos sexos presentan una menor actividad de reconocimiento de aloantígenos que los controles. Además, en esta determinación se obtuvo un IE mayor a 1 y el análisis estadístico documenta una alta significancia de las diferencias de los promedios, con una $F = 0.0001$. El análisis de la varianza atribuible a cada una de las clases indica una alta significancia de las diferencias atribuibles al factor día, con una $F = 0.0001$. El tratamiento, o sea el estar o no parasitado, también es significativo, con una $F = 0.0051$.

2.- INMUNIDAD Y CANCER

A. INOCULACION DE CELULAS HeLa

En el primer ensayo se aplicaron subcutáneamente 1×10^7 células HeLa por ratón. Esta cantidad es alta, pues en ensayos con ratones atímicos se emplean rutinariamente 1×10^6 células por animal (Ovseiovich, 1993). Decidimos, sin embargo, utilizar mayor número de células en primer término porque nuestros animales no son atímicos, y en segundo, pues no sabíamos siquiera si iban a crecer las células neoplásicas. Inicialmente se contaba con cuatro grupos experimentales; machos y hembras, parasitados y controles. Se perdió el grupo de los animales macho control. Así pues, en la primera determinación sólo cuantificamos la evolución del tumor en los restantes tres grupos. Con un vernier se midió diariamente el área aproximada del tumor de cada animal, y se obtuvieron al cabo de tres semanas los resultados que se muestran en la figura 2.1.

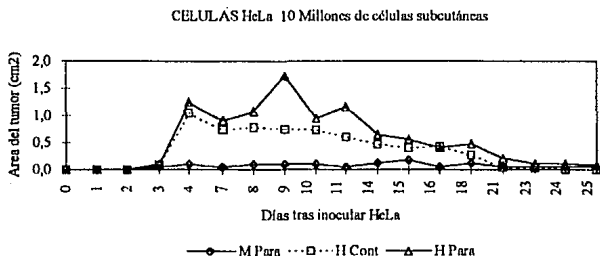


FIGURA 2.1. Crecimiento subcutáneo de células neoplásicas humanas HeLa en ratones parasitados y control. M Para = Machos parasitados (n = 2), H Cont = Hembras control (n = 6), H Para = Hembras parasitadas (n = 6)

En los animales hembra, tanto control como parasitados, la neoplasia alcanza dimensiones notables en corto plazo, aunque el área tumoral máxima sea bastante mayor en los animales parasitados.

En los animales macho parasitados el tumor nunca alcanza dimensiones considerables, a pesar de que fácilmente puede ser palpado.

En un lapso de tres semanas todos los animales ya han eliminado al tumor, el cual no volvió a aparecer durante un lapso de tres meses, tras el cual se suspendió la observación.

El análisis estadístico de estos datos indica que las diferencias observadas en el crecimiento tumoral en los tres grupos son altamente significativas ($P = > 0.05$).

Resulta evidente que el control de las células HeLa por parte de los animales de cada grupo es distinto. Nos intrigó sobremanera el hecho de observar tan marcada diferencia en las cinéticas de control del tumor, y decidimos llevar a cabo otra serie de experimentos. Con el objeto de facilitar la detección de una inmunosupresión de los animales parasitados, en esta segunda serie de experimentos inoculamos a los ratones con una dosis menor de células tumorales (4×10^6 células HeLa). En la figura 2.2 se aprecia la cinética de crecimiento de la masa tumoral en los animales de esta segunda serie.

Los machos parasitados y control presentaron un crecimiento tumoral menor que las hembras pero igual entre sí. Las hembras presentaron de nueva cuenta un mayor crecimiento tumoral que los machos, pero la diferencia entre los grupos parasitado y control fue menor que en el experimento anterior. Adicionalmente es de notarse que al utilizar una cantidad menor de células HeLa para el inóculo, las dimensiones que adquirieron los tumores fueron también menores en comparación con el primer experimento. Todos los ratones destruyeron totalmente al tumor al cabo de 17 días.

El análisis estadístico de este segundo grupo de datos indica que no existe una diferencia significativa debida a la parasitosis ($P = < 0.07$). Las diferentes cinéticas de crecimiento tumoral que se observaron entre ratones machos y hembras son significativas al 95 %.

CELULAS HeLa 4 Millones de células subcutáneas

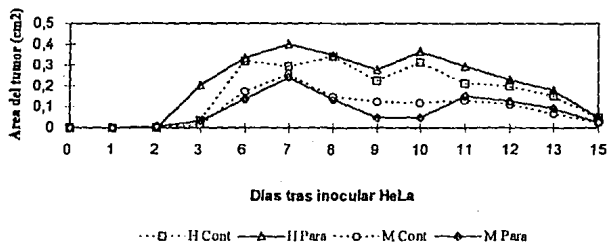


FIGURA 2.2 Crecimiento subcutáneo de células neoplásicas humanas HeLa en ratones parasitados y control. H Cont = Hembras control (n = 5); H Para = Hembras parasitadas (n = 5); M Cont = Machos control (n = 4); M Para = Machos parasitados (n = 4).

B.- ACTIVIDAD DE CELULAS NK Y CTL

A fin de contar con parámetros celulares de la eficacia del rechazo contra las células neoplásicas se cuantificaron las actividades de células asesinas naturales (NK) y de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) de animales retados con células HeLa, tanto parasitados como controles. Estos dos subtipos celulares se supone que son los más activamente involucrados en el control de células neoplásicas, aunque todavía existe cierta controversia al respecto (Mason y Morris, 1986; Yu *et al.*, 1992).

Hicimos ensayos de actividad de linfocitos NK y CTL a los 7 y 14 días posteriores a la inoculación de células HeLa, pero no obtuvimos resultados muy claros. Las células NK mostraron una actividad inconsistente, pues en algunos casos disminuía ésta al aumentar la concentración de células efectoras respecto a las células blanco YAC.1 (véanse las figuras 2.3 y 2.4)

ENSAYO NK 1 SEMANA HeLa

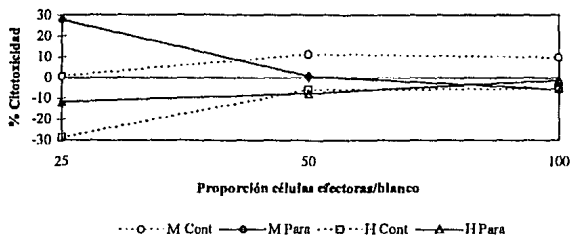


FIGURA 2.3 Actividad de células asesinas naturales (NK) contra células YAC.1. Se hicieron pozas celulares de 4 ratones para obtener las células efectoras. Se muestran las distintas actividades obtenidas con diferentes proporciones de células efectoras/ blanco.

ENSAYO NK 2 SEMANAS HeLa

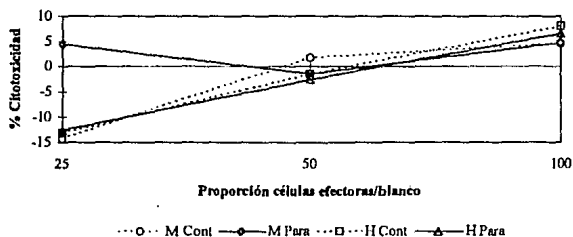


FIGURA 2.4 Actividad de células asesinas naturales (NK) contra células YAC.1. Se hicieron pozas celulares de 4 ratones para obtener las células efectoras. Se muestran las distintas actividades obtenidas con diferentes proporciones de células efectoras/ blanco.

En el ensayo de actividad de linfocitos CTL tampoco obtuvimos resultados definitivos, pues aparentemente las células HeLa mitomizadas no estimularon la proliferación de este subtipo celular. Para que los linfocitos CTL proliferen en respuesta a un antígeno es indispensable que las células que se

utilicen como estímulo antigénico presenten moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I o II. Las células HeLa, como otras células neoplásicas, no siempre presentan en su superficie moléculas del MHC clase I (Johnson y Pober, 1994). Se podría inducir la expresión de las mismas estimulándolas con IFN-gamma (Blanchet *et al.*, 1991) o caracterizar los determinantes antigénicos de las células HeLa que empleamos, pero ésto era un trabajo muy ajeno a nuestras indagaciones centrales, por lo que esta vertiente del proyecto tomó un curso distinto.

Decidimos caracterizar la actividad de células CTL de animales tanto parasitados como control empleando un blanco que sí sabemos presenta moléculas clase I.

La cepa murina BALB/c presenta el haplotipo H-2^d. Se llevó a cabo un experimento de proliferación de células de bazo de BALB/c empleando células de bazo de animales C57BL/6 (H-2^b) mótomicadas como estímulo antigénico. Una vez estimuladas las células efectoras, las retamos con un estímulo isogénico y uno alogénico. Como estímulo isogénico (control negativo de reconocimiento) empleamos la línea celular L5178Y (H-2^d) y como estímulo alogénico (control positivo) la línea celular EL4.4 (H-2^b). Los resultados obtenidos en este ensayo de actividad citolítica de las células CTL se resumen en la tabla 1.

TABLA 1.

ACTIVIDAD CTL

Células efectoras BALB/c (H-2^d) en proporción 50:1 respecto a células blanco

Animal	Iso-reconocimiento	Alo-reconocimiento
Hembra Control	2 %	15 %
Hembra Parasitada	0 %	9 %
Macho Control	2 %	21 %
Macho Parasitado	3 %	19 %

En ensayos de citotoxicidad se considera generalmente que un valor menor al 10 % no es significativo, pues refleja ruido de fondo. Así pues, se puede apreciar que las células esplénicas de los animales BALB/c parasitados y controles no reconocen a las células isogénicas L5178Y. Sin embargo sí hay diferencias en el reconocimiento del estímulo alogénico de las células EL4.4. Las hembras

parasitadas no reconocen al aloantígeno y las controles lo hacen pobremente. Los animales macho reconocen bien el estímulo antigénico, si bien los controles lo hacen un poco mejor que los parasitados.

3.- INMUNIDAD CONTRA INFECCIONES

A. COINFECCION CON *Toxoplasma gondii*

Eligimos a *T. gondii* para nuestro primer experimento de co-infección, pues es un parásito oportunista por excelencia. Este tipo de organismos suele entrar a un hospedero y permanecer latente hasta que el sistema inmune del mismo se debilita (véase el apéndice 2), por lo que, pensamos, sería un buen indicador del estado inmune general de nuestros animales experimentales.

Con el objeto de indagar si *T. crassiceps* emplea mecanismos inmunosupresores de distinta intensidad durante el curso de la infección se trataron animales con distintos tiempos de infección. En una primera sesión se trataron animales con 1 y 12 semanas de infección por *T. crassiceps*. El grupo de 1 semana supusimos que se encontraría en las etapas iniciales de la confrontación hospedero-parásito, cuando éste último está librando contra el sistema inmune del hospedero la decisiva batalla por lograr un estado favorable para su implantación y crecimiento. En contraste, en el grupo con 12 semanas de infección supusimos que el parásito ya había establecido un entorno propicio para sí en el hospedero. Para esta primera coinfección utilizamos una cepa de *T. gondii* no atenuada que se administra intraperitonealmente.

Los animales control y con 1 y 12 semanas de parasitados comenzaron a morir a partir del 5° día posterior a la inoculación de *T. gondii* (véanse las figuras 3.1, 2, 3 y 4).

COINFECCION *T. gondii* (1000 p IP.)
1 semana de infección *T. crassiceps*

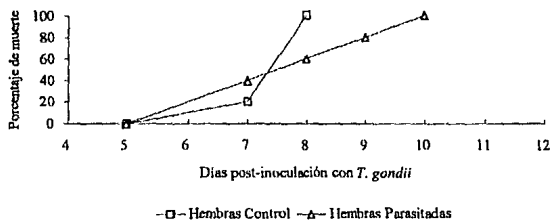


FIGURA 3.1 Co-infección intraperitoneal con *Toxoplasma gondii*. Se emplearon lotes con $n = 5$. $P = 0.82$

COINFECCION *T. gondii* (1000 p IP.)
1 semana de infección *T. crassiceps*

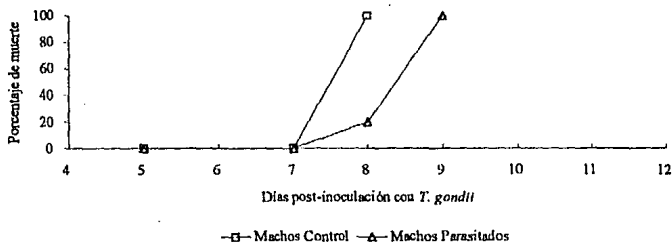


FIGURA 3.2 Co-infección intraperitoneal con *Toxoplasma gondii*. Se emplearon lotes con $n = 5$. $P = 0.045$

COINFECCION *T. gondii* (1000 p IP.)
12 semanas de infección *T. crassiceps*

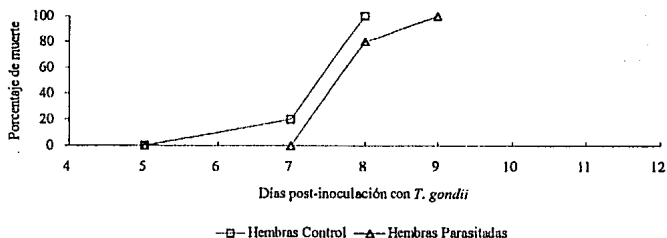


FIGURA 3.3 Co-infección intraperitoneal con *Toxoplasma gondii*. Se emplearon lotes con $n = 5$. $P = 0.26$

COINFECCION *T. gondii* (1000 p IP.)
12 semanas de infección *T. crassiceps*

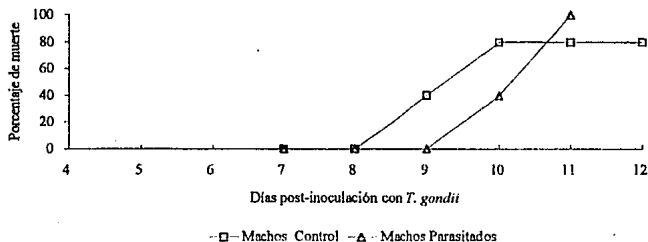


FIGURA 3.4 Co-infección intraperitoneal con *Toxoplasma gondii*. Se emplearon lotes con $n = 5$. $P = 0.3$

Los ratones macho control de este último grupo sobrevivieron durante más de dos meses. Los análisis estadísticos no otorgan mucho valor a los animales sobrevivientes, pues los consideran como parte de la cola de una distribución normal.

El hecho de haber comenzado a observar una fuerte mortalidad a apenas la semana de la inoculación con *T. gondii* nos hizo pensar que la dosis que empleamos era demasiado alta, por lo que en una segunda etapa inoculamos una cantidad 10 veces menor del protozoo. Puesto que además la cinética de mortalidad de los grupos con una y doce semanas de infección por *T. crassiceps* no era muy distinta, y por razones de tiempo, coinfectamos animales con seis semanas de parasitados.

En el grupo de las hembras la tendencia de los animales parasitados a soportar mejor la coinfección que los animales control se hizo más clara, pues ahora se observó una diferencia de diez días entre ambos grupos para obtener un 100% de mortalidad (véase la figura 3.5).

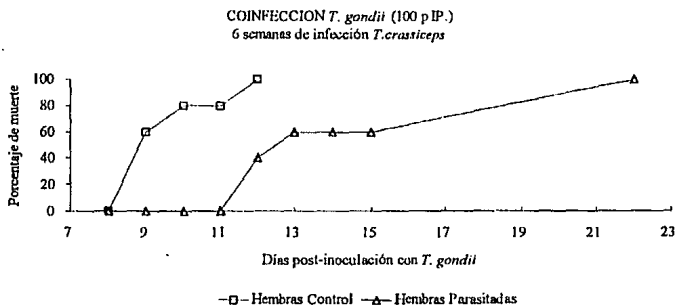


FIGURA 3.5 Co-infección intraperitoneal con *Toxoplasma gondii*. Se emplearon lotes con $n = 5$. $P = 0.04$

Los machos comenzaron a morir un poco después que la hembras, lo que nos indica que éstas son naturalmente más susceptibles a *Toxoplasma gondii* (véase la figura 3.6).

COINFECCION *T. gondii* (100 p IP.)
6 semanas de infección *T. crassiceps*

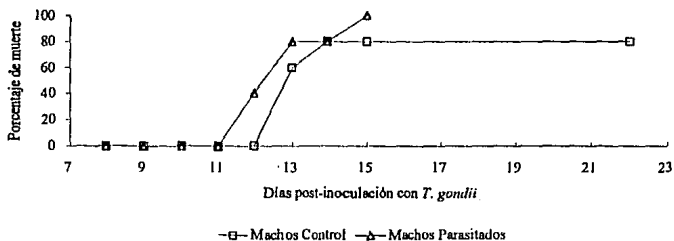


FIGURA 3.6 Co-infección intraperitoneal con *Toxoplasma gondii*, Se emplearon lotes con $n = 5$. $P = 0.29$

Con el objeto de determinar si la protección parcial de las hembras parasitadas por *T. crassiceps* a la infección intraperitoneal por *T. gondii* era generalizada, se realizó una tercera coinfección de animales con 12 semanas de infección con una cepa atenuada de *T. gondii* aplicada subcutáneamente. Los resultados se muestran en las figuras 3.7 y 3.8. Ya no se aprecia en ningún grupo una tasa de mortalidad estadísticamente diferente entre los animales parasitados y control.

