

27  
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

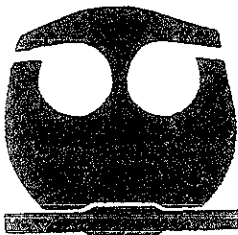
FUNCION BIOLOGICA DE LAS CITOCINAS EN LA  
CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL MURINA  
CAUSADA POR *Taenia crassiceps*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MIRIAM SUSANA CRUZ GOMEZ



TESIS CON  
SELLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1998

20 672



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

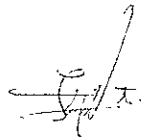
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

## JURADO ASIGNADO

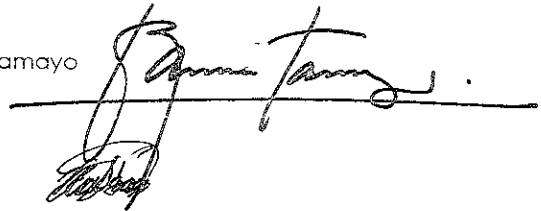
PRESIDENTE : Prof. Saturnino de León Chapa  
VOCAL : Prof. Abel Gutierrez Ramos  
SECRETARIO : Prof. Luis Ignacio Terrazas Valdés  
1er. SUPLENTE : Prof. Rosana Pelayo Camacho  
2o. SUPLENTE : Prof. Martha Cecilia Moreno Lafont

TRABAJO REALIZADO EN EL LABORATORIO 202. EDIFICIO B.  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR: M.I.B.B. Luis Ignacio Terrazas Valdés



SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. Fernando García Tamayo



SUSTENTANTE: Miriam Susana Cruz Gómez



Si puedes estar firme, cuando a tu  
dorado todo el mundo se ofusca y pierde la  
entonces Si cuando dudan todos, te fías en tu  
valor y al mismo tiempo sabes excusar su  
flaqueza

Tuya es la tierra y todos sus codiciados  
frutos y lo que más importa. ¡serás  
HOMBRE!

R. Kepling

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres (Susana y Leonardo) por todo el apoyo, cariño, amistad, confianza y comprensión incondicional que me han otorgado a lo largo de cada una de las etapas de la vida.*

*A Armando por estar conmigo en todas las dificultades, por su amistad y por ser la luz que me impulsa a seguir adelante.*

*A Oscar por todo el apoyo moral y profesional, amistad, comprensión y por alentarme a seguir sin temor al fracaso.*

*Dr. Fernando García Tamayo, por brindarme la oportunidad de colaborar a su lado y por su amistad*

*Dr. Ignacio Terrazas por la amistad y apoyo, desinteresado brindado durante el desarrollo de este trabajo.*

*A Elizabeth, Nayeli, Terecita y Nadira por su amistad y su invaluable ayuda a lo largo de todo el tiempo que pasamos juntas en la Facultad.*

*A los miembros del jurado por la rapidez y dedicación con que revisaron esta tesis.*

*Dr. Carlos Posadas y a todo su equipo de trabajo por abrirme las puertas de su laboratorio y por confiar en mí.*

*Así como a todas aquellas personas que creyeron en mí y que han dejado huella en mi vida.*

# Í N D I C E

I)	INTRODUCCIÓN .....	6
II)	ANTECEDENTES	
	* Respuesta Inmune .....	10
	* Linfocitos Th1-Th2 .....	17
	* Participación de los linfocitos Th1-Th2 en enfermedades parasitarias .....	23
	* Cisticercosis por <i>T. crassiceps</i> .....	27
	i. Modelo Experimental .....	29
	ii. Participación de genes H-2 .....	30
	iii. Vacunas .....	31
	iv. Respuesta inmune .....	32
III)	OBJETIVOS E HIPÓTESIS .....	34
IV)	PARTE EXPERIMENTAL	
	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	35
	METODOLOGÍA .....	36
V)	RESULTADOS .....	42
VI)	DISCUSIÓN .....	60
VII)	CONCLUSIONES .....	67
VIII)	BIBLIOGRAFÍA .....	68
IX)	APÉNDICE .....	77

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Dentro del ámbito de la Parasitología Médica se estudian a los parásitos que emplean al hombre como hospedero, los cuales pueden ser unicelulares (protozoos) o pluricelulares (helminths o artrópodos). De tal modo que entre ambos organismos se establece una relación de parasitismo, en el que un ser vivo se une a otro en una relación íntima e ineludible, y se nutre a costa de él, sin presentar por su parte ayuda o compensación equivalente, de tal forma que puede causar daño o lesión al hospedero y convertir al parásito en patógeno lo que puede provocar la muerte del primero.