COINFECCION *T.gondii* (20'000 p SC)
12 semanas infección *T.crasseiceps*

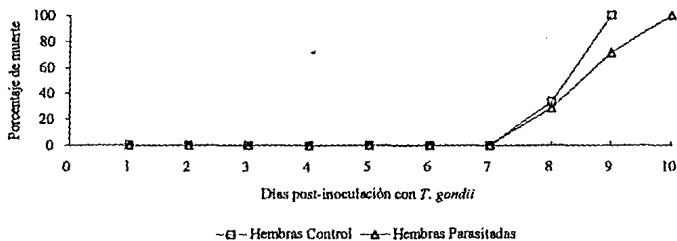


FIGURA 3.7 Co-infección subcutánea con *Toxoplasma gondii*. Hembras control n = 9, hembras parasitadas n = 7. P = 0.41

COINFECCION *T.gondii* (20'000 p SC)
12 semanas infección *T.crasseiceps*

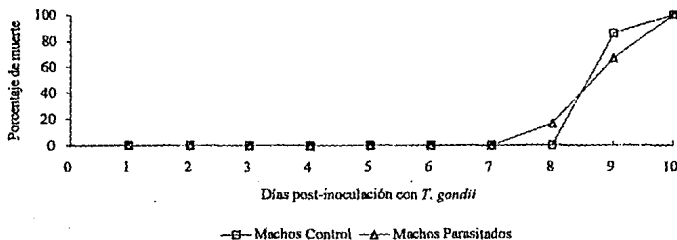


FIGURA 3.8 Co-infección subcutánea con *Toxoplasma gondii*. Machos control n = 7, machos parasitados n = 6. P = 0.93

B. COINFECCION CON *Salmonella typhimurium*.

El hecho de trabajar con el protozooario *Toxoplasma gondii* presentó el problema de que al ser muy virulento la dosis mínima letal es a veces un solo microorganismo, lo que es difícilmente manipulable. Por ello decidimos intentar una coinfección con una bacteria menos compleja y menos virulenta que el protozooario. Elegimos a *Salmonella typhimurium* (Davis *et al.*, 1983), que se puede también administrar por vía intraperitoneal u oral.

Antes de retar a animales parasitados y control establecimos la dosis letal 50 (DL 50) de la cepa bacteriana. Por vía intraperitoneal resultó ser muy virulenta, pues mató a todos los animales en un lapso de 6 días, sin mostrar grandes diferencias según la dosis de bacterias empleada (véanse las figuras 3.9 y 3.10).

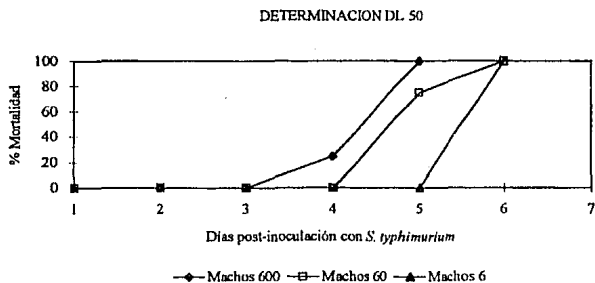


FIGURA 3.9 Determinación de la dosis letal 50 para *Salmonella typhimurium* por vía intraperitoneal. Se emplearon lotes con n = 6. Los números indican la cantidad de bacterias que fueron administradas.

DETERMINACION DL 50

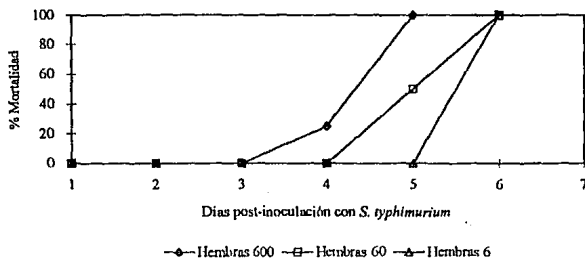


FIGURA 3.10 Determinación de la dosis letal 50 para *Salmonella typhimurium* por vía intraperitoneal. Se emplearon lotes con n = 6. Los números indican la cantidad de bacterias que fueron administradas.

Como se aprecia en las figuras, prácticamente son iguales las susceptibilidades de ambos sexos a la bacteria por esta vía de administración. Por no haber diferencia significativa entre aplicar 6, 60 o 600 bacterias, y por el hecho de que la muerte sobreviene en poco tiempo, decidimos emplear la vía de administración oral.

La cantidad de bacterias requerida para una infección por vía oral es mucho mayor que la necesaria por vía intraperitoneal. Decidimos, para una aproximación, emplear dos inóculos, de 5×10^7 y de 1×10^8 bacterias en 0.1 ml. En esta determinación fue patente el hecho de que existe una diferente susceptibilidad a *Salmonella typhimurium* entre los dos sexos (véanse las figuras 3.11 y 3.12).

DOSIS LETAL 50 ORAL *S. typhimurium*
HEMBRAS

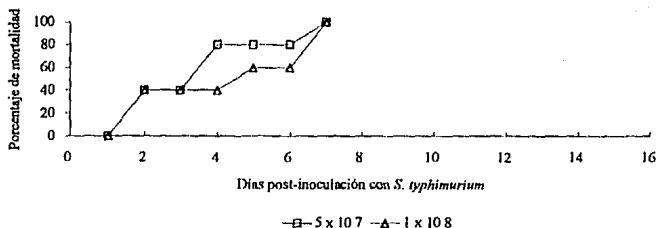


FIGURA 3.11 Determinación de la dosis letal 50 para *Salmonella typhimurium* por vía oral. Se emplearon lotes con $n = 6$. Los números indican la cantidad de bacterias que fueron administradas.

DOSIS LETAL 50 ORAL *S. typhimurium*
MACHOS

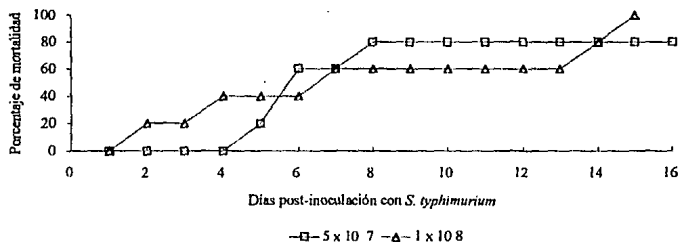


FIGURA 3.12 Determinación de la dosis letal 50 para *Salmonella typhimurium* por vía oral. Se emplearon lotes con $n = 6$. Los números indican la cantidad de bacterias que fueron administradas.

Con el objeto de ampliar un poco el lapso requerido para obtener una mortalidad del 100 % en ambos grupos, decidimos aplicarles dosis menores a los animales; a las hembras 1×10^6 bacterias y a los machos 1×10^7 . Además sangramos a los animales cada tercer día para cuantificar la bacteremia (cantidad de bacterias) en sangre.

Para tener datos de la virulencia de la cepa bacteriana empleada, se les aplicaron a animales testigo (sin ningún tratamiento) de ambos sexos dosis de medio logaritmo por arriba y medio por abajo de las empleadas con los grupos experimentales (Hembras: 5×10^6 y 5×10^5 ; Machos: 5×10^7 y 5×10^6).

Con los machos obtuvimos una mortalidad muy alta (véanse las figuras 3.13 y 3.14).

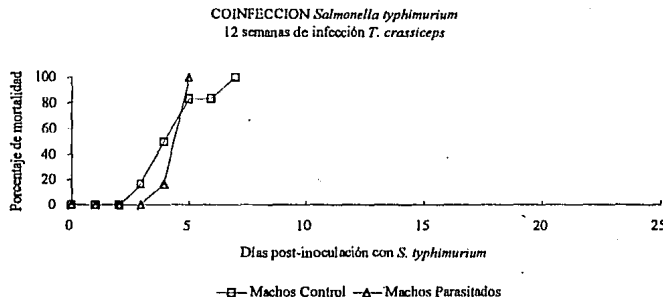


FIGURA 3.13 Co-infección oral con *Salmonella typhimurium*. Se emplearon lotes con $n = 6$. Se utilizó un inóculo de 1×10^7 bacterias.

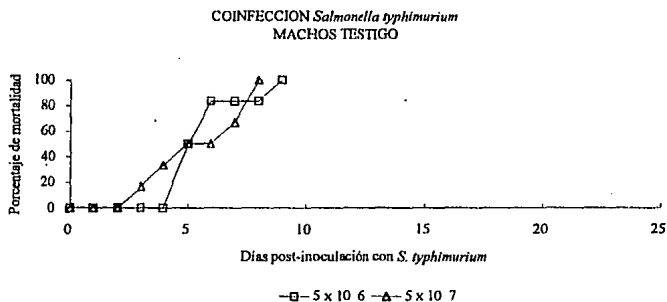


FIGURA 3.14 Infección oral con *Salmonella typhimurium*. Se emplearon lotes con $n = 6$. Se utilizaron los inóculos indicados en la gráfica.

Las bacteremias de los machos arrojan datos interesantes (véanse las figuras 3.15 y 3.16), pues los animales parasitados presentaron concentraciones bacterianas en sangre notablemente mayores que los controles. Al día 7 ya murieron todos los machos.

BACTEREMIA *Salmonella typhimurium*

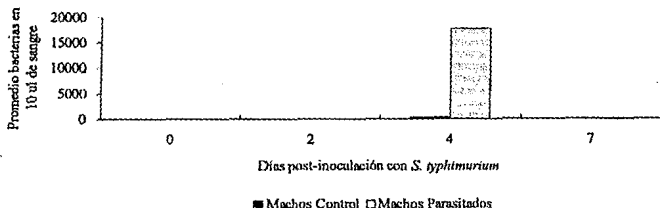


FIGURA 3.15 Bacteremia en sangre de los animales macho.

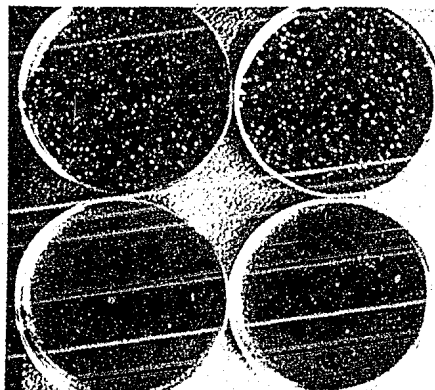


FIGURA 3.16 Cajas de Petri de la bacteremia de los animales macho control y parasitados el día 4. En la parte superior se presentan las cajas de dos animales control, y en la inferior las de dos parasitados.

La diferente cinética de mortalidad que presentaron los animales hembra parasitados y control es marcada (véase la figura 3.17) y hace patente que los primeros se ven afectados más ampliamente y en un lapso más breve que los segundos. En los animales testigo observamos una mortalidad de alrededor del 80 % (véase la figura 3.18).

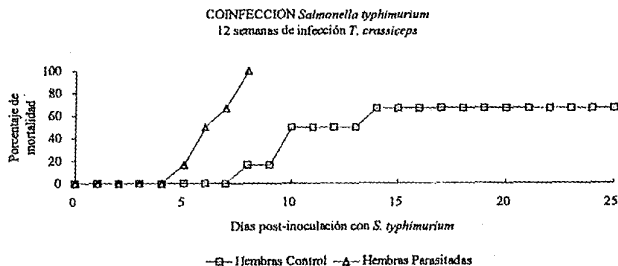


FIGURA 3.17 Co-infección oral con *Salmonella typhimurium*. Se emplearon lotes con $n = 6$. Se utilizó un inóculo de 1×10^6 bacterias.

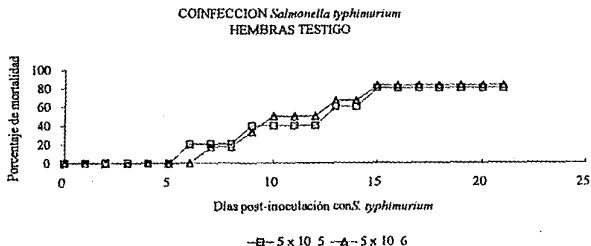


FIGURA 3.18 Infección oral con *Salmonella typhimurium*. Se emplearon lotes con $n = 6$. Se utilizaron los inóculos indicados en la gráfica.

Las bacteremias de las hembras correlacionan en mayor medida con las curvas de mortalidad (véanse las figuras 3.19 y 3.20), pues a mayores concentraciones bacterianas se observa mayor número de muertes. Al día 8 ya murieron todas las hembras parasitadas. Las controles sobrevivientes eliminaron totalmente a las bacterias en un lapso de 2 semanas.

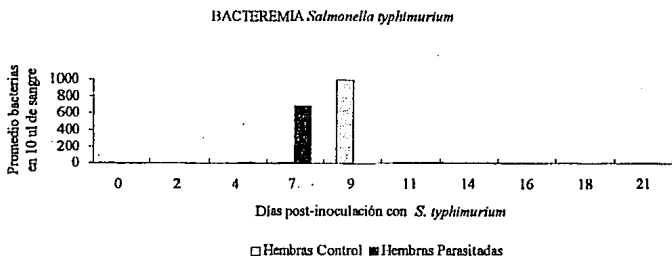


FIGURA 3.19 Bacteremia en sangre de los animales hembra.

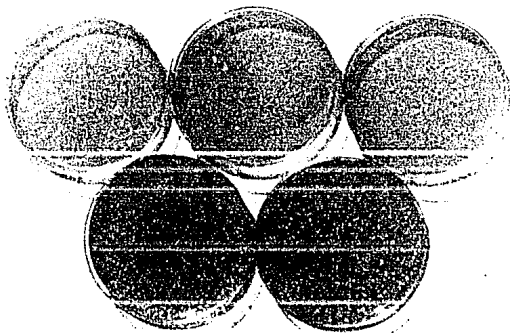


FIGURA 3.20 Cajas de Petri de la bacteremia de los animales hembra control y parasitadas el día 4. En la parte superior se presentan las cajas de tres animales control, y en la inferior las de dos parasitadas.

V. DISCUSION GENERAL

Tomando en cuenta los antecedentes que documentan alteraciones inmunológicas en los animales parasitados por *Taenia crassiceps*, realizamos ensayos para sondear la trascendencia de la inmunosupresión para la inmunidad general de los mismos.

Investigamos la inmunidad de transplante con el objeto de probar dos hipótesis. La primera era que la parasitosis, al alterar la respuesta inmune hacia la inmunidad humoral, favorecía la implantación de un tejido con haplotipo distinto al del hospedero. Esto lo hicimos tomando en cuenta que se ha descrito que una respuesta celular de tipo TH1 es la preferencialmente involucrada en la eliminación de alotransplantes (Dallman *et al.*, 1993). La segunda era que la tolerancia que *T. crassiceps* induce para sí mismo es extensiva a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de la cepa murina BALB/c. Algunas proteínas de *T. crassiceps* son similares a las del MHC de los ratones BALB/c (Sciutto, com. pers.), y al inducir tolerancia hacia ellas aventuramos que podría inducirla también hacia el MHC de BALB/c.

Todos los animales, parasitados o no, rechazaron los alotransplantes en tiempos similares. El rechazo de los alotransplantes lo evaluamos de manera arbitraria, por lo que no sabemos qué tanto crédito otorgar a la ligera diferencia de un día que observamos en algunos casos. El ensayo de reacción mixta de linfocitos (MLR) es uno de los más indicados para evaluar la capacidad celular de una cepa para detectar células con haplotipos diferentes, por lo cual lo realizamos para establecer si las pequeñas diferencias en las cinéticas de rechazo eran significativas o no.

Los resultados de los ensayos de MLR apuntan a que los animales parasitados tienen menor capacidad de detección y eliminación de tejidos ajenos que los animales control. Pensamos, sin embargo, que las pruebas *in vitro* no reflejan en su totalidad el complejo proceso de rechazo de un alotransplante. La respuesta a la pregunta específica de si las células de los animales parasitados son menos capaces de enfrentarse a aloantígenos que las de los animales control es afirmativa. Sin embargo, si el animal parasitado entero se comporta igualmente capaz que uno control para rechazar un tejido ajeno, quizá

deba atribuirse más crédito a esta segunda respuesta que a la prueba que pretende ser un correlato de ésta.

De la misma manera, los estudios de la inmunidad hacia el cáncer indican que los animales parasitados controlan el reto antigénico en tiempos similares a los controles, si bien las pruebas *in vitro* de la actividad de las células CTL indicaron algunas diferencias entre las hembras parasitadas y control. En el primer experimento las hembras parasitadas presentan un mayor crecimiento de células HeLa que las controles. Aunque en el segundo el crecimiento en ambos casos es menor, las parasitadas siguen presentando mayor masa neoplásica que las controles. Sin embargo, todos los ratones rechazaron la neoplasia.