El parasitismo puede ser facultativo (no es una condición indispensable para la vida, *Strongyloides*) u obligada, en el que el parásito, en un momento dado de su ciclo vital o en todo él, necesita de un hospedero. Siendo este último tipo de parasitismo el más importante para el hombre y puede ser permanente (ciertos protozoos, *Trichomonas*), temporal o intermitente (artrópodos hematófagos) o periódico (ciertos helmintos, *Taenia*)

La mayor parte de los parásitos humanos son endoparásitos, que por algún mecanismo penetran en la profundidad de los órganos y tejidos, sangre o cavidades naturales, aunque también, existen ectoparásitos que sólo actúan en la piel o sus anexos (*Sarcoptes*). Incluso muchos parásitos son incapaces de desempeñar su papel fuera de un hospedero único y específico (aquel que ofrece todas las posibilidades para que el parásito cumpla su ciclo vital completo o la fase correspondiente), a los que se denominan monoxenos (ciertos protozoos,



*Trichomonas*; y helmintos, *Ancylostoma*); mientras que otros parásitos necesitan para su ciclo vital dos o más hospederos (*Plasmodium*, *Taenia*) y se denominan heteroxenos (Pumarola et al, 1994).

Las relaciones entre el parásito y el hospedero pueden dar lugar a los diferentes grados de parasitismo, con o sin alteración del hospedero, que puede manifestarse en caso positivo por la aparición de síntomas y signos clínicos (enfermedad). Así, primero se debe establecer un contacto con la fuente parasitaria (persona a persona, con vectores o transmisores, autoinfección, vía placentaria, etc.) para después darse entrada al organismo hospedero, penetración, invasión y tropismo tisular; de tal modo que el hospedero se defiende frente al parásito (respuesta inmune inespecífica y específica) dando como resultado una acción patógena, la eliminación del parásito o el equilibrio entre ambos seres vivos. Epidemiológicamente, este hecho puede tener un gran valor, pues convierte en ciertos casos al hospedero en portador asintomático de la parasitosis y, por tanto, en fuente de infección, como sucede con la cisticercosis.

El hospedero ofrece resistencia a los parásitos mediante barreras mecánicas y fisicoquímicas inespecíficas, y una respuesta inmunitaria específica; pero debe tomarse en cuenta que el mecanismo de la inmunidad en el hospedero varía según el parásito ya que los heteroantígenos parasitarios constituyen un grupo de sustancias proteicas, glicoproteicas, polisacáridas, lipoproteicas y lipopolisacáridas, que son inmunógenas para el hospedero, de tal forma que dependiendo de la variedad, tamaño, complejidad, heterogeneidad, inmunogenicidad y la facilidad con que las células inmunocompetentes entren en contacto con el antígeno; es como el sistema inmune puede atacar al parásito invasor.

La inmunidad natural o inespecífica se caracteriza por la ausencia de especificidad en la respuesta ante el contacto con un agente extraño, la cual está condicionada por diversos factores anatómicos y fisiológicos propios de la especie, que dependen de su información genética; por lo que su mecanismo de acción involucra factores generales, tisulares, celulares y humorales que se activan independientemente del microorganismo que pretende invadir al hospedero. La inmunidad natural tiene una importancia vital para la protección del individuo ya que es la primera línea de defensa del organismo ante agentes que están presentes de manera común en el medio en que se desarrolla cotidianamente mediante barreras fisicoquímicas (piel, mucosas, etc.).

La inmunidad específica o adquirida frente a las infecciones es una consecuencia de la respuesta inmunitaria frente a las sustancias antigénicas presentes en los microorganismos, por lo que se produce una respuesta específica: anticuerpos en el caso de una respuesta humoral y linfocitos sensibilizados en la respuesta celular. Aunque, en ambos casos, el resultado final depende de la participación de factores inespecíficos (fagocitos, complemento, linfocinas).

Los anticuerpos, presentan una importante participación en la defensa contra la infección puesto que pueden actuar como agentes neutralizadores de exotoxinas bacterianas y de virus (principalmente anticuerpos de isotipo IgA). Siendo su acción más importante la que lleva a cabo a través de la activación de factores inespecíficos (principalmente complemento y fagocitosis), llevando a cabo fenómenos de lisis bacteriana, incrementando la fagocitosis (a través de anticuerpos IgG e IgM), incrementando la liberación de factores quimiotácticos y anafiltoxinas que favorecen la inflamación y por tanto aumentan el aporte de factores humorales

y fagocitos al foco de infección; y finalmente, los anticuerpos de tipo IgE que intervienen en la defensa de las infestaciones por helmintos a través de fenómenos de hipersensibilidad.

Mientras tanto, en las infecciones de tipo intracelular se desarrolla, básicamente, un mecanismo de inmunidad celular donde la activación de macrófagos involucra la liberación de sustancias solubles en el curso de la estimulación blástica.

Así, el desarrollo de una respuesta inmune adecuada contra un parásito dado dependerá de la forma en que entre en contacto con su hospedero y de la forma en que lo ataque.