Resulta interesante el hecho de que la actividad de las células CTL corresponda a la cinética de proliferación de HeLa durante los primeros días: una baja actividad CTL corresponde a un crecimiento neoplásico relativamente alto, y viceversa. Se puede pensar que las células HeLa crecen notablemente mejor en los animales hembra que en los macho debido a que esta línea celular proviene de un carcinoma cérvico-uterino, y que algún factor femenino, como los estrógenos, estimula su crecimiento. Sin embargo, nuestros datos de ninguna manera presentan pruebas contundentes de ello.

La infección por *T. crassiceps* resulta en una protección parcial ante la coinfección intraperitoneal por *Toxoplasma gondii*, pero esta protección desaparece cuando el protozoario se administra subcutáneamente. Los resultados obtenidos con la coinfección intraperitoneal son contrarios a nuestra hipótesis de que los animales parasitados serían más susceptibles que los animales control, pero los de la coinfección subcutánea no. Es indudable que los microambientes que imperan en cada tejido o zona morfológica del animal son determinantes para el curso de cualquier infección. Una novedosa manera de abordar este tema es la llamada "inmunoeología", que considera al hospedero como un medio ambiente con distintos nichos, en donde hay depredadores y presas (Seed, 1993; Wassom, 1993). En este sentido *Taenia crassiceps* y *Toxoplasma gondii* son organismos que intentan colonizar el mismo nicho ecológico, el peritoneo del animal, pues en él fueron inoculados. En este nicho las células del sistema inmune hacen las veces de depredadores, y controlan las poblaciones de presas. Los cisticercos alojados en el peritoneo del ratón no son rechazados por las células del sistema inmune

de éste, pero sin duda sí las estimulan, ya sea positiva o negativamente, como se ha reportado para éste y otros parásitos (Williamson and Greenwood, 1978; Scott and Farrel, 1981; Petersen *et al.*, 1982; Ramalho-Pinto *et al.*, 1984; Good and Miller, 1976; Molinari *et al.*, 1989; *Ibid.*, 1993; y véase además el apéndice 2). Entre las células que probablemente se hallen estimuladas positivamente se encuentran los macrófagos peritoneales, y son éstos los que podrían estar ocasionando la diferente cinética de mortalidad. Al hallarse activados, fácilmente podrían afectar a *Toxoplasma gondii*, por lo menos en un inicio, dando como resultado que los animales parasitados tengan mayor sobrevivida.

Para estudiar el papel que los macrófagos peritoneales desempeñan en ese comportamiento y para desenmascarar una posible inmunosupresión en otras regiones del aparato inmune, se realizó la serie de coinfecciones subcutáneas con *Toxoplasma gondii*. Los datos de la coinfección subcutánea comprueban que la resistencia relativa de los animales parasitados está limitada al peritoneo y tal vez dependa de los macrófagos peritoneales, o algún otro tipo celular en la cavidad peritoneal, que por su estado de activación son capaces de interferir con la infección por *Toxoplasma gondii*, mas no logran eliminarlo por completo. Este resultado indica que las condiciones inmunológicas que imperan en cierto nicho, no necesariamente son extensivas al resto del hospedero.

Las coinfecciones con *Salmonella typhimurium* indican que los animales parasitados son más susceptibles que los controles. Las curvas de mortalidad y las cifras de bacteremia así lo indican.

Se puede argumentar que la cinética de mortalidad y la bacteremia son dos funciones relacionadas entre sí, o que no existe un vínculo causal inmediato entre ellas. La parasitosis por *T. crassiceps* seguramente afecta a los animales hospederos de distintas maneras, y a distintos niveles. Esto puede conducir a que la susceptibilidad a *Salmonella typhimurium* no esté directamente relacionada con el número de bacterias. Se podría pensar que la virulencia de las bacterias, o la susceptibilidad de los ratones a las toxinas bacterianas son algunos de los parámetros realmente determinantes para la mortalidad. Un punto a favor de que la determinación de bacterias en sangre es un parámetro válido del estado de salud de los animales es que, en el curso del experimento, nos sirvió para predecir certeramente qué ratones iban a morir en los próximos días. Creemos que el hecho de que la bacteremia

tuviera valor predictivo de la evolución de las curvas de mortalidad es un fuerte apoyo a nuestra idea de que ambas funciones están relacionadas entre sí.

La inmunidad contra *S. typhimurium* se basa, en primera instancia, en la producción de anticuerpos que opsonizan al microbio, y en segunda, en la aniquilación de los mismos por parte de los macrófagos (Davis *et al.*, 1983). Tomando en cuenta que los animales parasitados presentan una inmunidad de tipo TH2, sería de esperarse que contendieran eficazmente contra la bacteria, pues este tipo de inmunidad preferencialmente es humoral (Sher y Coffman, 1992). Se ha reportado que los ratones parasitados por *T. crassiceps* producen niveles considerables de anticuerpos contra el parásito (Terrazas *et al.*, 1994), pero no se han hecho estudios acerca de la capacidad de los mismos para producir anticuerpos contra otros antígenos. Los animales parasitados probablemente no puedan montar una respuesta humoral efectiva contra otros antígenos porque su sistema TH2 ya está "gastado", o porque el parásito de alguna manera restringe los isotipos disponibles para formar inmunoglobulinas. El papel que desempeñan los macrófagos no puede ser evaluado correctamente en los animales parasitados hasta que se haya resuelto lo anterior, pues éstos difícilmente podrán fagocitar bacterias no opsonizadas, independientemente de su estado de activación.

En los experimentos aquí presentados las hembras, en general, fueron menos eficaces que los machos para enfrentar los distintos retos antigénicos y patogénicos a que los sometimos. Nos parece que en el caso de la interacción entre el sistema inmune y el sexo de un individuo no se puede hablar de generalidades, sino más bien de casos particulares. Si bien se ha documentado ampliamente que, en general los andrógenos y los progestágenos inhiben la respuesta inmune, mientras que los estrógenos muestran la tendencia opuesta (Grossman, 1984; *Ibid*, 1985; Ahmed *et al.*, 1985; Alexander y Stimson, 1988; Schuurs y Verheul, 1990), los resultados obtenidos en nuestro laboratorio acerca del efecto inmunodepresor del 17-beta-estradiol (Larralde *et al.*, en prensa; Terrazas *et al.*, 1994) y los datos presentados en esta tesis indican lo contrario.

Es pues evidente que el cisticerco de *Taenia crassiceps* logra permanecer en el hospedero sin interferir letalmente con el funcionamiento del sistema inmune del mismo. Esto es una importante

lección que necesita ser estudiada a mayor profundidad y que ofrece la posibilidad de tener aplicaciones principalmente en el campo médico de la inmunología de transplantes.

Los mecanismos por los que *T. crassiceps* logra su permanencia en el hospedero parecen no ser ni exclusivamente inmunosupresores ni establecedores de tolerancia general a aloantígenos particulares, que serían dos vías para acceder a un estado propicio para su proliferación. La diferencia entre inmunosupresión y tolerancia es, tal vez, sólo importante desde el punto de vista conceptual, pues la primera puede tener como resultado la segunda. Una de las principales diferencias entre los mecanismos supresores de la respuesta inmune (véase el apéndice 2) y los inductores de tolerancia (véase el apéndice 1) es que los primeros se pueden establecer en cualquier momento, mientras que los segundos principalmente se establecen durante la ontogenia y después se auto-mantienen (Wood, 1992; Qin *et al.*, 1993). Además, la inmunosupresión no es específica, pues permite el desarrollo de patógenos en general, mientras que la tolerancia es muy específica para un conjunto de antígenos. Otra diferencia importante es que la inmunosupresión es un fenómeno que afecta al animal en su totalidad, mientras que la tolerancia puede estar localizada en algún tejido o zona morfológica (Grossman *et al.*, 1986; Coutinho *et al.*, 1993).

La relación hospedero-parásito debe ser una combinación delicada de un sistema inmune tanto suprimido como vigorosamente efectivo (Grossman *et al.*, 1986). Debe estar suprimido en la vecindad inmediata del parásito, mientras que debe ser efectivo en otras partes del cuerpo del hospedero para prevenir invasiones adicionales desde el interior o el exterior. Este estado caracterizado por una tolerancia localizada y una resistencia periférica se conoce como inmunidad concomitante (Ibid.).

Queda , pues, la impresión de que el cisticerco de *T. crassiceps* no induce un estado de inmunosupresión ni una tolerancia a aloantígenos de manera generalizada, sino que más bien induce un estado de inmunidad concomitante.

El equilibrio entre el establecimiento de una inmunosupresión generalizada o un estado de inmunidad concomitante es muy delicado, y probablemente se sobrelape en algunas regiones. Nuestro protocolo de investigación indagó sobre aspectos particulares de la respuesta inmune, y en algunos casos pudo haber incidido sobre estas regiones de sobrelapamiento. Los animales parasitados en general

responden muy bien a los diversos retos antigénicos a que los sometimos, y sólo en algunas ocasiones notamos una cierta incapacidad de respuesta efectiva.

Es precisamente en las respuestas inmunológicas afectadas en los animales parasitados donde se tienen que continuar las investigaciones aquí comenzadas. Ellas son la punta del hilo que debemos jalar, para ir deshaciendo y comprendiendo la complicada madeja de interacciones que se establecen entre el hospedero y el parásito.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los objetivos que nos propusimos al realizar esta tesis podemos concluir lo siguiente:

- 1.- La parasitosis por *Taenia crassiceps* no genera un estado de inmunosupresión generalizada, pues las alteraciones inmunológicas no son demasiado profundas, y parecen ser casi exclusivamente específicas para *T. crassiceps*.
- 2.- Los ratones presentan una susceptibilidad notoriamente diferente a los retos antigénicos dependiendo de su sexo. En general, las hembras fueron menos eficaces que los machos para enfrentar a los patógenos que utilizamos.
- 3.- Se detectaron actividades celulares particulares (MLR y CTL) cuyo funcionamiento se halla un tanto disminuido en los animales parasitados.
- 4.- Se estableció la importancia de los nichos del hospedero y de las células inmunes de los mismos en el curso de una infección, ya sea ésta primaria o secundaria.

La perspectiva más importante de este trabajo es encontrar el medio por el cual el cisticerco de *T. crassiceps* es capaz de inducir un estado de inmunidad concomitante que permite su implantación definitiva en el hospedero sin afectar drásticamente su responsividad inmunológica ante otros retos. Se podría emplear este conocimiento para mejorar la sobrevida de órganos transplantados y se eliminaría la necesidad de emplear esquemas de inmunosupresión generalizada con fármacos, que tienen muchos efectos secundarios y no garantizan la aceptación del tejido ajeno (Kahan, 1992).

APENDICE 1

SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION PARASITARIA

A.-CISTICERCOSIS MURINA POR *Taenia crassiceps*: UN MODELO EXPERIMENTAL.

El metacéstodo (cisticerco) de *Taenia crassiceps* causa una infección crónica, durante la cual el parásito se reproduce constantemente de manera asexual por gemación, sin aparentemente afectar la salud del organismo hospedero (Larralde *et al.*, 1989). El ciclo de vida de este parásito se muestra en la figura 1.

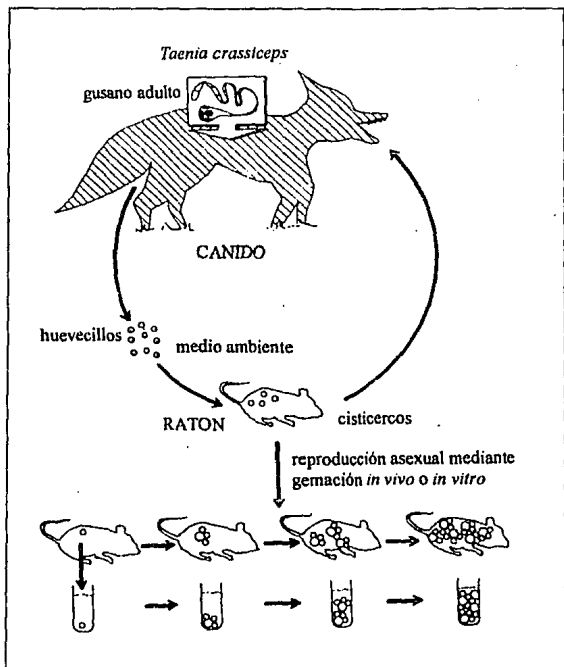


FIGURA 1 Ciclo de vida del platelminto *Taenia crassiceps*.

En el modelo de cisticercosis experimental murina se inoculan metacéstodos en la cavidad peritoneal de ratones jóvenes. Al cabo de unas cuantas semanas se pueden recuperar de esta cavidad gran cantidad de parásitos (véase la figura 2). Dado el tamaño macroscópico de *T. crassiceps*, es sencilla la cuantificación de la carga parasitaria, pues se pueden contar los cisticercos a simple vista.

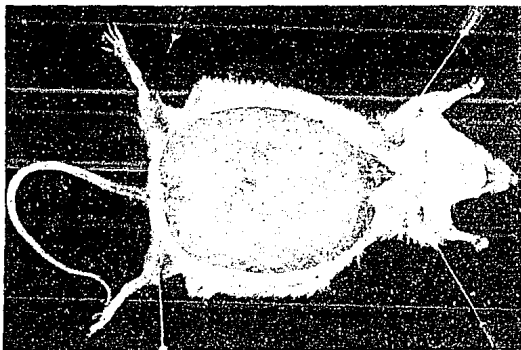


FIGURA II.2 Ratón con tres meses de infección experimental por *Taenia crassiceps*.

Un aspecto importante del modelo de cisticercosis experimental murina con *Taenia crassiceps* es que presenta similitudes a la teniasis/cisticercosis causada por *Taenia solium*. Existe parecido estructural y morfológico entre los distintos estadios del ciclo de vida de ambos (Larralde *et al.*, 1989; Sciutto *et al.*, 1990), pero no siempre la semejanza morfológica implica similitud en las respuestas inmunológicas que dos organismos patógenos desencadenan en un hospedero (véase el apéndice 2). Si lo anterior es cierto, todavía es más difícil encontrar importantes puntos de unión en parasitosis que involucran hospederos finales e intermediarios diferentes. El caso de *T. crassiceps* es por lo tanto importante, pues además de las semejanzas estructurales que presenta con *T. solium*, comparte importantes antígenos con el causante de la cisticercosis humana. El grado de semejanza entre los antígenos de ambos céstodos es

tal, que se ha estandarizado un método diagnóstico para la cisticercosis humana por *T. solium* empleando antígenos del fluido vesicular de *T. crassiceps* (Larralde *et al.*, 1990).

B.- DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION ASOCIADA A FACTORES GENETICOS

En ratones con distintas cargas genéticas se ha documentado una diferente respuesta inmune a varias infecciones parasitarias, así como una diferente susceptibilidad innata a las mismas (Wakelin, 1990; Sciuotto *et al.*, 1991). Sin embargo, la relación directa de estas diferencias con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) sólo se ha encontrado en algunos casos.

El caso mejor estudiado de resistencia asociada a factores genéticos es el de infecciones experimentales con *Leishmania* en distintas cepas murinas, aunque también hay estudios menos conocidos con tripanosomas, esquistosomas y triquinas (Sher y Coffman, 1992). Un aspecto importante de los modelos parasitarios animales es que permiten documentar el control genético de muchas infecciones, lo cual parece reflejar los polimorfismos que controlan el procesamiento de los patógenos y sus antígenos por parte del hospedero.

La susceptibilidad murina a la cisticercosis por *Taenia crassiceps* ha sido estudiada por Sciuotto *et al.* (1991) con gran detalle, y se conoce la influencia que el complejo H2 del MHC ejerce sobre el curso de la infección. La cepa murina BALB/k es más resistente a la infección experimental por cisticercos de la cepa ORF que la cepa BALB/c, como se muestra en la tabla 1.

TABLA 1

Media (\pm SEM) del número de *Taenia crassiceps* recuperados de la cavidad peritoneal de 10 ratones machos y hembras congénicos BALB/c después de 30 días de infección con 10 cisticercos de las cepas ORF o HYG / por ratón

Cepa murina	Haplotipo H-2	Sexo	Promedio de la carga parasitaria ORF	Promedio de la carga parasitaria HYG
BALB/c	d	Hembra	138.3 \pm 13	29.4 \pm 9.5
		Macho	18.8 \pm 4.6	2.4 \pm 0.9
BALB/b	b	Hembra	52.1 \pm 17.8	4 \pm 1.2
		Macho	0 \pm 0	0 \pm 0
BALB/k	k	Hembra	54.2 \pm 23.3	3 \pm 0.6
		Macho	1.7 \pm 0.9	0 \pm 0

Tomado de Sciutto *et al.*, 1991.