**ANTECEDENTES**

#### \* RESPUESTA INMUNE

Todo ser vivo está expuesto a una amplia variedad de agentes infecciosos del entorno (virus, bacterias, hongos y parásitos) que pueden producir un daño si se reproducen de forma incontrolada. Existen estudios amplios sobre el sistema inmunológico, este es el responsable de evitar que las infecciones lleguen a ser importantes o provoquen secuela (Swain, et al. 1996).

Las dos divisiones funcionales del sistema inmunológico, los sistemas innato y adaptativo, actúan conjuntamente. El sistema innato es la primera línea de defensa, si estas defensas son superadas, el sistema adaptativo se activa y produce una respuesta específica a cada agente infeccioso que, por lo general, elimina la infección produciendo un estado de inmunidad específica (memoria inmunológica) para esos agentes infecciosos (Abbas, 1995).

La inmunidad innata se constituye de barreras físico-químicas que impiden la entrada del organismo patógeno al hospedero (Roitt. 1994), como suele ser la barrera cutáneo-mucosa, jugo gástrico que destruye a los parásitos, siempre y cuando no ofrezcan formas de resistencia, tipo quistes o huevos. El pH vaginal impide el desarrollo de *Trichomonas*, y solo cuando asciende aquel es posible su multiplicación. Así mismo, se desarrollan respuestas inflamatorias, aumento en la producción de polimorfonucleares (cisticercosis, triquinosis, hidatidosis o quistes de *Toxoplasma*) y la fagocitosis, aunque este último no es totalmente eficiente como mecanismo de eliminación ante parásitos puesto que no suele eliminarlos (Pumarola et al, 1994).

La función del sistema inmunológico adaptativo es reconocer antígenos de microorganismos patógenos y generar una respuesta inmunitaria adecuada para

eliminar la fuente de antígeno sin importar el ciclo biológico que presente (Roitt, 1994; Stites, 1993). Así se tienen dos tipos principales de respuesta inmunológica: las dirigidas contra patógenos intracelulares (células infectadas por virus, bacterias o parásitos); y las dirigidas contra microorganismos extracelulares (bacterias, hongos, parásitos).

El sistema inmunológico ha desarrollado dos formas de reconocimiento de antígenos: los anticuerpos producidos por los linfocitos B que reconocen los antígenos solubles extracelulares, mientras que los linfocitos T reconocen los antígenos intracelulares procesados y presentados en la membrana de las células presentadoras de antígeno (Roitt, 1994; Swain, 1996). Otra diferenciación se basa en que los anticuerpos reconocen, por lo general, antígenos intactos, mientras que las células T solo pueden reconocer fragmentos antigénicos que les sean presentados en asociación con moléculas codificadas por el complejo principal de histocompatibilidad (moléculas MHC) (Swain, 1996).

Como el objeto de estudio es la respuesta producida por linfocitos T, el tema de los linfocitos B no será abordado.

Las células T, se han subdividido en dos poblaciones principales, células T citotóxicas o CD8+ y células T cooperadoras o CD4+. Las células T CD8+ (T<sub>c</sub>) reconocen fragmentos antigénicos asociados con moléculas MHC clase I, mientras que las células T CD4+ (T<sub>h</sub>) reconocen antígenos asociados con moléculas MHC clase II. La función principal de las células T CD8+ es reconocer y destruir células infectadas por virus (Abbas, 1995).

Las células T CD4+ tienen diversas funciones en el control de las respuestas inmunitarias. El antígeno que es endocitado por un grupo de células llamadas

células presentadoras de antígeno (APC) es procesado y los productos, pueden asociarse con moléculas MHC clase II y ser expresados en la superficie de la APC para su reconocimiento por las células Th (Abbas, 1995; Stites, 1993). Cuando estas células reconocen el complejo antígeno-MHC en un macrófago liberan citocinas (mediadores solubles de la inmunidad) para activar al macrófago a fin de que destruya patógenos intracelulares. Si la célula T reconoce antígeno-MHC en una célula B liberan citocinas que activan la división y diferenciación de la célula B (ayudan en la producción de anticuerpos), lo mismo pasa con otras células del cuerpo que presentan estos complejos antígeno-MHC. En resumen, la función de las células Th es el control y desarrollo de las respuestas inmunitarias (Abbas, 1995).

Los primeros estudios sobre las citocinas, que van desde 1950 a 1970, describían sobre todo los numerosos factores proteicos producidos por diferentes células que mediaban funciones particulares en bioanálisis particulares. Fue así que durante esta fase se descubrieron los interferones antivirales, pirógenos productores de fiebre y activadores de macrófagos. La segunda fase de investigación, que abarca la década de los '70, consistió en la purificación y caracterización parcial de muchas citocinas individuales así como la producción de antisueros específicos neutralizantes. Durante este periodo se observó que diversos efectos mediados por diferentes citocinas eran producidas por las mismas células. En ese momento se creía que las citocinas eran sintetizadas principalmente por leucocitos y actuaban básicamente sobre otros leucocitos, y por ello podían denominarse interleucinas (IL), pero esta idea era debida a que las preparaciones de citocinas de las que se disponían solían ser impuras, lo cual evitaba la identificación firme de los factores activados (Stites, 1993).