C.- DIFERENTE SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCION ASOCIADA AL SEXO

Históricamente los campos de la reproducción y la inmunología han sido considerados como áreas biológicas diferentes. A pesar de que en 1898 Calzolari observó que los timos de animales castrados antes de la madurez sexual eran mayores que los de animales controles, lo que era un primer puente entre ambas disciplinas, no fue hasta los años setenta en nuestro siglo que se comenzó a estudiar sistemáticamente esta asociación (Grossman, 1985). En estudios en animales se observó que, en general, las hembras presentan una respuesta inmune humoral y celular superior a la de los machos. Simultáneamente, en la práctica clínica se observó que las mujeres son más resistentes a varias infecciones que los hombres, lo cual correlaciona además con su mayor longevidad (Ahmed *et al.*, 1985; Bundy, 1988). Esta aparente ventaja de las mujeres y animales hembra, sin embargo, tiene el inconveniente de también acarrear una mayor incidencia de enfermedades auto-inmunes (Ahmed *et al.*, 1985; Bundy, 1988; Schuurs y Verheul, 1990).

Una vez que se retomó el interés integrativo por buscar relaciones entre los distintos sistemas corporales, comenzó a generarse gran cantidad de datos interesantes. Sin embargo, los frutos de este trabajo interdisciplinario distan mucho de haber formado un cuerpo coherente de información, pues ahora es evidente la heterogeneidad de las respuestas inmunes de hembras y machos ante diversos estímulos (Schuurs y Verheul, 1990). Sin embargo, no se puede negar la influencia que las hormonas sexuales ejercen sobre la reactividad tanto hetero- como auto-inmune. En términos generales, los andrógenos y los progestágenos apagan las respuestas inmunes, mientras que los estrógenos muestran la tendencia opuesta (Grossman, 1984; *Ibid.*, 1985; Ahmed *et al.*, 1985; Alexander y Stimson, 1988; Schuurs y Verheul, 1990), pero los trabajos realizados con *T. crassiceps* son una excepción, pues demuestran el efecto inmunodepresor de los estrógenos (Larralde *et al.*, en prensa; Terrazas *et al.*, 1994). Los mecanismos precisos de unión entre los sistemas inmunológico y endócrino no se conocen aún, pero sí se ha documentado en bastante detalle la comunicación bidireccional entre tipos celulares de ambos mediante tanto citocinas como hormonas peptídicas (Blalock, 1989). Estudios que relacionan al sistema inmune con el sistema nervioso central han arrojado datos interesantes. Por ejemplo, se ha caracterizado la relación aproximada entre el estrés, los péptidos opioides y el sistema inmune (Shavit *et al.*, 1985) y la baja respuesta inmunológica después de inducir estados depresivos mediante la hipnosis (Zachariae *et al.*, 1991). Se han relacionado también las diferentes respuestas inmunológicas asociadas al sexo con distintos haplotipos del MHC (Weinstein *et al.*, 1984).

En general los roedores hembra son más resistentes que los machos a las infecciones parasitarias (Schuurs y Verheul, 1990), sin embargo, la infección por *Taenia crassiceps* constituye, pues, un caso particular.

Las hembras de la cepa BALB/c son naturalmente más susceptibles que los machos a la infección intraperitoneal con metacéstodos de *T. crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1991; véase la tabla 1). La gonadectomía, sin embargo, tiende a igualar las susceptibilidades de ambos sexos, pero sólo lo hace en animales inmunológicamente intactos (Huerta *et al.*, 1992). El efecto gonadal sobre el curso de la infección probablemente está mediado por el sistema inmune, pues los principales esteroides sexuales no afectan directamente al parásito en cultivos *in vitro* (*Ibid.*). Puesto que la irradiación subletal aumenta la

intensidad de la infección en animales hembra gonadectomizados y macho intactos, mientras que no varía la de los hembra intactos y macho gonadectomizados, se postula que los eventos inmunológicos que controlan el crecimiento de los cisticercos son estimulados por los testículos e inhibidos por los ovarios (Ibid.).

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio muestran que *Taenia crassiceps* es capaz de feminizar endocrinológicamente a sus hospederos machos para favorecer un ambiente permisivo a su propagación (Larralde *et al.*, en prensa). Los animales macho parasitados presentan concentraciones séricas de la hormona femenina 17-beta-estradiol semejantes a las de hembras control de la misma edad, y también una notable disminución de los niveles normales de testosterona. Las hembras parasitadas tienen niveles hormonales ligeramente superiores a las hembras control durante las etapas iniciales de la infección, pero después se igualan (Ibid.). Suponemos que el parásito manipula las gónadas del hospedero, pues en cultivos *in vitro* el cisticercos no sintetiza 17-beta-estradiol, principal causante de este desarreglo endocrinológico (Ibid.). Esto constituye una novedad, pues este es el primer reporte de que un parásito emplea las gónadas de su hospedero para indirectamente controlar al sistema inmune en su beneficio.

Un estudio con el helminto *Parastromylus malayensis* indica que la gonadectomía de las ratas macho, normalmente más susceptibles que las hembras, disminuye su carga parasitaria (Kamis *et al.*, 1994). La reconstitución hormonal de estos animales con estradiol aumenta el número de parásitos, y se postula que se debe a que esta hormona suprime la respuesta inmunológica (Ibid.). Se implica que la testosterona está siendo aromatizada a estradiol en los animales macho parasitados, pero no se menciona qué mecanismo se está utilizando para lograrlo. También hay un reporte de que la infección experimental murina por *Toxoplasma gondii* crea problemas en la capacidad reproductiva de los animales afectados (Stahl *et al.*, 1994). Sin embargo se demuestra que esto se debe a la disfunción gonadal resultante de las alteraciones hipotalámicas causadas por el patógeno, mas no a desarreglos endocrinológicos directamente asociados a la parasitosis.

Un caso interesante de mencionar en esta sección es el de la castración parasitaria. Consiste en que un parásito modifica las características sexuales secundarias de su hospedero, y también su

comportamiento. El caso que mejor se conoce es el de los crustáceos parásitos del orden de los rizocéfalos. Una larva de los rizocéfalos penetra a un cangrejo macho susceptible y crece en su interior ramificándose. Esta parasitosis ocasiona que el cangrejo macho se feminice en sus caracteres sexuales secundarios, como el tamaño y forma de sus palpos y caparazón, a pesar de que sus gónadas no se atrofian directamente como consecuencia de la infección (Rubiliani-Durozoi *et al.*, 1980). Además, el patógeno forma una estructura externa con órganos sexuales muy parecida a los sacos con huevecillos en el abdomen de las hembras. El animal macho parasitado cuida de esta bolsa como lo hacen las hembras y frecuenta zonas favorables al crecimiento de los huevecillos, lo que es una modificación del comportamiento habitual del hospedero macho (Phillips y Cannon, 1978).

D.- FACTORES INMUNOLOGICOS EN EL CONTROL DE LAS PARASITOSIS.

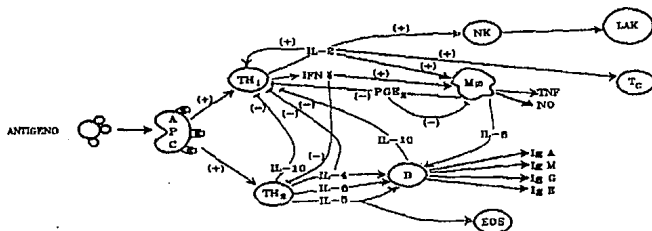
La mayor parte de las vacunas utilizadas exitosamente en la actualidad se supone actúan al inducir anticuerpos neutralizantes, fijadores del complemento u opsonizantes de patógenos virales o bacterianos. Se considera incluso la capacidad de inducir la producción de anticuerpos como uno de los parámetros importantes para evaluar la efectividad de una nueva vacuna. Sin embargo, muchos de los patógenos más comunes del mundo no son vulnerables *in vivo* al ataque de los efectores humorales aislados (James y Scott, 1988). La protección en estos casos requiere la participación de la inmunidad mediada por células para el reclutamiento y estimulación de células que, ya sea solas o en combinación con los anticuerpos, destruyen al patógeno.

A pesar de los esfuerzos que se han realizado al respecto, todavía no existen vacunas eficaces contra la mayoría de las muchas enfermedades parasitarias humanas (Sher, 1988; véase apéndice 2). La única excepción sería la malaria, contra quien ya se creó una vacuna sintética (Patarroyo *et al.*, 1988), cuya efectividad ha ocasionado grandes controversias.

De estudios en modelos animales se desprende que los linfocitos T y las citocinas que producen desempeñan un importante papel en el desarrollo de una infección parasitaria, en términos tanto de la

inmunidad protectora, como de la inmunopatología resultante. De particular relevancia es el descubrimiento de que diferentes infecciones parasitarias, en el contexto de distintas bases genéticas de los hospederos, pueden desencadenar respuestas polarizadas de las subclases de linfocitos T CD4⁺ (Sher y Coffman, 1992). Se conoce bastante bien, aunque aumenta día a día, la intrincada red de interacciones celulares mediada por citocinas (Balkwill y Burke, 1989; Burke *et al.*, 1993). El conjunto de citocinas que una subclase de linfocitos T CD4⁺ puede sintetizar, y que correlaciona con sus propiedades funcionales, sirvió de base para dividirlos; Los linfocitos T CD4⁺ capaces de producir IL-2 e IFN-gamma son llamados células TH1, y aquellos que secretan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 se denominan células TH2 (Mosmann y Coffman, 1989). Las células TH1 estimulan preferencialmente la inmunidad celular, mientras que las TH2 la inmunidad humoral (véase la figura 3).

FIGURA 3



Esquema de interacciones de las subclases de linfocitos T CD4⁺ TH1 y TH2. Las flechas punteadas indican un efecto estimulador y las romas uno inhibitorio. Abreviaturas: APC: célula presentadora de antígeno; NK: célula asesina natural; LAK: linfocito activado por citocinas; Tc: linfocito T CD4⁺ citotóxico; Mφ: macrófago; B: linfocito B; EOS: eosinófilo; IL: interleucina; IFN: interferón; PGE: prostaglandina E; TNF: factor de necrosis tumoral; NO: óxido nítrico; Ig: inmunoglobulina.

Tomado de Cox y Liew, 1992.

El tipo de citocinas que se producen por los linfocitos T CD4⁺ en respuesta a la infección parasitaria es crucial, pues de él depende en gran medida el posterior control de la infección o la promoción de la enfermedad (Sher y Coffman, 1992). Las primeras etapas de la confrontación de las células efectoras con el parásito son de gran importancia, pues de ellas depende la subclase de células T que se verá preferencialmente activada. Se han realizado estudios diversos para entender cómo es que se da esta activación preferencial de una subclase u otra, y se sabe que aunque todas las citocinas juegan un papel importante, sólo son dos las que *in vivo* pueden desviar la inmunidad hacia uno o el otro tipo; el IFN-gamma favorece la diferenciación de las células TH1, mientras que la IL-4 la de las TH2 (Gajewski *et al.*, 1989; Coffman *et al.*, 1991). Es importante recalcar que la activación de una subclase de linfocitos T CD4⁺ conduce a una auto-estimulación de las células involucradas, mientras que inhibe la capacidad de activación celular, de síntesis de citocinas y de respuesta a las mismas de la otra subclase. Esta regulación cruzada puede ser importante para determinar la supervivencia del parásito.

Los linfocitos T CD8⁺ parece que también desempeñan un papel efector/regulatorio en la inmunidad contra los parásitos y la inmunopatología, pero apenas recientemente se comienzan a comprender los mecanismos que subyacen a su activación y funciones (Sher y Coffman, 1992). Se había pensado hasta hace poco tiempo que los linfocitos T CD8⁺ eran simplemente citotóxicos, pero se descartaba que jugaran un papel importante en la regulación del sistema inmune.

Ahora se postula que existen dos diferentes subclases de células CD8⁺, con distintos patrones de secreción de citocinas, y que éstas regulan la actividad de los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos B (Kemeny *et al.*, 1994). La división de las células CD8⁺ también se basa en los diferentes patrones de secreción de citocinas de las dos subclases; las células de tipo 1 secretan IFN-gamma y las de tipo 2 IL-4, IL-5, IL-10 e IFN-gamma (Ibid.). A pesar de la similitud en los patrones de secreción de citocinas con las subclases TH1 y TH2 de linfocitos T CD4⁺, no se ha establecido formalmente una correlación entre ambos tipos celulares. La relación que se ha encontrado hasta ahora es más indirecta; se lleva a cabo mediante la regulación de la producción de IgE por parte de los linfocitos T CD8⁺. Hay células CD8⁺ supresoras específicas para la producción de IgE, pero su depleción causa efectos más complejos que simplemente reducir la ocurrencia de este isotipo (Ibid.). Se supone que las células CD8⁺ inhiben sobre

todo a los linfocitos T CD4⁺ TH2, pero también en menor grado a los TH1 (Ibid.). Aunque todavía no se conocen bien las interacciones que determinan el desenlace de una infección, sí se supone que las células CD8⁺ ejercen una importante influencia en las etapas tempranas de la confrontación hospedero/parásito, y en el curso de la infección (Kizaki *et al.*, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1992). Además, se tienen datos que indican que las células CD8⁺ reducen notablemente el crecimiento intracelular de patógenos como *T. cruzi*, *T. gondii*, *L. monocytogenes* y *M. tuberculosis* mediante mecanismos citotóxicos clásicos (Milon y Louis, 1993).

Como se perfila en los incisos anteriores, la tradicional clasificación de los linfocitos T CD4⁺ como células efectoras, y los linfocitos T CD8⁺ como reguladoras parece no ser cierta, pues ambos subtipos celulares pueden simultáneamente expresar ambas actividades. Incluso, en algunos casos, estas actividades están mediadas por las mismas citocinas (Sher y Coffman, 1992).

En el caso particular de la inmunidad contra los parásitos, el hecho de comprender más a fondo la compleja red de regulación de los distintos subtipos celulares ha ayudado a explicar algunos de los fenómenos más comúnmente encontrados en las infecciones. La regulación cruzada de las células TH1 y TH2 proporciona una explicación teórica de la bien documentada relación recíproca entre la producción de anticuerpos y la hipersensibilidad retardada (DTH) (Ibid.).

El ejemplo mejor estudiado al respecto es la infección experimental murina por *L. major*. La infección cutánea de la mayoría de las cepas crea una lesión localizada, que espontáneamente se cura y confiere resistencia a la reinfección. Sin embargo, en algunas cepas, de las que BALB/c es el prototipo, la infección progresa hacia una enfermedad visceral diseminada generalmente fatal. El detallado estudio celular de estas diferencias ha conducido al planteamiento de que, en general, la resistencia correlaciona con una fuerte respuesta de células TH1, mientras que la susceptibilidad con una de las TH2 (Ibid.). Los linfocitos T CD4⁺ de animales BALB/c susceptibles contienen niveles significativos de mRNA de IL-4, mientras que muy poco mRNA de IFN-gamma. Por otro lado, las células de animales C57/BL6 y BALB/c tratados con anticuerpos anti-CD4⁺, que depletan temporalmente este tipo celular, contienen altos niveles de mRNA de IFN-gamma, y nada de mRNA de IL-4. El estado inmune de los animales en el momento de la infección primaria es determinante para el curso de la enfermedad. Se concluye que

una enfermedad que progresa a la curación está acompañada de una fuerte respuesta de DTH y pocos anticuerpos, mientras que el curso de la enfermedad en los animales susceptibles está relacionado con altos niveles de anticuerpos, sobre todo IgE, y baja reactividad de DTH.

El caso de la cisticercosis causada por *Taenia crassiceps* no es una excepción, y presenta varias de las características citadas anteriormente. Los animales parasitados presentan altos niveles de anticuerpos, una baja respuesta celular a la estimulación con ConA y poca respuesta DTH (Terrazas *et al.*, 1994); Las células de los animales susceptibles presentan preferencialmente una respuesta de tipo TH2, y las de los resistentes de tipo TH1, suposición basada en los patrones de secreción de citocinas de cada subtipo (Terrazas, com. pers.); El tratamiento de los animales infectados con anticuerpos anti-IL-4 o con IL-2 recombinante humana los hace más resistentes al parásito (Ibid.); La timectomía disminuye la resistencia a *T. crassiceps* de animales tanto macho como hembra, pero sólo disminuye la respuesta DTH en las hembras (Bojalil *et al.*, 1993); El tratamiento con ciclofosfamida, estimulador de la respuesta DTH sin afectar los niveles de anticuerpos, resulta en una resistencia de animales timectomizados similar a la de animales control (Ibid.); La transferencia pasiva de células linfoides enriquecidas con linfocitos T a ratones timectomizados confiere resistencia a la infección (Ibid.).

Estudios llevados a cabo por Hermanek y Prokopik (1989) ya habían apuntado a que el timo tenía un papel relevante en el control de la infección experimental murina por *T. crassiceps*. Extractos tímicos preparados por ellos y administrados simultánea o posteriormente a la infección mostraron su capacidad de modular la respuesta inmune de los animales y disminuir la carga parasitaria.