En la década de los 80 fue donde se obtuvo un mayor avance en los conocimientos sobre las citocinas, puesto que se caracterizó la estructura y propiedades de muchas de ellas por clonación, expresión molecular y por la producción de anticuerpos neutralizantes completamente específicos, a menudo monoclonales. Además se descubrieron muchas citocinas nuevas y se revelaron muchas propiedades inesperadas de citocinas conocidas, dando como resultado la mayor parte de la información de la que se dispone actualmente.

Aún se desconocen actividades biológicas específicas in vivo de varias citocinas y frecuentemente se describen nuevos efectos biológicos de cada una de ellas, debido principalmente a experimentos que utilizan moléculas de citocinas recombinantes, antagonistas específicos de citocinas, animales transgénicos que expresan genes de citocinas y animales que carecen de citocinas específicas por medio de la tecnología del "knockout" de los genes (Abbas, 1995; Noben-Trauth, 1996). Además la disponibilidad de citocinas recombinantes y antagonistas específicos abre la posibilidad en la clínica de modificar las respuestas inmunitarias e inflamatorias de una forma predecible, para influir sobre la evolución de la enfermedad. Todo ello con el fin de poder emplear estos modificadores de la respuesta biológica para lograr el resultado deseado (Abbas, et al, 1995).

Las citocinas, aún cuando son un grupo diverso de proteínas, comparten varias propiedades (Moreno, 1996).

1. Se producen durante las fases efectoras de la inmunidad natural y específica, y sirven para mediar y regular las respuestas inmunitarias e inflamatorias.



2. La secreción de citocinas es breve, auto-limitada.
3. Muchas citocinas son producidas por diferentes tipos celulares.
4. Actúan sobre diferentes tipos celulares (pleiotropismo)
5. Tienen a menudo múltiples efectos diferentes sobre la misma célula blanco en diferentes tiempos.
6. Las acciones de las citocinas son frecuentemente redundantes
7. A menudo influyen en la síntesis de otras citocinas.
8. A menudo influyen en la acción de otras citocinas (sinergismo)
9. Las citocinas, como otras hormonas polipeptídicas, inician su acción uniéndose a receptores específicos en la superficie de la célula blanco (acción autócrina, parácrina o endócrina)
10. La expresión de muchos receptores de citocinas está regulada por señales específicas.
11. La mayor parte de las respuestas celulares a las citocinas precisan ARNm nuevo y la síntesis proteica.

Para muchas células blanco, las citocinas actúan como reguladores de la división celular, es decir, como factores de proliferación.

Resumiendo lo anterior, las citocinas presentan cuatro actividades fundamentales: mediadoras de la inmunidad natural; reguladoras de la activación, proliferación y diferenciación linfocitaria; reguladoras de la inflamación de origen inmunitario y estimuladoras de la proliferación y diferenciación de leucocitos inmaduros (Abbas, 1995).

Las citocinas que median la inmunidad natural son aquellas que protegen contra la infección viral e inician reacciones inflamatorias que salvaguardan contra

las bacterias, tales como: interferón tipo I (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) y quimiocinas (Roitt, 1995).

Las citocinas que son reguladoras de la activación son aquellas que median los efectos biológicos de otras citocinas ya sea aumentando o suprimiendo su acción, dando lugar a mecanismos reguladores positivos y negativos para las respuestas inmunitarias e inflamatorias (Moreno, 1996; Abbas, 1995). Tal es el caso de la interleucina 2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) que participan en la inmunidad celular, mientras que la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 6 (IL-6) participan en la inmunidad humoral.

Las interleucinas 4, 5, 6, 10, 13 y 14 favorecen la inmunidad humoral, mientras que las interleucinas 2, 12, 15, TNF- $\alpha$  y linfoxina, el factor estimulante de colonias granulocítico-monocíticas (GM-CSF) y el IFN- $\gamma$  favorecen la inmunidad celular (Swain, et al. 1996; Abbas, 1995).