E.- TOLERANCIA

El reconocimiento específico de los antígenos es uno de los aspectos fundamentales del sistema inmune. Este reconocimiento es el primer paso de la activación de una respuesta inmune que finalmente resultará en la destrucción y eliminación de un antígeno. Por ello es de vital importancia que los receptores para antígenos discriminen entre los ajenos (aloantígenos) y los propios. Los receptores encargados del reconocimiento antigénico son producidos por los linfocitos - el receptor de la célula T (TcR) y las inmunoglobulinas (Ig), que se expresan en la superficie de los linfocitos T y B, respectivamente. Ambos tipos de receptores son altamente específicos para los antígenos que reconocen, aunque la forma en que lo hacen sea distinta.

Los TcR reconocen fragmentos peptídicos, derivados del antígeno que sufrió un procesamiento, en asociación no covalente con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los anticuerpos, por otro lado, pueden reconocer a los antígenos en su conformación original y sin la necesidad de que estén asociados a ninguna otra molécula.

El amplio repertorio de receptores se forma por el arreglo al azar de los segmentos génicos de los TcR y las Ig; ésto aunado a la imprecisa unión de los mismos y la combinación de las dos cadenas peptídicas en cada sitio de unión al antígeno, da por resultado una enorme variedad de receptores específicos para muchas moléculas. En esta etapa, el repertorio puede incluir receptores de células T y B que reaccionen con estructuras propias. Por lo tanto, el sistema inmune tiene que adquirir durante su desarrollo la habilidad de distinguir entre antígenos propios y ajenos - a ésto se llama inducción de la auto-tolerancia.

Existen varias hipótesis de cómo se puede establecer esta auto-tolerancia, que en su mayoría no son excluyentes y pueden estar actuando en conjunto:

- 1.- Si los antígenos propios nunca entran en contacto con el sistema inmune, nunca podrán ser reconocidos y no podrán desencadenar una respuesta en su contra. Esto se puede lograr a) secuestrando el antígeno y b) no presentándolo correctamente (Wood, 1992). Este mecanismo tiene, sin embargo, poca influencia en el establecimiento de la auto-tolerancia.

- 2.- Se pueden eliminar las células auto-reactivas del repertorio, lo que se conoce como delección clonal (Ibid.). Esta es una selección negativa de linfocitos.
- 3.- Para evitar la eliminación de las células auto-reactivas y prevenir problemas si escapan del timo sin ser destruidas, se les puede inactivar funcionalmente, lo que se conoce como anergia (Ibid.).
- 4.- Se pueden destruir en la periferia las células auto-reactivas que hallan escapado del timo, lo que se llama delección periférica (Hämmerling *et al.*, 1993).
- 5.- Se puede también lograr la inactivación de células auto-reactivas mediante la creación de un repertorio de células supresoras que que inhiban su activación y/o función (Wood, 1992).
- 5.- Se pueden seleccionar positivamente células auto-reactivas, que migrarán a los tejidos y allí funcionarán como inductoras de tolerancia (Grossman *et al.*, 1986; Coutinho *et al.*, 1993). Esta "tolerancia dominante" postula la selección positiva de células auto-reactivas para imponer la aceptación de antígenos más que la eliminación de aquellas que los reconocen.

En términos moleculares no hay diferencias entre las moléculas propias y las ajenas. Esto se demuestra claramente con las vigorosas respuestas de los linfocitos T y B contra un tejido transplantado en un sujeto receptor no modificado. En este caso, lo que se reconoce como ajeno son las moléculas no compatibles de los complejos mayor y menor de histocompatibilidad (Sherman y Chattopadhyay, 1993). Por lo tanto, lo que es considerado como propio en un sujeto, puede ser considerado ajeno en otro, y los repertorios de células T y B claramente dependen del ambiente en el que fueron creados. Una vez establecida la tolerancia en un animal durante su desarrollo, ésta se tiene que mantener. Se ha propuesto que la tolerancia es un proceso "infeccioso", pues linfocitos tolerantes son capaces de convertir en tolerantes a células vírgenes tras un período de co-cultivo (Qin *et al.*, 1993). De esta manera, los linfocitos tolerantes "enseñan" a los vírgenes a distinguir entre lo propio y lo ajeno, lo que hace a la tolerancia un proceso auto-sostenible. Tomando en cuenta este modelo, se ha intentado "enseñar" artificialmente al sistema inmune a tolerar aloantígenos para permitir la implantación definitiva de órganos y piel transplantados. Pero el establecimiento de tolerancia en un animal o sujeto adulto ha sido muy complicado.

En estudios animales se ha logrado una buena tolerancia a aloantígenos implantando a éstos en el timo, donde no sólo no son rechazados, sino que inducen una tolerancia también periférica (Coutinho *et al.*, 1993). También se han intentado pretratamientos de animales receptores de trasplantes con antígenos de histocompatibilidad del donador, tratamientos con anticuerpos poli y monoclonales contra antígenos superficiales de linfocitos, trasplantes de médula ósea e irradiación total linfoide, lo que ha dado resultados relativamente esperanzadores (Pescovitz, 1992; Wood, 1992). En humanos el esquema experimental que mejores resultados ha dado es la transfusión donador-específica de sangre. Se transfunde intravenosamente al receptor con sangre del donador del órgano, con lo que se expone al sistema inmune del receptor a los aloantígenos de histocompatibilidad del donador antes del trasplante (Wood, 1992). Con ésto se logra cierta tolerancia específica hacia los aloantígenos de la sangre y los tejidos del donador. Posteriormente se vio que se puede también lograr tolerancia con una transfusión no específica del donador, pero no se conocen los mecanismos por los cuales una selección al azar de aloantígenos promueva la aceptación de un tipo de aloantígenos en particular. Además, con el problema del SIDA, la transfusión azarosa de sangre es un riesgo muy grande.

En estudios llevados a cabo para determinar las células efectoras del rechazo de alotrasplantes de piel se ha descubierto que las hay antígeno-específicas e inespecíficas (Rosenberg y Singer, 1992), y que tienen que ser tanto citotóxicas como ayudadoras (Ibid.; Mason y Morris, 1986). También se reconoce ahora la importancia que las citocinas tienen en la regulación de la tolerancia. En general, se puede decir que una respuesta celular de tipo TH1 rechaza los trasplantes, pero no se puede descartar que los anticuerpos también jueguen un papel importante, pues son los responsables del rechazo hiperagudo (Dallman *et al.*, 1993). Lo que sí es un hecho, es que la expresión de IL-2 e IFN-gamma está disminuida en los animales que han tolerado trasplantes, mientras que las otras citocinas se expresan a niveles comparables a los de animales que los han rechazado (Ibid.). Para establecer definitivamente que las células TH1 son las que preferencialmente rechazan los trasplantes, mientras que las TH2 los toleran, es necesario llevar a cabo experimentos de modificación de secreción de citocinas *in vivo*.

Un indicio importante de que la manipulación de los patrones de secreción de citocinas puede ser importante en el establecimiento de tolerancia a aloantígenos es que dos de los más potentes fármacos

inmunosupresores, el FK 506 y la rapamicina, aparentemente ejercen su efecto bloqueando la producción y acción de citocinas, y en particular de IL-2 (Ibid.).

A pesar de los grandes avances que se han logrado en este campo, todavía no se tiene un cuadro completo del complejo conjunto de mecanismos involucrados en el rechazo de alotransplantes (Wecker y Auchincloss, 1992).

APENDICE 2

INMUNOPARASITOLOGIA

A.- INTRODUCCION

El término parásito se emplea exclusivamente para aquellos agentes infecciosos que pertenecen al reino animal; protozoarios, helmintos y artrópodos ectoparásitos (chinches, garrapatas, etc.). Este tipo de organismos es particularmente prevalente en las regiones tropicales y subdesarrolladas del mundo, y afecta tanto al ser humano como a animales domésticos y de granja. El impacto de las parasitosis tanto humana como animal es enorme. Se estima que cerca de un tercio de la población mundial sufre algún tipo de parasitosis, y que las muertes debido a ellas se cuentan por millones. Se han llevado a cabo estudios para relacionar las parasitosis con el bajo rendimiento intelectual de las personas infectadas, pero es aún prematuro afirmar concluyentemente que las mismas afectan negativamente a los sujetos, pues no se puede descartar la influencia de otros factores en los procesos mentales (Nokes y Bundy, 1994). Las pérdidas económicas por parasitosis veterinarias también son considerables, pues ascienden a varios miles de millones de dólares al año (Sher y Colley, 1989). En este apéndice nos ocuparemos principalmente de parásitos humanos, y citaremos los casos veterinarios o modelos experimentales en donde se haya documentado una inmunosupresión causada por algún parásito.

En la tabla I se muestran las estimaciones de prevalencia global de los distintos parásitos humanos y la mortalidad anual debida a ellos, según datos de la Organización Mundial de la Salud.

TABLA I

Principales infecciones parasitarias del ser humano

Infección	Prevalencia global estimada	Mortalidad anual estimada
Malaria	300 millones	1 millón
Esquistosomiasis	200 millones	800'000
Filariasis	120 millones	baja
Teniasis/Cisticercosis	900 millones	50'000
Ascariasis	800 millones	20'000
Enfermedad de Chagas	20 millones	60'000
Leishmaniasis	12 millones	5'000
Tripanosomiasis africana	1 millón	5'000
Tremátodos*	40 millones	no determinada

Tomado de: Sher y Colley, 1989 y * Maurice, 1994

Es importante notar que la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) da una nueva dimensión al problema de las parasitosis, pues algunos patógenos comúnmente controlados por el sistema inmunocompetente, como por ejemplo *T. gondii* y *Leishmania*, ahora son frecuentemente hallados como agentes infectivos oportunistas (Alvar, 1994; Aebischer, 1994). La notoria disminución de la capacidad restrictiva del sistema inmune debida al SIDA incluso permite la proliferación de parásitos no humanos, como *T. crassiceps*, en los pacientes afectados por esta enfermedad (Klinker *et al.*, 1992).

Muchos de los problemas parasitarios se podrían evitar o, por lo menos controlar, mediante medidas de salud pública y de higiene elementales, pero los países afectados no siempre cuentan con los recursos para solventar los gastos de tales campañas. Para combatirlos una vez implantados, existen algunos fármacos efectivos. Pero lo ideal sería evitar su propagación, interfiriendo en su ciclo vital, o en su implantación en el hospedero. Es notorio el hecho de que la vacunación, que con otros agentes patógenos ha dado buenos resultados, no haya servido hasta ahora como un medio eficaz en el control de los parásitos (James y Scott, 1988; Sher y Colley, 1989). Se cuenta actualmente con algunas vacunas veterinarias contra helmintos (*T. ovis* y *T. solium*) todavía en experimentación y una vacuna comercial contra *T. gondii* (Buxton, 1993; Molinari *et al.*, 1993 b). No hay por el momento ningún esquema de inmunización estandarizado contra ningún parásito humano (Sher y Colley, 1989), pero sí se cuenta con una vacuna sintética contra las formas asexuales de *Plasmodium falciparum* (Patarroyo *et al.*, 1988).

B.- LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA DE LOS ORGANISMOS PARASITOS

Los parásitos, vistos como organismos, difieren notablemente entre sí en su anatomía, su biología y las relaciones que tienen con sus hospederos.

Los protozoarios son seres unicelulares relativamente simples, y se pueden reproducir en el torrente sanguíneo, el tracto digestivo o algún tejido del hospedero. Algunos se replican dentro de ciertos tipos celulares particulares. Aunque los protozoarios parásitos son en cuanto a estructura y

contenido genómico más complejos que las bacterias y los virus, son similares a éstos en tanto que se replican intra- o extracelularmente dentro del hospedero (Margulis y Sagan, 1990).

Los helmintos son un grupo de parásitos mucho más complejo. Son criaturas multicelulares, a menudo macroscópicas, y generalmente poseen órganos digestivos, nerviosos y reproductivos. A diferencia de los protozoarios, la mayoría de los helmintos no se multiplican en su hospedero vertebrado. En cambio producen gran cantidad de huevecillos o larvas que continúan con el ciclo vital ya sea en vida libre o en algún hospedero intermediario (Maizels y Selkirk, 1988). Además, salvo la excepción de *Trichinella*, no presentan estadios intracelulares en sus ciclos de vida.

Gran parte de los parásitos humanos dependen de hospederos invertebrados, llamados vectores, para su transmisión. El contacto del ser humano con estos vectores es crucial para que se complete el ciclo de vida del parásito, y por lo mismo, es susceptible de intervención sanitaria o inmunológica.

Por último, cabe citar que el tercer grupo de parásitos, los ectoparásitos, que como su nombre indica, parasitan al hospedero desde el exterior, también pueden fungir como vectores de importantes infecciones parasitarias, como la enfermedad de Chagas y la babesiosis (Lehmann, 1993).

A pesar de no ser los únicos agentes infecciosos que existen, los parásitos mantienen una relación poco usual, se puede decir que privilegiada, con el sistema inmune de sus hospederos vertebrados. Esto los hace interesantes modelos para estudios inmunológicos y también puede ser la explicación de la notoria resistencia que ofrecen a la vacunación.

C.- INMUNOPATOLOGIA ASOCIADA A LAS PARASITOSIS

La estrategia biológica de los complejos ciclos de vida y patrones de migración de los parásitos dentro de un hospedero consiste en alcanzar una posición, ya sea estable o repetitiva, desde donde se produzca el próximo estadio infectivo en suficiente cantidad, y desde la cual se acceda al medio correcto para una eficiente transmisión al próximo hospedero. Al llevarse a cabo este complejo cúmulo de

eventos, los parásitos desencadenan en el hospedero varias respuestas inmunes, que a menudo producen efectos patológicos. Dentro de este contexto, podemos citar:

- la hipergamaglobulinemia causada por la malaria, la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas. (Sher y Coley, 1989, y las referencias ahí citadas)
- la formación de complejos inmunes de anticuerpos específicos contra el parásito e inespecíficos también, que causan desde problemas circulatorios, hasta activación sistémica del complemento y una variedad de procesos inflamatorios (Ibid.)
- la formación de autoanticuerpos contra diversos tejidos y órganos, que conducen a un estado de autoinmunidad, y que acompaña las infecciones de malaria, tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas (Ibid.)
- la hipersensibilidad inmediata presenta datos curiosos; Sobre todo en los casos de infección por helmintos, que tienen una fase de migración tisular, se encuentran altos niveles de IgE circulantes, y también una eosinofilia elevada en la sangre periférica. Paradójicamente, rara vez se encuentran clínicamente casos de reacciones de hipersensibilidad inmediata, como alergias atópicas localizadas o anafilaxis sistémica en pacientes con este tipo de infecciones. Cabe citar que esta "potenciación" isotípica de IgE es sólo específica para esta inmunoglobulina, mas no lo es para ningún antígeno. Esto comúnmente se halla en pacientes infectados de esquistosomiasis, filariasis, áscaris y teniasis (Ibid.)
- al hallarse elevada la cantidad de eosinófilos circulantes, como se mencionó en el apartado anterior, también se detectan en la circulación niveles anormales de las sustancias secretadas por éstos, como la proteína básica mayor, la proteína catiónica de los eosinófilos y la neurotoxina derivada de los eosinófilos (también conocida como proteína X), que potencialmente pueden causar desarreglos de diversa índole (Ibid.)
- en las infecciones por ectoparásitos, artrópodos que se alimentan de sangre, se detectan hipersensibilidad cutánea por basófilos y la degranulación de los mismos (Ibid.)
- los granulomas son reacciones celulares focalizadas contra materiales extraños que permanecen en algún tejido durante un periodo prolongado. En el caso de la infección por esquistosoma, se presentan

granulomas alrededor de los huevos de este parásito, que a veces causan más daño en el tejido circundante que el huevo mismo (Ibid.)

- la fibrosis es un proceso que puede ser patológico o normal, y que ocurre en casos tan diversos como la reparación de heridas, la hipertensión, el daño hepático por alcohol, la enfermedad por obstrucción pulmonar crónica, escleroderma tanto sistémico como localizado, etc. La enfermedad de Chagas, la filariasis y la esquistosomiasis son algunas de las infecciones crónicas que involucran un proceso fibrótico en su inmunopatogénesis (Ibid.)

- por último, cabe señalar que muchos parásitos también inducen desarreglos en los patrones de secreción de algunas citocinas, lo que sin duda ocasiona, aunque todavía no esté bien documentado, varias afecciones (Ibid.)

D.- MECANISMOS DE ALTERACION INMUNOLOGICA CAUSADOS POR EL PARASITO

Como se perfila en la sección anterior, muchas de las infecciones parasitarias son de carácter crónico. Esto implica que el hospedero se encuentra expuesto a los antígenos del parásito durante un largo periodo, por lo que tendría tiempo suficiente para montar una respuesta inmune efectiva contra el organismo invasor. El hecho de que no lo logre hacer implica que el parásito emplea mecanismos de distinta índole que le permiten o bien impedir y/o desviar esta respuesta inmune, o bien evitarla y/o contrarrestarla. El parásito requiere lograr un delicado equilibrio con sus manipulaciones, pues debe alcanzar un estado de resistencia parcial, en el cual los efectos patológicos no sean demasiado severos. Cualquier exacerbación en ambos sentidos resulta contraproducente para el parásito. Por un lado, la resistencia debe ser parcial, pues de montarse una respuesta inmune efectiva será eliminado. Por el otro, los efectos patológicos de la infección deberán ser moderados, pues en caso de conducir a la muerte del hospedero, el parásito se verá despojado del nicho biológico que requiere para su supervivencia y proliferación.