En caso de presentarse una parasitosis, la respuesta inmune que se desarrolle dependerá del parásito y de como se adquirió el organismo, por lo que se considera que la curación espontánea depende fundamentalmente de la respuesta timo-dependiente, la cual está constituida por macrófagos, linfocitos T, anticuerpos y células NK. Los macrófagos son las células de primera línea que reconocen, adhieren y fagocitan a ciertos parásitos, por mecanismos inespecíficos o mediados por anticuerpos (Cua, et al. 1996; Swain, et al. 1996)

Las células T participan en el proceso de formación de un granuloma alrededor de ciertos metazoos, lo que se encuentra vinculado con la acción de anticuerpos y células inflamatorias T-dependientes, linfoquinas y células cooperadoras y supresoras (Stites, 1993)

Los anticuerpos IgG2, fijadores del complemento, son muy efectivos en los primeros estadios de la lucha contra oncosferas y larvas de ciertos parásitos; así como las IgG1 que son producidos de manera inmediata (Kawano, et al. 1996). Las IgA secretoras locales tienen un gran valor protector frente a la penetración de céstodos y amibas en la mucosa intestinal y de *T. vaginalis* en la mucosa cervicovaginal. Los anticuerpos IgE reagénicos se encuentran muy elevados en las parasitosis, y su valor puede ser muy útil en la eliminación de parásitos mediante la degranulación de los mastocitos y la hipersensibilidad.

De hecho, la aparición de IgM, IgG, IgA e IgD no ofrecen protección contra los helmintos; mientras que en caso de platelmintos son protectores los anticuerpos de isotipo IgG, IgA e IgE (Moreno, 1996).

Sin embargo, lo anterior no siempre es efectivo ya que la supervivencia de los parásitos puede asegurarse por una serie de mecanismos de evasión a los factores inmunoprotectores del hospedero (Harrison, 1983; Levinson, 1992), como son: la imitación antigénica (*S. mansoni*), depleción antigénica (*Leishmania* y *S. mansoni*), variación antigénica (*Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Plasmodium*, *Babesia* y *T. cruzi*), inmunotoxicidad (*Fasciola hepática* es linfotóxica), inmunosupresión (*S. mansoni*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Leishmania* y *Trichinella*), inmunodiversión (*Plasmodium* activa células B policlonales para distraer al S.I.), inmunoindiferencia por falta de unión con el lisosoma, evitar al fagolisosoma activado o resistir a enzimas microbicidas (*T. cruzi*, *Toxoplasma*, *L. donovani*), y en algunos céstodos se produce en el quiste una actividad anticomplementaria que evade la acción del sistema complemento (Harrison, 1983; Zambrano, 1993)

### \* Linfocitos TH1 - TH2

Las primeras observaciones de Mossman y su grupo en 1986, dieron lugar a una modificación importante en el conocimiento de la Inmunología. Ellos describieron que las células T CD4<sup>+</sup> podían subdividirse en dos subgrupos principales: células Th1 y células Th2, de acuerdo con el patrón de citocinas que secretaban.

Después del primer contacto con el antígeno, los linfocitos Th inductores secretan predominantemente IL-2 y se consideran indiferenciados (CD4<sup>+</sup> tipo 0, Th0). Con el tiempo, los linfocitos Th0 se diferencian en dos subpoblaciones que se distinguen por las citocinas que producen. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tipo 1 (Th1) secretan predominantemente linfoxina (LTX), IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  y proliferan en respuesta a IL-2 (Barnard, et al. 1996; Pearman, et al. 1993; Sander, et al. 1995). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th2) secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y proliferan en respuesta a IL-2 o IL-4. Ambas poblaciones secretan IL-3, IL-3 y GM-CSF. La IL-2 activa el gen de IFN- $\gamma$  e inactiva los de IL-4 e IL-10, mientras que la IL-4 e IL-10 inhiben la proliferación de las células productoras de IFN- $\gamma$  (Carter, et al. 1996; Sedlik, et al. 1997). Es decir, una población linfocitaria inhibe a la otra a través de la secreción de sus citocinas características.

La diferenciación de las células CD4<sup>+</sup> a Th1 o Th2 depende de factores como la naturaleza del antígeno (helmintos inducen a Th2 y bacterias a Th1), el microambiente de citocinas, además durante el reconocimiento antigénico por los linfocitos T (la presencia de IL-4 induce diferenciación a Th2, mientras que la IL-12 a Th1) y la APC involucrada (linfocito B induce a Th2 y macrófago a Th1) (Kossodo, et al. 1993; Barnard, et al. 1996).

Los linfocitos Th1 participan en el control de infecciones por hongos, bacterias y otros microorganismos intracelulares, así como algunos virus. En condiciones normales, son la población predominante de linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Las citocinas producidas por los linfocitos Th2 activan linfocitos B que inducen la secreción de IgE, inducen el cambio de isotipo a IgG, etc.

Así, para poder comprender de mejor manera la acción de las citocinas a lo largo de un proceso infeccioso, es necesario una descripción de cada una de ellas.

Las citocinas secretadas por linfocitos Th1 (LTX, IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\beta$ ), generalmente favorecen una respuesta de DTH, activan a los macrófagos y favorecen la citotoxicidad. Este tipo de citocinas se producen, principalmente, durante la fase inicial del proceso infeccioso (Sciutto et al, 1991).

Los *interferones tipo I* comprenden dos grupos de proteínas serológicamente diferentes: IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . El primer grupo tiene como principal fuente celular al fagocito mononuclear o interferón del leucocito y forma una familia de aproximadamente 20 polipéptidos estructuralmente relacionados. El segundo grupo tiene como fuente celular a los fibroblastos cultivados por lo que se le denomina interferón del fibroblasto. Ambos tipos de interferones se secretan durante las respuestas inmunitarias frente a antígenos, donde las células T activadas por el antígeno estimulan a los fagocitos mononucleares a sintetizar IFN; los cuales se unen a los mismos receptores de superficie y parecen inducir series similares de respuestas celulares. El receptor de IFN tipo I es una sola cadena polipéptidica, homóloga al receptor de la IFN tipo II (inmunitario o gamma) (Abbas, 1995).

Los *interferones tipo I* presentan tres funciones biológicas importantes, la inducción de un estado antiviral mediante la inhibición de la replicación viral, la

activación de las funciones líticas de las células, y el aumento de la expresión de las moléculas de clase I del MHC en las células infectadas por virus. Todo ello con el fin de erradicar las infecciones virales (Abbas, 1995).

La *interleucina 2* (IL-2), también llamada factor de proliferación de la célula T (TCGF), es la principal citocina responsable de la progresión de los linfocitos T desde la fase G1 a la S del ciclo celular. La IL-2 es producida por las células T CD4+, y en menor cantidad por las células T CD8+. La IL-2 funciona como un factor de proliferación autócrino (actúa sobre la célula que la produce), factor de proliferación parácrino (actúa sobre los linfocitos T cercanos), pero no actúa como un factor de proliferación endócrino. Normalmente, la IL-2, se transcribe, sintetiza y secreta por las células T sólo tras la activación antigénica, por lo que su síntesis es transitoria y presenta un pico precoz de secreción que se produce aproximadamente 4 horas después de la activación (Stites, 1993; Kawano, et al. 1996; Levi-Schaffer, et al. 1996).

Las acciones principales de la IL-2 son sobre los linfocitos, de tal modo que es el principal factor de proliferación autócrino de los linfocitos T, y la cantidad de IL-2 sintetizada por las células T CD4+ es un factor determinante en la magnitud de las respuestas inmunitarias que dependen de las células T. La IL-2 estimula también la síntesis de otras citocinas derivadas de las células Th1 como el IFN- $\gamma$  y la linfoxina (LT). Mientras que la incapacidad de secretar esta citocina induce anergia de las células T específica para el antígeno. La IL-2 estimula la proliferación de las células NK y aumenta su función citolítica, induciendo también a las células asesinas activadas por linfoquinas (LAK), además actúa sinérgicamente con otras citocinas, especialmente con la IL-12, para inducir la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK. Y

finalmente, la IL-2, actúa sobre las células B humanas como factor de proliferación y como un estímulo para la síntesis de anticuerpos (Carter, et al. 1996; Sedlik, et al. 1997).

El *interferón gamma* (IFN- $\gamma$ ) es un interferón tipo II producido por células T cooperadoras CD4+ nativas (Th0), Th1, casi todas las células T CD8+ y por las células asesinas naturales (NK). Su transcripción se inicia directamente como consecuencia de la activación del antígeno, y es aumentada por la IL-2 y la IL-12. El IFN- $\gamma$  es un potente activador de los fagocitos mononucleares por lo que se le denomina factor activador de macrófagos (MAF); aumenta la expresión de moléculas de clase I y de clase II del MHC en diversas células. El IFN- $\gamma$  actúa directamente sobre los linfocitos T y B para promover su diferenciación, en las células T, la diferenciación es de T CD4+ nativas (Th0) a Th1, e inhibe la proliferación de las células Th2, pero es necesario para la maduración de los linfocitos T citotóxicos (LTC CD8+). También actúa sobre las células B para promover el "Switching" a las subclases de anticuerpos IgG2a e IgG3 e inhibir el "switching" a IgG1 e IgE. El IFN- $\gamma$  activa a los neutrófilos pero menos potientemente que el TNF o la linfoxina. Estimula la actividad citolítica de las células NK, más que el IFN tipo I y es un activador de las células endoteliales vasculares, promoviendo la adhesión de los linfocitos T CD4+ y los cambios morfológicos necesarios para facilitar su extravasación (Swain, et al. 1996; Asano, et al. 1996; Hockett, et al. 1996).

En resumen, el efecto neto de las actividades del IFN- $\gamma$  es promover las reacciones inflamatorias mediadas por las células Th1 y macrófagos, a la vez que suprimen las reacciones mediadas por las Th2 y por eosinófilos.

Las citocinas producidas por los linfocitos Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13), generalmente ayudan al desempeño adecuado de los linfocitos B, aumentan la producción de inmunoglobulinas del isotipo E, y de IgG1, estimulan a los eosinófilos y mastocitos; a la vez que desactivan a los macrófagos (Sander, et al. 1996; Nicholson, et al. 1996).