1. MECANISMOS INMUNORREGULATORIOS

Al respecto del impedimento/desviación de una respuesta inmune efectiva, se pueden mencionar la inmunosupresión generalizada y la inmunorregulación de tanto la resistencia contra un parásito, como de la patogénesis debida a éste. En ambos casos se hallan involucrados el control de los distintos subtipos celulares (Mosmann y Coffman, 1989; Sher y Coffman, 1992), de la secreción de ciertos isotipos de inmunoglobulinas (Abraham y Teale, 1987) que puede conducir a mecanismos regulatorios mediante interacciones de tipo idiotipo/anti-idiotipo, y de las respuestas de tipo celular (como la granulomatosis y la respuesta de células mononucleares de la sangre periférica). A continuación citamos sucintamente los casos documentados de inmunosupresión causada por parásitos. Cabe destacar que la mayor parte de las inmunosupresiones generalizadas se asocian a infecciones parasitarias por protozoarios.

Los ejemplos de inmunosupresión mejor conocidos son de infecciones por *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Plasmodium*, aunque con el paso del tiempo se han encontrado muchos otros. Esto nos habla de que esta estrategia es de las más comúnmente empleadas por los parásitos para eficazmente colonizar a sus hospederos y propagarse.

Se encontró que la tripanosomiasis africana conduce a una disfunción generalizada del sistema inmune (Ramos *et al.*, 1979; Askonas, 1984). Se ha visto que las funciones normales de casi todas las células B, T y macrófagos se hallan trastornadas en modelos experimentales de la infección por *Trypanosoma* spp. (Ibid.). El establecimiento de un estado de inmunosupresión generalizada obviamente es un proceso multifactorial, y poco a poco se han ido descubriendo los protagonistas del mismo.

Uno de los primeros indicios de un estado de inmunosupresión es una baja respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) y una baja proliferación linfoide tras la estimulación con mitógenos de linfocitos T, como la Concanavalina A (ConA). Se han llevado a cabo estudios con tripanosomas africanos y americanos para encontrar exactamente qué componentes del sistema inmune se encuentran trastornados, y se han hallado semejanzas y diferencias entre ambos tipos de infección. Los parámetros inmunológicos que se han medido son muchos, pero aquí citaré sólo unos cuantos.

Los ensayos realizados con personas y animales infectados por tripanosomas africanos o *T. cruzi* muestran, aparte de la baja respuesta de DTH y de proliferación inducida por ConA, una baja respuesta de las células B, con una baja tasa de proliferación y de producción de anticuerpos heteroespecíficos, una producción relativamente alta de autoanticuerpos, una disminuida producción de IL-2 y una deficiente expresión de los receptores para IL-2 (IL-2R) (Sztejn y Kierszenbaum, 1993). Se ha demostrado que una proteína de membrana de *T. cruzi* comparte un epítotope con un activador de la actividad linfocitaria e induce la producción de anticuerpos, lo que después puede dar lugar a la aparición de autoanticuerpos (Hernández-Munain *et al.*, 1992). Un interesante contraste inmunológico entre ambos tipos de tripanosomas es que modulan de distinta manera la expresión del receptor de la célula T (TCR) de linfocitos humanos activados; *T. cruzi* disminuye la expresión del complejo TCR-CD3 mientras que los tripanosomas africanos no la alteran (Sztejn y Kierszenbaum, 1993). Se detectó que la adición de IL-2 a cultivos *in vitro* de linfocitos de animales infectados mejora la respuesta de éstos, pero no restablece todas las funciones que se encuentran afectadas, lo que habla de que los niveles deficientes de esta citocina no son la única vía que el parásito emplea para inducir la inmunosupresión. La administración de IFN-gamma recombinante a ratones disminuye la inmunosupresión y mortalidad debida a la infección aguda por *T. cruzi* (Ibid.), pero no se sabe a través de qué mecanismo lo hace; puede ser que el IFN-gamma estimule las funciones linfocitarias protectoras, disminuya las permisivas o adversas, o incremente la capacidad de los macrófagos para destruir al patógeno.

La interpretación de los experimentos de reconstitución de IFN-gamma es, sin embargo, muy compleja. Se ha reportado que *Trypanosoma brucei* libera un factor (Trypanosome-derived lymphocyte-triggering factor, TLTF) que actúa sobre las células CD8⁺ y promueve la secreción de IFN-gamma, el cual estimula la proliferación del parásito (Olsson *et al.*, 1991). El mismo grupo de investigación ya había reportado que estas células jugaban un importante papel en el control de *Trypanosoma brucei*, pues la depleción de las mismas suprime tanto la producción de IFN-gamma como el crecimiento del parásito (Bakhiet *et al.*, 1990). Se ha descubierto también que las células involucradas en la inhibición de los linfocitos T son los macrófagos, pues éstos pueden inhibir a los primeros tanto *in vivo* como *in vitro* (Borowy *et al.*, 1990). Aunque todavía no se tiene certeza absoluta de los mecanismos inhibitorios que

emplean los macrófagos, sí se sabe que utilizan prostaglandinas como mediadores de este efecto supresor. En pacientes con mal del sueño (tripanosomiasis africana) en estado avanzado, se encuentran en el líquido cerebrospinal altos niveles de la prostaglandina D₂ que es una sustancia inhibitoria de la actividad de los linfocitos T (Pentreath *et al.*, 1990).

También en el caso de la inmunosupresión por el protozooario *Leishmania* se obtuvieron reportes pioneros de una baja respuesta proliferativa de células de bazo a mitógenos inespecíficos (Scott y Farrel, 1981). Petersen *et al.* (1982) describieron que en la leishmaniasis cutánea difusa había una inmunosupresión que parecía estar limitada a antígenos específicos del parásito. Posteriormente se describió que la baja respuesta celular a la estimulación con ConA sólo se da en las etapas tempranas de la infección por *Leishmania*, pero que a partir de las tres semanas únicamente se obtiene una baja respuesta al emplear antígenos del parásito como estimuladores (Nickol y Bonventre, 1985). El curso de la infección por *L. donovani* en hamsters sirios presenta una actividad normal de los linfocitos hasta las dos semanas siguientes al reto patogénico, pero las células ya no responden normalmente después de seis semanas (Evans *et al.*, 1990). No se conoce bien hasta qué punto los macrófagos están involucrados en el control de *Leishmania donovani*, pero se ha descubierto que un lipofosfoglicano de este parásito inhibe la transducción de señales en este tipo celular (Descoteaux *et al.*, 1991). En estos años del SIDA se ha reportado con frecuencia la aparición de infecciones oportunistas por *Leishmania* (Aebischer, 1994). Se piensa que este parásito no ataca *de novo* a los pacientes con una inmunidad comprometida, sino que más bien se reactivan infecciones que habían sido controladas por los sujetos cuando estaban sanos (Ibid.).

Williamson y Greenwood (1978) observaron que la respuesta inmune a la vacunación contra *Salmonella typhi*, tétanos y meningitis se encontraba suprimida en niños con malaria aguda. También se encontró que esta inmunosupresión es más marcada en la respuesta contra antígenos específicos del propio *Plasmodium falciparum* (Ho *et al.*, 1986). Se postula que *Plasmodium berghei* produce un factor inmunosupresor (Immunosuppressor factor, ISP) (Srou *et al.*, 1989). Se conoce también que algunas de las manifestaciones patológicas de la infección por *Plasmodium falciparum* se derivan de la sobreproducción de factor de necrosis tumoral (Tumor necrosis factor, TNF) debida al parásito (Playfair

et al., 1990), pero no se sabe hasta qué punto estas modificaciones del sistema de citocinas también están involucradas en el curso de la infección por este protozoario.

La lista de organismos patógenos que causan estados de inmunosupresión ha ido en aumento, y ahora se sabe que muchos emplean esta estrategia favorable a su proliferación. La enumeración de parásitos que suprimen inmunológicamente a sus hospederos es igual de extensa que la de las estrategias particulares que emplean para lograrlo.

En la infección por el tremátodo *Schistosoma mansoni* primero se manifiesta una buena respuesta inmune contra el parásito, pero después decae (Ramalho-Pinto *et al.*, 1984). Se sabe que el nivel de inmunosupresión correlaciona con la carga parasitaria (Feldmeier *et al.*, 1985), y que parte de los mecanismos empleados por el patógeno para lograr desarreglos inmunológicos es la secreción de péptidos inmunoactivos (Duvaux-Miret *et al.*, 1992). Las filarias inducen un estado de baja respuesta contra sus antígenos (Lammie *et al.*, 1984), y aparentemente lo hacen mediante proteínas inmunosupresoras (Wadee *et al.*, 1987). El protozoario *Giardia muris* suprime la respuesta inmune primaria contra eritrocitos de cerdo (Belosevic *et al.*, 1985) y el nemátodo *Titoxocara canis* hace más susceptibles a los animales que infecta a la encefalitis viral japonesa (Gupta *et al.*, 1987). La triquinosis experimental en ratas produce un aumento de la corticosterona sérica que inhibe la respuesta inmune (Bailenger *et al.*, 1985).

El céstodo *Mesocestoides corti* induce la secreción específica de IgM e IgG1 a través de mecanismos todavía no bien conocidos que afectan a los linfocitos T (Abraham *et al.*, 1987). El efecto de la infección por helmintos no sólo depende del parásito, sino también de factores genéticos del hospedero (Wakelin, 1990). Se han encontrado grandes diferencias en la infección experimental por los nemátodos *Nematospiroides dubius*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Trichuris* utilizando animales de distintas cepas (Price y Turner, 1984). De estudios de la regulación del curso de la infección parasitaria por el platelminto *Echinococcus multilocularis* se desprende que las células CD8^{dull} juegan un importante papel, pues suprimen la respuesta inmune contra este patógeno (Kizaki *et al.*, 1991).

Asimismo en la infección por el protozoario *Toxoplasma gondii* se ha demostrado la importancia de las células CD8⁺. Para reactivar una infección crónica hay que eliminar a este subtipo celular, pues la

depleción de células CD4⁺ no es suficiente para lograr el desarrollo del patógeno (Gazzinelli *et al.*, 1992).

Las tenias no son la excepción dentro de los parásitos, y también existen reportes que apuntan a estados de inmunosupresión causados por ellas. Good y Miller (1976) describieron que la infección intraperitoneal murina con larvas del céstodo *Taenia crassiceps* resultaba en la supresión de las respuestas primaria y secundaria de anticuerpos contra eritrocitos de carnero *in vivo*. También se ha encontrado una baja respuesta proliferativa a la estimulación con ConA de células de animales infectados por *T. taeniformis* (Letonja *et al.*, 1983), *T. solium* (Molinari *et al.*, 1993 a) y por *T. crassiceps* (Terrazas *et al.*, en prensa). Se postula además que *T. solium* produce un factor inmunosupresor que todavía no está claramente definido, pero que inhibe la capacidad de respuesta ante un reto por *Salmonella typhimurium* (Molinari *et al.*, 1989). Finalmente, los trabajos realizados por nuestro grupo también apuntan a que *T. crassiceps* induce desarreglos inmunológicos en su hospedero experimental: Se detectan bajos niveles de respuesta a la estimulación inespecífica de linfocitos con ConA y una reacción DTH deprimida (Terrazas *et al.*, en prensa), y los animales parasitados controlan menos efectivamente el crecimiento de células neoplásicas HeLa que los controles, aunque todos los eliminan completamente (Rubio *et al.*, 1993).

Como se aprecia en la relación previa, la inmunosupresión parece ser una estrategia comúnmente empleada por los parásitos. Su alta frecuencia y los importantes datos que su estudio ha arrojado justifican la importancia de seguir indagando al respecto.

2. MECANISMOS EVASIVOS DE LA RESPUESTA INMUNE

Las estrategias empleadas por el parásito para evadir y/o contrarrestar los sistemas defensivos del hospedero son también diversas.

El sistema de evasión más sencillo es la exclusión anatómica (anatomic seclusion), que consiste en permanecer en alguna región anatómica en donde escapen al sistema inmune. Ejemplos de esto serían *Plasmodia spp.*, *T. cruzi* y *Toxoplasma*, que escapan a la eliminación mediada por anticuerpos al emplear hábitats intracelulares. Otro método de exclusión, más efectivo que el anterior, es el enquistamiento

practicado por *Trichinella*, *Entamoeba* y algunos céstodos. Sin embargo, más que simplemente esconderse del alcance del sistema inmune, los parásitos han desarrollado mecanismos evasivos más complejos, que se citan a continuación.

Un mecanismo evasivo de gran importancia es la modificación de la antigenicidad. Los parásitos emplean a este respecto tres mecanismos; el enmascaramiento antigénico (antigenic disguise), la variación antigénica y el recambio antigénico.

El enmascaramiento antigénico consiste en la adquisición y presentación de antígenos del hospedero por parte del parásito. El ejemplo más notable al respecto es el de los esquistosomas, quienes incluso llegan a presentar moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad del hospedero. Puesto que el genoma del parásito carece de secuencias homólogas al MHC del hospedero, es forzoso que adquiera estas moléculas del animal.

El mimetismo molecular (molecular mimicry) es otra vertiente del enmascaramiento antigénico. Dada la fuerte presión selectiva que ejerce el sistema inmune del animal sobre el parásito, es razonable proponer que antígenos superficiales mutantes del parásito hayan sido seleccionados por parecerse a componentes del hospedero (Barnett y Fujinami, 1992). La importancia de este mecanismo no se ha evaluado completamente, pero se supone se halla relacionada con el desarrollo de algunos tipos de autoinmunidad. Parte de la controversia que despierta este mecanismo se basa en afirmaciones de que las moléculas del parásito similares a las del hospedero son muy inmunogénicas, lo que podría implicar un alto costo para su mantenimiento. Alternativamente se explica lo anterior diciendo que este tipo de moléculas se conserva pues cumplen una función vital. Incluso se ha postulado que el parásito emplea este mecanismo no sólo como defensa, sino como medio para modificar la respuesta inmune de su hospedero (Grossman *et al.*, 1986).

La variación antigénica es, sin duda, el mecanismo de evasión inmune mejor estudiado. Se notan diferencias estructurales en los principales epítopes superficiales en distintos niveles biológicos. Primeramente, entre distintas cepas de parásitos (sobre todo protozoarios) se observan importantes variaciones en antigenicidad. Esta variación entre las cepas se piensa que promueve la supervivencia de distintas especies de parásitos al permitir infecciones múltiples y/o prevenir el desarrollo de una

inmunidad pan-específica. Se ha estudiado la variación antigénica de los cisticercos de *T. crassiceps*, y se encontró una alta variabilidad en la cantidad de epítomos compartidos por los mismos (Yakoleff-Greenhouse *et al.*, 1982).

La variación antigénica es aún más notoria durante la ontogenia de los parásitos. En varios casos se ha documentado la expresión estadio-específica de antígenos. Por ejemplo, los estadios infectivos de varios protozoarios, como *Plasmodium* y *T. cruzi*, presentan antígenos superficiales distintos a los que se encuentran en etapas posteriores de sus ciclos de vida (Playfair *et al.*, 1990).

En los tripanosomas africanos la variación antigénica ha adquirido una complejidad y efectividad asombrosas, pues sus antígenos superficiales principales presentan una variación continua, y de esta manera no sucumben nunca a los anticuerpos que inducen.

Recientemente se ha documentado además la selección de antígenos inducida por la vacunación. Se inmunizó a varios simios con un antígeno de *Plasmodium knowlesi* de 140 kd altamente conservado. Al retar a los animales con una clona que expresaba el mismo antígeno, muchos, en vez de mostrar protección, desarrollaron infecciones de malaria causadas por parásitos que no presentaban el antígeno original de 140 kd, sino nuevos antígenos de distinto peso molecular (Sher y Colley, 1989). *In vitro* se ha observado también este fenómeno al retar a *Giardia* con anticuerpos monoclonales contra algún epítome en particular. Estas observaciones sirven para subrayar la plasticidad que presentan los protozoarios parásitos en su expresión antigénica; éste es uno de los aspectos fundamentales a tomar en cuenta al desarrollar vacunas contra ellos.

El recambio antigénico es particularmente notorio en *Entamoeba histolytica*, trypomastigotes de *T. cruzi* y esquistosómulas recién transformadas. Las membranas de estos parásitos se hallan en un estado dinámico y podrían evadir el ataque mediado por anticuerpos simplemente al internalizar los complejos antígeno/anticuerpo.

E.- MECANISMOS EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA LOS PARASITOS

Como se aprecia en las secciones anteriores, muchos parásitos inducen fuertes reacciones humorales y celulares en su contra. Sin embargo, un asunto crucial para el desarrollo de vacunas efectivas contra este tipo de patógenos, es que esta respuesta inmune sea la adecuada. Dadas las altamente sofisticadas adaptaciones de los parásitos para enfrentar al sistema inmune y sus complejos ciclos vitales, el estudio de los mecanismos efectores empleados en su contra no es sencillo, y en ocasiones, ha dado resultados contradictorios.

No es sorprendente que la mayoría de los parásitos raramente induzcan una inmunidad protectora en el hospedero si se utilizan vacunas con el patógeno inactivado. En general, sólo aquellos parásitos que están pobremente adaptados y se auto-limitan en su proliferación, son los que desencadenan las respuestas inmunes más potentes. En contraste, los parásitos bien adaptados que producen infecciones crónicas, casi invariablemente inducen respuestas inmunes pobremente protectoras.

La inmunidad inducida contra los parásitos a menudo está dirigida contra un estadio del mismo en particular; contra formas del ciclo de vida ya sea infectivas, establecidas, inductoras de patologías y/o asociadas a la transmisión (Sher, 1988).

1.- MECANISMOS EFECTORES DEPENDIENTES DE ANTICUERPOS

A pesar de que la mayoría de los parásitos inducen una respuesta humoral considerable, sólo hay contados casos en los que este mecanismo aislado haya demostrado ser eficaz en el control del patógeno. Se citan a continuación los casos en que se ha demostrado un papel importante de la inmunidad humoral para controlar una parasitosis:

- En estudios de la malaria se han encontrado anticuerpos que bloquean la entrada de los plasmodios a las células que infectan, pues se unen a los receptores de las mismas que reconocen estos protozoarios (Sher y Colley, 1989).
- Se postula que cierto tipo de anticuerpos pueden interferir con la proliferación de los parásitos al bloquear la citoadherencia (Ibid.).

- En algunos casos se ha documentado la inmunidad celular mediada por anticuerpos (AMCI). Destaca aquí la inmunidad contra helmintos mediada sobre todo por IgG e IgE, que une específicamente a eosinófilos y macrófagos (Butterworth, 1984).
- Se ha demostrado que ciertos fármacos requieren de alguna manera de los anticuerpos para funcionar eficazmente, pues animales sin células B no responden al tratamiento con ellos, mientras que animales intactos sí lo hacen (Sher y Colley, 1989).

2.- INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS

En los últimos años se ha ido reconociendo el importante papel que la inmunidad celular juega en el control de las parasitosis por protozoarios y helmintos (James y Scott, 1988).

Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) se sospecha juegan un importante papel en el control del parásito veterinario *Theileria parva*, pero todavía no hay datos concluyentes al respecto. Los esquistosomas, que adquieren antígenos del MHC clase I, y que por lo tanto pueden ser reconocidos por las células CTL, son intrínsecamente resistentes a las mismas, pues no son destruidos por ellas a pesar de que sí son reconocidos (Sher y Colley, 1989).

Se piensa que la producción de citocinas es uno de los factores decisivos para que la inmunidad mediada por células sea efectiva. Recordemos que las citocinas pueden hacer que los macrófagos se activen y así destruyan, o por lo menos limiten a los estadios intracelulares de parásitos como *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Toxoplasma*. Muchas citocinas parecen estar involucradas en la activación de los macrófagos y demás células efectoras, pero la que tiene un efecto más amplio y mejor documentado es el IFN-gamma (Ibid.). Esto apoya la idea de que, en general, una respuesta celular de los linfocitos TH1 es más apropiada para controlar a los parásitos patógenos.

Se ha reportado la importancia que los eosinófilos tienen en el control de los helmintos (Butterworth, 1984; Molinari *et al.*, 1993 a).

Hasta ahora no se ha establecido una relación firme entre una buena actividad de las células NK y la inmunidad contra ningún parásito.

F.- INACTIVACION DE LAS FUNCIONES EFECTORAS DEL HOSPEDERO

Hasta aquí hemos mencionado mecanismos empleados por los parásitos para evadir la respuesta inmunológica del hospedero en su contra. A continuación citaremos algunos ejemplos de inactivación de los efectores inmunes del hospedero por parte del parásito, que es la segunda principal estrategia empleada por estos organismos para favorecer su efectiva propagación.

La lisis u opsonización del parásito por parte de la vía alterna del complemento es un importante mecanismo de protección innata del hospedero contra la infección. Puesto que la mayoría de las larvas parasitarias son sensibles a la destrucción mediada por suero, antes de la infección deben pasar por una etapa de pre-adaptación que modifique sus membranas de modo que no activen al complemento. Se sabe que *T. cruzi* sintetiza glucolípidos análogos a los reguladores autólogos de la actividad del complemento (DAF) *de novo*, y así parece evitar el ataque mediado por éste. Además, se ha detectado un desprendimiento de las moléculas del complemento de la superficie del parásito debido a una actividad proteolítica poco después de que este organismo pasa del estadio de cercaria al de esquistosómula (Sher y Colley, 1989).

Leishmania major emplea mecanismos diferentes para evadir la destrucción mediada por el complemento. Los promastigotes metacíclicos de este microorganismo no activan la vía alterna del complemento, sin embargo sí activan espontáneamente la vía clásica. Sin embargo, escapan a la lisis, pues inducen el rápido desprendimiento de los complejos C5b-9 terminales (Ibid.).

Algunos otros parásitos, como *Taenia taeniformis* secretan en una fase líquida potentes activadores del complemento, con lo que logran un estado de depleción de moléculas del mismo *in vivo* (Ibid.).

Otro mecanismo de inactivación de efectores inmunes es la fragmentación de inmunoglobulinas en Fc y Fab. Los tripomastigotes de la cepa CL de *T. cruzi* cortan la sección Fc de los anticuerpos pegados en su superficie, evitando la activación del complemento o el pegado de células efectoras. Se ha observado el fenómeno reverso en larvas de esquistosoma, quienes unen inmunoglobulinas por el fragmento Fc, y desprenden los fragmentos Fab, con lo que, se supone, inhiben su destrucción mediada por macrófagos (Ibid.).

Varios parásitos son capaces de evadir la destrucción mediada por células inmunes. De particular interés son los parásitos que se replican en el hostil medio intracelular de los fagocitos mononucleares, quienes obviamente tienen que evadir su destrucción en los lisosomas. *Toxoplasma gondii* sobrevive dentro de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma en el que entró a la célula con los lisosomas dentro de la misma. *T. cruzi*, en cambio, lisa la membrana del fagosoma antes de que éste se fusione a los lisosomas, y escapa al citoplasma de la célula.

Leishmania spp. son parásitos intracelulares obligados de los fagocitos mononucleares, y por lo tanto deben ser capaces de afrontar y resistir el ataque lisosomal. Algunos estadios de este parásito sí son susceptibles a la destrucción por macrófagos, y causan en éstos un aumento respiratorio notable. Otros, sólo ocasionan una leve respuesta. El parásito sufre un cambio durante su desarrollo, que le permite unirse a los macrófagos empleando diferentes receptores en la superficie de éstos. *L. major*, por ejemplo, en su fase infectiva penetra a la célula mediante el receptor CR1, que reconoce al tercer componente del complemento (C3), y que y que no desencadena una activación celular, por lo menos detectable por un aumento en la tasa de respiración. Por el contrario, en su fase no infectiva los promastigotes avirulentos emplean el receptor para iC3b (CR3) para penetrar en la célula y son destruidos, pues sí se activa la misma. Los macrófagos sí son capaces de destruir, o por lo menos limitar, a los amastigotes intracelulares de *Leishmania* al ser activados por linfocinas. Este mecanismo, que ocurre junto con reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH), es el responsable de que la mayor parte de las leishmaniasis sanen espontáneamente. Sin embargo, algunas cepas, como *L. brasiliensis* y *L. mexicana* producen una infección crónica y persistente a pesar de la DTH (Aebischer, 1994). No se conocen los mecanismos empleados por estos patógenos para burlar la respuesta inmune, pero aislados clínicos de los mismos han demostrado ser resistentes al ataque de macrófagos activados por linfocinas. Existen además reportes de inmunosupresión inespecífica en ratones BALB/c infectados por *Leishmania tropica* (Scott y Farrel, 1981), pero no se conocen en detalle las moléculas participantes en esta desregulación inmunológica.

Tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* evaden totalmente la fagocitosis gracias a una glicoproteína de 90 kd presente en su superficie. Si se remueve esta proteína mediante tripsina, se vuelven susceptibles a la fagocitosis.

A pesar de que este apéndice trata de parásitos, mencionaré sucintamente algunos ejemplos bacterianos de organismos que escapan a la destrucción intracelular. Dentro de las bacterias capaces de sobrevivir una vez fagocitadas podemos citar a *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia psittaci*, *Legionella pneumophila* y *Salmonella typhimurium*. Emplean diversas estrategias para evitar su destrucción; inhiben la fusión del fagosoma al lisosoma, destruyen la membrana del fagosoma para escapar al citoplasma, son inertes a las enzimas líticas del lisosoma, modifican las vacuolas líticas en que se encuentran, etc. (Bermudes y Joiner, 1993). El caso de *M. tuberculosis* es uno de los que se conocen en mayor detalle. Para que el fagosoma se pueda fusionar correctamente con el lisosoma, el primero tiene que acidificarse. Esta mycobacteria evita el proceso de acidificación de esta vacuola al no permitir que las ATPasas responsables del descenso del pH estén presentes en la membrana de la misma (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Se desconoce todavía si las ATPasas son inhibidas al momento de fusionarse con la membrana o son removidas rápidamente de la misma. Es razonable suponer que los parásitos empleen mecanismos similares para evadir su destrucción dentro de las células.

Por último, los parásitos también pueden liberar sustancias que interfieren con la función celular efectora en la región extracelular. Los esquistosomas excretan una sustancia llamada factor inhibitorio derivado de los esquistosomas (schistosome-derived inhibitory factor, SDIF) que inhibe la proliferación linfóide y la degranulación de las células cebadas (Sher y Colley, 1989). *Entamoeba histolytica* aparentemente no libera factores que interfieran con la función celular efectora, pero en cambio lisa a las células efectoras mediante sus mecanismos citopatogénicos normales. Sin embargo, a su vez es lisa si las células se han activado previamente por exposición a sus antígenos, lectinas o linfocinas (Ibid.).

G.- PERSPECTIVA BIOLÓGICA DEL PARASITISMO

El parasitismo es una fuerza evolutiva de amplia repercusión tanto para el parásito mismo, como para sus hospederos. La co-evolución de ambos ha originado numerosas modificaciones fisiológicas del hospedero (las modificaciones de sus sistemas inmunológico, endócrino y neurológico), ha estimulado el desarrollo de nuevas estrategias infectivas y favorecido la aparición de nuevas ramificaciones filogenéticas de los parásitos, etc., etc. Sin embargo, todas estas manifestaciones no son exclusivas del parasitismo, sino que también han aparecido en otras asociaciones biológicas, como el comensalismo y el mutualismo. De hecho, la diferencia entre estos tres tipos de asociación es de grado, y en algunos casos se puede pasar de uno al otro modificando algunas condiciones.

El término "simbiosis" (la coexistencia de dos organismos) se acuñó originalmente por De Bary para describir tanto a las asociaciones parasitarias como las mutualistas (Bermudes y Joiner, 1993). Sin embargo, ahora se asocia preferentemente el término al mutualismo. Desde el punto de vista del hospedero una simbiosis se puede considerar como un continuum que va desde un extremo que es el mutualismo, con ventajas para ambos organismos, hasta el parasitismo, con desventajas para uno de ellos, en el otro extremo. El comensalismo, que se hallaría en medio de este continuum, aparentemente no presenta efectos sobre ninguno de los dos organismos (Kuris, 1974).

Existen varios ejemplos de organismos que bajo condiciones favorables establecen asociaciones mutualistas, pero en condiciones adversas uno parasita al otro. Asimismo, hay un reporte de la transición de un patógeno de la *Amoeba proteus* a un simbiote obligado (Bermudes y Joiner, 1993). Este asunto genera mucha controversia, pero lo que es innegable es que casi para cada tipo de organismo patógeno hay un ejemplo de organismo mutualista o simbiote que penetra a la célula por el mismo mecanismo y permanece en ella sin causarle daños. Claro está que el establecimiento final de un tipo de asociación o el otro se lleva mucho tiempo, pero no hay que olvidar que la transición de un organismo de vida libre a un simbiote es muy probablemente la responsable de la aparición de los seres eucariontes. Recordemos

que probablemente las mitocondrias de nuestras células y los plástidos de las plantas alguna vez se introdujeron a la célula y se convirtieron en simbioses obligados (Margulis y Sagan, 1990).

En este contexto, un parásito que inicialmente sólo acarrea problemas para su hospedero, en algún momento puede pasar a conferirle ventajas diversas, como la adquisición de nuevas capacidades génicas o metabólicas. Incluso, a un nivel ecológico, mucho más amplio y ambicioso, se postula que los parásitos pueden modificar el comportamiento (Holmes, 1993) o el éxito reproductivo (Folstad y Karter, 1992; Möller, 1994) de los hospederos. Las ideas ecologistas también se han permeado a la inmunología misma, pues se han llegado a considerar a los distintos órganos del hospedero como diferentes ecosistemas en donde los depredadores (células inmunes) y las presas (parásitos) logran un delicado equilibrio que determina el desenlace de la(s) infección(es) (Seed, 1993; Wassom, 1993). Las complejas interacciones entre los parásitos y sus hospederos, que ya se han mencionado en los apartados anteriores, son las responsables de que esta increíble fuente de variación evolutiva no cese de generar diversidad.

Como se aprecia en este apéndice, el estudio de la inmunoparasitología nos brinda la oportunidad de enlazar varias ramas de las ciencias naturales para generar conocimientos tanto básicos como aplicados. Además, nos permite ampliar notablemente la concepción global que tenemos de la biología como proceso evolutivo y dinámico, pues los ejemplos que hemos visto de las múltiples interacciones hospedero/parásito son un magnífico recordatorio del vigor de la vida para generar mecanismos que la perpetúen.

VIII. REFERENCIAS

Abraham, K.M. and Teale, I.M. (1987) Isotype restriction during infection of mice with the cestode *Mesocostoides corti*: Role of immune suppression. *The Journal of Immunology* 138 (6): 1699.

Aebischer, T. (1994) Recurrent cutaneous leishmaniasis: A role for persistent parasites? *Parasitology Today* 10 (1): 25.

Ahmed, S.A., Pcnhale, W.J. and Talal, N. (1985) Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *American Journal of Pathology* 121 (3): 531.

Alexander, J. and Stimson, W.H. (1988) Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitology Today* 4 (7): 189.

Alvar, J. (1994) Leishmaniasis and AIDS co-infection: The Spanish example. *Parasitology Today* 10 (4): 160.

Askona, B.A. (1984) Interference in general immune function by parasite infections; African trypanosomiasis as a model system. *Parasitology* 88 (4): 633.

American Type Culture Collection. (1992) Catalogue of cell lines and hybridomas, 7^o edition. Maryland, USA

Bailenger, J., Peychaud, A., Cabanues, A. and Haumont, G. (1985) The evolution of plasma corticosterone in trichinellosis of the rat; relationship with immunodepression. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 60 (4): 445.

Bailey, D.W. and Usama, B. (1960) A rapid method of grafting skin on tails of mice. *Transplantation Bulletin* 7: 424.

Bakhiet, M., Olsson, T., van der Meide, P. and Kristensson, K. (1990) Depletion of CD8⁺ cells suppresses growth of *Trypanosoma brucei* and interferon-gamma production in infected rats. *Clinical and Experimental Immunology* 81 (2): 195.

Balkwill, F.R. and Burke, F. (1989) The cytokine network. *Immunology Today* 10 (9): 299.

Barnett, L.A. and Fujinami, R.S. (1992) Molecular mimicry: A mechanism for autoimmune injury. *The FASEB Journal* 6: 840.

Belosevic, M., Faubert, G.M. and MacLean, J.D. (1985) *Giardia muris*- induced depression of the primary immune response in spleen and mesenteric lymph node cell cultures to sheep red blood cells. *Parasite Immunology* 7 (5): 467.

Bermudes, D. and Joiner, K.A. (1993) The role of parasites in generating evolutionary novelty. *Parasitology Today* 9 (12): 458.

Billingham, R.E. and Medawar, P.B. (1951) The technique of free skin grafting in mammals. *Journal of Experimental Biology* 28 (3): 385.

Blalock, J.E. (1989) A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews* 69 (1): 1.

Blanchet, O., Bourge, J.F., Zinszner, H., Tatari, Z., Degos, L. and Paul, P. (1991) DNA binding of regulatory factors interacting with MHC class I gene enhancer correlates with MHC class I transcriptional level in class I defective cell lines. *International Journal of Cancer Supplement* 6: 138.