La *interleucina 4* (IL-4) es producida por los mastocitos y los basófilos activados, NK y algunas células T CD8<sup>+</sup>, pero principalmente por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> correspondientes a la subpoblación Th2. La principal función fisiológica de la IL-4 es la regulación de las reacciones alérgicas, pero a esta se suman otras acciones importantes sobre varios tipos celulares (Romani, et al. 1992). La IL-4 es necesaria para la producción de IgE, y es la principal citocina que estimula el "switching" o cambio de las inmunoglobulinas de las células B a este isotipo de cadena pesada. Los anticuerpos IgE son los principales mediadores de las reacciones de hipersensibilidad inmediata (alérgicas) y también se ha pensado que actúan en la defensa frente a las infecciones por helmintos, siendo la principal función fisiológica conocida del subgrupo Th2 de células T cooperadoras. Así mismo, esta citocina, inhibe el "switching" a IgG2a y a IgG3 (Kawano, et al. 1996; Barnard, et al. 1996).

La IL-4 inhibe la activación del macrófago y bloquea la mayor parte de los efectos activadores sobre el macrófago del IFN- $\gamma$ , incluyendo la producción aumentada de citocinas como la IL-1, el óxido nítrico y las prostaglandinas. Estos efectos son iguales a los de la IL-10, que producen también las células Th2, y esta es una de las principales razones por las que la activación de las células Th2 se asocia a menudo con una supresión de las reacciones inmunitarias mediadas por macrófagos (Barnard, et al. 1996). La IL-4 es un factor de proliferación y



diferenciación de las células del subgrupo Th2, promueve el desarrollo de células Th2 secretoras de IL-4 + IL-5, a partir de células T nativas estimuladas por el antígeno y actúa como factor de proliferación autócrino para las células Th2. Así mismo, estimula la expresión de ciertas moléculas de adhesión, sobre todo de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) sobre las células endoteliales, lo que produce una mayor unión de los linfocitos, los monocitos y especialmente de los eosinófilos. Y finalmente, la IL-4 es un factor de proliferación para los mastocitos, y actúa sinérgicamente con la interleucina 3 (IL-3) en la estimulación de la proliferación de los mastocitos. De este modo, la IL-4 desempeña una función crítica en las reacciones inflamatorias mediadas por la IgE y los eosinófilos (Abbas, 1995).

La *interleucina 6* es sintetizada por los fagocitos mononucleares, las células endoteliales vasculares, los fibroblastos, otras células en respuesta a la IL-1 y al TNF, y por algunas células Th2 activadas. Esta citocina presenta su acción principal sobre los hepatocitos y las células B; de tal manera que hace que los hepatocitos sintetizen varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, que contribuyen a la respuesta de fase aguda. La IL-6 sirve como factor de proliferación para las células B activadas en fases avanzadas de su diferenciación; además *in vitro* se ha visto que actúa como co-estimulador de las células T y de los timocitos, así como co-factor de otras citocinas para la proliferación precoz de células madre hematopoyéticas en la médula ósea (Abbas, 1995; Cumberbatch, et al. 1996)

La *interleucina 10* (IL-10) es una citocina producida por el subgrupo Th2 de las células cooperadas CD4+, por algunas células B activadas, por algunas células Th1, por macrófagos activados y por algunas células no linfocíticas (Moreno, 1996). Las dos actividades principales de la IL-10 son inhibir la producción de citocinas (TNF, IL-

1, quimiocinas e IL-12) por los macrófagos, e inhibir las funciones accesorias de éstos en la activación de la célula T a causa de una expresión reducida de moléculas de clase II del MHC y a la expresión reducida de ciertos coestimuladores (Powrie, et al. 1993). Dando como resultado una inhibición de la inflamación mediada por las células Th1. Además de sus efectos inhibidores sobre los macrófagos, también tiene acciones estimuladoras sobre las células B y puede ser un factor de 'switching' para la producción de IgG4 en seres humanos (Ferguson, et al. 1994).

La *interleucina 12* (IL-12) es la única que no es producida por las células T sino que es sintetizada por macrófagos, y por su acción sobre las células NK, puede ser considerada un mediador de la inmunidad natural, aunado a que las células Th1 y NK son las únicas que expresan receptores para la IL-12 (Abbas, 1995; Zamprano, 1993). Esta citocina es un importante regulador de las respuestas inmunitarias mediadas por células, por su efecto sobre las células NK y los linfocitos T. La IL-12 es el más potente activador conocido de la célula NK e induce la transcripción de IFN- $\gamma$ , muestra fuerte sinergia con la IL-2; además que aumenta la actividad citolítica de las células NK y es un factor de crecimiento para las mismas.

La IL-12 estimula la diferenciación de las células T CD4+ nativas al subgrupo Th1; estimula la diferenciación de las células T CD8+ a LTC activos y maduros. De este modo, la IL-12 es un importante regulador de la fase efectora de las reacciones inmunitarias celulares (Wynn, et al. 1994).