- Bojalil, R., Terrazas, L.I., Govezensky, T., Sciutto, E. and Larralde, C. (1993) Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of Parasitology* 79 (3): 384.
- Borowy, N.K., Sternberg, J.M., Schreiber, D., Nonnengasser, C. and Overath, P. (1990) Suppressive macrophages occurring in murine *Trypanosoma brucei* infection inhibit T-cell response *in vivo* and *in vitro*. *Parasite Immunology* 12 (3): 233.
- Bundy, D.A.P. (1988) Gender-dependent patterns of infection and disease. *Parasitology Today* 4 (7):186.
- Burke, F., Naylor, M.S., Davies, B. and Balkwill, F. (1993) The cytokine wall chart. *Immunology Today* 14 (4): 165.
- Butterworth, A.E. (1984) Cell-mediated damage to helminths. *Advances in Parasitology* 23: 143.
- Buxton, D. (1993) Toxoplasmosis: The first commercial vaccine. *Parasitology Today* 9 (9): 335.
- Coffman, R.L., Varkila, K., Scott, P. and Chatelain, R. (1991) Role of cytokines in the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets *in vivo*. *Immunological Reviews* 123: 189.
- Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W. (1991) Current protocols in immunology. John Wiley & Sons, New York.
- Coutinho, A., Salaün, J., Corbel, C., Bandeira, A. and Le Douarin, N. (1993) The role of thymic epithelium in the establishment of transplantation tolerance. *Immunological Reviews* 133: 225.
- Cox, F.E.G. and Liew, F.Y. (1992) T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunology Today* 13 (11):445.
- Dallman, M., Wood, K.J., Hamano, K., Bushell, A.R., Morris, P.J., Wood, M.J.A. and Charlton, H. (1993) Cytokines and peripheral tolerance to alloantigen. *Immunological Reviews* 133: 5.
- Dallman, M.J. and Clark, G.J. (1992) The use of cytokines and their receptors to monitor and manipulate the immune response. In: *The molecular biology of immunosuppression*. Edited by A.W. Thomson. John Wiley & Sons Ltd., p. 57.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Wood, W.B. and McCarty, M. (1983) *Tratado de microbiología*, 2^o edición. Salvat Editores S.A., Barcelona.
- Del Brutto, O.H. (1992) Cysticercosis and cerebrovascular disease: a review. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 55 (4):252.
- Descoteaux, A., Turco, S.J., Sacks, D.L. and Matlashewski, G. (1991) *Leishmania donovani* lipophosphoglycan selectively inhibits signal transduction in macrophages. *The Journal of Immunology* 146 (8): 2747.
- Duvaux-Miret, O., Stefano, G.B., Smith, E.M., Dissons, C. and Capron, A. (1992) Immunosuppression of the definitive and intermediate hosts of the human parasite *Schistosoma mansoni* by release of immunoreactive neuropeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89 (2): 778.

Evans, T.G., Smith, D. and Pearson, R.D. (1990) Humoral factors and nonspecific immune suppression in Syrian hamsters infected with *Leishmania donovani*. The Journal of Parasitology 76 (2): 212.

Feldmeier, H., Gastl, G.A., Poggensee U., Kortmann, C., Daffalla, A.A. and Perter, H.H. (1985) Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. II. NK cell activity and *in vitro* lymphocyte proliferation. Clinical and Experimental Immunology 60 (2): 234.

Folstad, I. and Karter, A.J. (1992) Parasites, bright males and the immunocompetence handicap. The American Naturalist 139 (3): 603.

Freeman, R.S. (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology 40: 969.

Gajewski, T.F., Schell, S.R., Nau, G. and Fitch, F.W. (1989) Regulation of T-cell activation: Differences among T-cell subsets. Immunological Reviews 111: 79.

Gazzinelli, R., Xu Yuhui, Hieny, S., Cheever, A. and Sher, A. (1992) Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate a chronic infection with *Toxoplasma gondii*. The Journal of Immunology 149 (1): 175.

Good, A.H. and Miller, K. (1976) Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. Infection and Immunity 14: 449.

Grossman, C.J. (1984) Regulation of the immune system by sex steroids. Endocrine Reviews 5 (3): 435.

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

Grossman, Z., Greenblatt, C.L. and Cohen, I.R. (1986) Parasite immunology and lymphocyte population dynamics. Journal of Theoretical Biology 121 (2): 129.

Gupta, A.K. and Pavri, K.M. (1987) Alteration in immune response of mice with dual infection of *Titoxocara canis* and Japanese encephalitis virus. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81 (5): 835.

Hämmerling, G.J., Schonrich, G., Ferber, I. and Arnold, B. (1993) Peripheral tolerance as a multi-step mechanism. Immunological Reviews 133: 93.

Hermánek, J. and Prokopic, J. (1989) Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. Folia Parasitologica 36: 331.

Hernández-Munain, C., De Diego, J.L., Alcina, A., and Fresno, M. (1992) A *Trypanosoma cruzi* membrane protein shares an epitope with a lymphocyte activation antigen and induces crossreactive antibodies. The Journal of Experimental Medicine 175 (6): 1473.

Ho, M., Webster, H.K., Looarcesuwan, S., Supanaranond, W., Phillips, R.E., Chantahavanich, P. and Warrell, D.A. (1986) Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to *Plasmodium falciparum*. The Journal of Infectious Diseases 153 (4): 763.

Holmes, B. (1993) Evolution's neglected superstars. New scientist, 6 November 1993: 30.

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

James, S.L. and Scott, P. (1988) Induction of cell-mediated immunity as a strategy for vaccination against parasites. In: *The biology of parasitism*, Edited by P.T. Englund and A. Sher, Alan R. Liss, Inc., p. 249.

Johnson, D.R. and Pober, J.S. (1994) HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Molecular and Cellular Biology* 14 (2):1322.

Kahan, B.D. (1992) Immunosuppressive therapy. *Current Opinion in Immunology* 4: 553.

Kamis, A.B., Ahmad, R.A. and Badrul-Munir, M.Z. (1994) Effects of estradiol on worm burden and peripheral leukocytes in *Parastrongylus malayensis*-infected rats. *Parasitology Research* 80: 74.

Kemeny, D.M., Noble, A., Holmes, B.J. and Díaz-Sánchez, D. (1994) Immune regulation: a new role for the CD8⁺ T cell. *Immunology Today* 15 (3): 107.

Kizaki, T., Kobayashi, S., Ogasawa, K., Day, N.K., Good, R.A. and Onoe, K. (1991) Immune suppression induced by protozoa of *Echinococcus multilocularis* in mice. Evidence for the presence of CD8^{dull} suppressor cells in spleens of mice intraperitoneally infected with *E. multilocularis*. *The Journal of Immunology* 147 (5): 1659.

Klinker, H., Tintelnot, K., Joeres, R., Müller, J., Gross, U., Schmidt-Rotte, H., Landwehr, P. and Richter, E. (1992) *Taenia crassiceps*-Infektion bei AIDS. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 117: 133.

Kuris, A.M. (1974) Trophic interactions: Similarity of parasitic castrators to parasitoids. *Quarterly Review of Biology* 49: 129.

Lammie, P.J. and Katz, S.P. (1984) Immunoregulation in experimental filariasis. IV. Induction of non-specific suppression following *in vitro* exposure of spleen cells from infected jirds to *Brugia pahangi* antigen. *Immunology* 52 (2): 221.

Larralde, C., Morales, J., Terrazas, L.I. and Romano, M. Feminization of the host: A novel strategy of the parasite in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. In press.

Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Scitutto, E., Gutiérrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B. and Sepúlveda, J. (1992) Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* 34 (2):197.

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

Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, E. and Scitutto, E. (1990) Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 926.

Lehmann, T. (1993) Ectoparasites: Direct impact on host fitness. *Parasitology Today* 9 (1): 8.

Letonja, T., Hammerberg, B., Schurig and G., Hammerberg, C. (1983) Cellular immune response to the infection by *Taenia taeniformis* in the intermediate host. Boletín Chileno de Parasitología 38 (3-4): 81.

Maizels, R.M. and Selkirk, M.E. (1988) Immunobiology of nematode antigens. In: The biology of parasitism, Edited by P.T. Englund and A. Sher, Alan R. Liss, Inc., p. 285.

Margulis, L. and Sagan, D. (1990) Microcosmos. Four billion years of microbial evolution. Touchstone books.

Mason, D.W. and Morris, P.J. (1986) Effector mechanisms in allograft rejection. Annual Review of Immunology 4: 119.

Maurice, J. (1994) Is something lurking in your liver? New scientist, 19 March 1994: 26.

Milon, G. and Louis, J. (1993) CD8⁺ T cells and immunity to intracellular pathogens. Parasitology Today 9 (1): 196.

Molinari, J.L., Soto, R., Tato, P., Rodriguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J. and Palet, A. (1993) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: A field and laboratory study. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 49 (4): 502.

Molinari, J.L., Tato, P., Lara-Aguilera, R. and Clinton White Jr., A. (1993) Effects of serum from neurocysticercotic patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. The Journal of Parasitology 79 (1): 124.

Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A. and León Cázares, J.M. (1989) Modulation effects on mice response to a *Salmonella typhimurium* infection by a *Taenia solium* cysticerci product of low molecular weight. Revista Latinoamericana de Microbiología 31: 327.

Möller, A.P. (1994) Parasitism, immunology of hosts, and host sexual selection. 69^o Annual Meeting of The American Society of Parasitologists, Fort Collins, Colorado, USA.

Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology 7: 145.

Nickol, A.D. and Bonventre, P.F. (1985) Immunosuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. Parasite Immunology 7 (4): 439.

Nokes, C. and Bundy, D.A.P. (1994) Does helminth infection affect mental processing and educational achievement? Parasitology Today 10 (1): 14.

Olsson, T., Bakhiet, M., Edlund, C., Hojjeberg, B., Van der Meide, P.H. and Kritiksson, K. (1991) Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8⁺ T cells: A trypanosome-released factor triggers interferon-gamma production that stimulates parasite growth. European Journal of Immunology 21 (10): 2447.

Ovseiovich Zonszein, R. (1993) Modelo animal para la terapia génica del cáncer cérvico-uterino. Tesis de licenciatura, U.N.A.M., México.

Patarroyo, M.E., Amador, R., Clavijo, P., Moreno, A., Guzmán, F., Romero, P., Tascón, R., Franco, A., Murillo, L.A., Pontón, G. and Trujillo, G. (1988) A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. Nature 332: 158.

Pentreath, V.W., Rees, K., Owolabi, O.A., Philip, K.A. and Doua, F. (1990) The somnogenic T lymphocyte suppressor prostaglandin D₂ is selectively elevated in cerebrospinal fluid of advanced sleeping sickness patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84(6): 795.

Pescovitz, M.D. (1992) Organ acceptance and rejection. *Current Opinion in Immunology* 4: 577.

Petersen, E.A., Neva, F.A., Oster, C.N. and Díaz, H.B. (1982) Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. *New England Journal of Medicine* 306: 387.

Phillips, W.J. and Cannon, R.G. (1978) Ecological observations on the commercial sand crab, *Portunus pelagicus* (L.), and its parasite, *Sacculina granifera* Boschma, 1973 (Cirripedia: Rhizocephala). *Journal of Fish Diseases* 1: 137.

Playfair, J.H.L., Taverne, J., Bate, C.A.W. and de Souza, J.B. (1990) The malaria vaccine: anti-parasite or anti-disease? *Immunology Today* 11(1): 35.

Price, P. and Turner, K.J. (1984) Immunological consequences of intestinal helminth infections. Humoral response to ovalbumin. *Parasite Immunology* 6 (6): 499.

Qin, S., Cobbold, S.P., Pope, H., Elliot, J., Kiousis, D., Davies, J. and Waldmann, H. (1993) "Infectious" transplantation tolerance. *Science* 259: 974.

Ramallo-Pinto, E.J., De Souza, J.B. and Playfair, J.H.L. (1984) Stimulation and suppression of response of mouse T cells to the schistosomules of *Schistosoma mansoni* during infection. *Nature* 259: 603.

Ramos, C., Schädler-Siwon, I. and Ortiz-Ortiz, L. (1979) Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Journal of Immunology* 122:1243.

Ramos-Kuri, M., Montoya, R.M., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L., Sciutto, E., Sotelo, J. and Larralde, C. (1992) Immunodiagnosis of neurocysticercosis: disappointing performance of serology (Enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients. *Archives of Neurology* 49: 633.

Rosenberg, A.S. and Singer, A. (1992) Cellular basis of skin allograft rejection: Immune-mediated tissue destruction. *Annual Review of Immunology* 10: 333.

Rubiliani-Durozoi, M., Rubiliani, C. and Payen, G.G. (1980) Déroulement des gamétogènes chez les Crabes *Carcinus maenas* (L.) et *C. mediterraneus* Czerniavsky parasités par la Sacculine. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 2:107.

Rubio G., M., Terrazas V., L., Morales M., J., García C., A., Saavedra, R. and Larralde, C. (1993) Inmunosupresión de ratones parasitados por *Taenia crassiceps*. X Congreso Nacional de Inmunología, Ixtapa-Zihuatanejo, Guerrero, México.

Sabin, A.B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. *JAMA* 116:801.

Schuurs, A.H.W.M. and Verheul, H.A.M. (1990) Effects of gender and sex steroids on the immune response. *Journal of Steroid Biochemistry* 35 (2): 157.

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

- Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, J., Lemus, D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G. and Larralde, C. (1990) Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687.
- Scott, P.A. and Farrel, J.P. (1981) Experimental cutaneous leishmaniasis I. Nonspecific immunodepression in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica*. *Journal of Immunology* 127: 2395.
- Seed, J.R. (1993) Immunocology: Origins of an idea. *The Journal of Parasitology* 79 (4): 470.
- Shavit, Y., Terman, G.W., Martin, F.C., Lewis, J.W., Liebeskind, J.C. and Gale, R.P. (1985) Stress, opioid peptides, the immune system and cancer. *The Journal of Immunology* 135 (2): 834.
- Sher, A. (1988) Vaccination against parasites: Special problems imposed by the adaptation of parasitic organisms to the host immune response. In: *The biology of parasitism*, Edited by P.T. Englund and A. Sher, Alan R. Liss, Inc., p. 169.
- Sher, A. and Coffman, R.L. (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Review of Immunology* 10:385.
- Sher, A. and Colley, D.G. (1989) Immunoparasitology. In Paul, W.E. (1989) *Fundamental Immunology*, Second Edition, Raven Press Ltd., New York, p. 957.
- Sherman, L.A. and Chattopdhyay, S. (1993) The molecular basis of allorecognition. *Annual Review of Immunology* 11: 385.
- Srour, E.F., Segre M.A. and Segre D. (1989) Modulation of the host's immune response to *Plasmodium berghei* by a parasite-derived immunosuppressive factor. *The Journal of Protozoology* 36 (4): 341.
- Stahl, W., Kaneda, Y. and Noguchi, T. (1994) Reproductive failure in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* 80: 22.
- Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P.H., Chakraborty, P., Haddix, P.L., Collins, H.L., Fok, A.K., Allen, R.D., Gluck, S.L., Heuser, J. and Russell, D.G. (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263: 678.
- Sztejn, M.B. and Kierszenbaum, F. (1993) Mechanisms of development of immunosuppression during *Trypanosoma* infections. *Parasitology Today* 9 (11): 424.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T. and Larralde, C. (1994) A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *The Journal of Parasitology* 80 (4): 563.
- Wadee, A.A., Vickery, A.C. and Piessens, W.F. (1987) Characterization of immunosuppressive proteins of *Brugia malayi* microfilariae. *Acta Tropica* 44 (3): 343.
- Wakelin, D. (1990) Genetic control of predisposition to helminth infection. In: *Immune recognition and evasion: Molecular aspects of host-parasite interactions*. Edited by L.H. Van der Ploeg, C.R. Cantor and H.J. Vogel. Academic Press, Inc., p. 61.
- Wassom, D.L. Immunoeological succession in host-parasite communities. (1993) *The Journal of Parasitology* 79 (4): 483.

Wecker, H. and Auchincloss, H. (1992) Cellular mechanisms of rejection. *Current Opinion in Immunology* 4: 561.

Weinstein, Y., Ran, S. and Segal, S. (1984) Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *The Journal of Immunology* 132 (2): 656.

Williamson, W.A. and Greenwood, B.M. (1978) Impairment of the immune response to the vaccination after acute malaria. *The Lancet* 1: 1328.

Wood, K.J. (1992) Tolerance to alloantigens. In: *The molecular biology of immunosuppression*. Edited by A.W. Thomson. John Wiley & Sons Ltd., p.81.

Yakoleff-Greenhouse, V., Flisser, A., Sierra, A. and Larralde, C. (1982) Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *The Journal of Parasitology* 68 (1): 39.

Yu, Y.Y.L., Kumar, V. and Bennet, M. (1992) Murine natural killer cells and marrow graft rejection. *Annual Review of Immunology* 10: 189.

Zachariae, R., Bjerring, P., Zachariae, C., Arendt-Nielsen, L., Nielsen, T., Eldrup, E., Schade Larsen, C. and Gotliebsen, K. (1991) Monocyte chemotactic activity in sera after hypnotically induced emotional states. *Scandinavian Journal of Immunology* 34: 71.