#### \* PARTICIPACIÓN DE LINFOCITOS TH1 - TH2 EN ENFERMEDADES PARASITARIAS

Las infecciones parasitarias son causa de una mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otra clase de microorganismos infecciosos, sobre todo en países en

desarrollo. Debido a que presentan una gran frecuencia (30% de la población mundial), se ha convertido en un tema de gran interés, principalmente para la Inmunología, lo que generó el desarrollo de la Inmunoparasitología (Abbas, 1995).

La mayor parte de los parásitos pasan a través de complicados ciclos vitales, parte de los cuales tienen lugar en los seres humanos, y otra parte en huéspedes intermediarios como las moscas, las garrapatas, los caracoles, etc. Los humanos suelen infectarse por la picadura de huéspedes intermedios o por compartir con ellos un medio ambiente particular (Pumarola, et al. 1994).

Una característica fundamental de la mayoría de las infecciones parasitarias es su cronicidad, debido a varias razones, incluidas la débil inmunidad natural y la capacidad de los parásitos de eludir o resistir su eliminación por respuestas inmunes específicas. En caso de que el parásito eluda o resista una respuesta inmune, puede provocar reacciones inmunitarias crónicas, las cuales pueden lesionar tejidos del propio hospedero, así como generar alteraciones en la regulación de la respuesta inmune (Roitt, 1994). Por lo tanto, algunas de las consecuencias clínico-patológicas de las infestaciones parasitarias se deben a la respuesta del hospedero y no a la propia infección.

En base a lo anterior existen dos orientaciones conceptuales, la primera en la que se afirma que las reacciones mediadas por IgE son vitales para la recuperación de la infección y la segunda que indica que la resistencia en huéspedes vacunados puede ser más dependiente de anticuerpos IgG e IgA preformados (Moreno, 1996). A lo cual, se le agrega el que la capacidad de actuar frente a ciertos helmintos esté más orientada hacia la producción de citocinas de tipo Th1, tales como IFN- $\gamma$ , que hacia la Th2 que favorece la producción de IgE. Una respuesta tipo Th2 es mediada

por la eosinofilia, mientras que una respuesta de tipo Th1 es mediada por un cuadro inflamatorio (Moll, 1996).

Cuando los microorganismos invaden el torrente, el hospedero desarrolla una respuesta humoral (paludismo, tripanosomiasis), mientras que los parásitos tisulares por lo común generan inmunidad mediada por células (Pumarola, 1994).

Así, una infección causada por protozoarios parásitos y helmintos induce un aumento en la producción de IgE y puede llevar a un influjo de inmunoglobulinas y eosinófilos mediado por mastocitos: los esquistosomas recubiertos por IgG o IgE son eliminados por medio de eosinófilos adherentes a través de mecanismos extracelulares que involucran la liberación de proteínas catiónicas y peroxidasa. Todo este proceso se debe a una respuesta a citocinas de tipo Th2 ya que la inoculación de anticuerpos anti-IL-4 reduce la producción de IgE y la de anti-IL-5 suprime la eosinofilia (Sander, et al. 1995; Nicholson, et al. 1996).

Durante una infección, las citocinas tienen un papel muy importante para evitar o disminuir la invasión microbiana. De tal modo, la inmunidad que se desarrolla para defenderse de una infección implica una interacción constante entre las defensas del huésped y los microorganismos mutantes que intentan desarrollar estrategias de evasión (Harrison, 1983; Brostoff, et al. 1991).

Así, la respuesta inmunitaria ante una infección se dirige hacia uno de los dos subtipos de células T CD4<sup>+</sup>. En el caso de pacientes con enfermedades alérgicas e infecciones helmínticas, la respuesta se polariza hacia una de tipo Th2 (Nicholson, et al. 1996); mientras que una respuesta tipo Th1 ocurre en pacientes con infecciones intracelulares mediada por una respuesta de hipersensibilidad retardada(DTH)

aguda, lo que se hace notorio por el tipo de citocinas que son secretadas al medio (Cua, et al. 1996).

En el caso de enfermedades infecciosas, se da una relación recíproca que media la inmunidad humoral y la celular, considerando la respuesta que cambia de Th1 a Th2. Lo que se encuentra aunado a un balance entre la efectividad de la respuesta inmune y la concentración y la distribución del antígeno (Swain, et al. 1996). En muchas enfermedades infecciosas, una respuesta predominantemente Th1 o Th2 puede resultar en grandes diferencias en forma, severidad, cronicidad, patología y resistencia a la reinfección (Stites, 1993).

Una de las infecciones más estudiadas en modelos murinos es la causada por *Leishmania major*, el cual es un parásito intracelular obligado. En este tipo de infección se ha observado que la proliferación parasitaria no es controlada y la enfermedad se disemina a órganos viscerales, cuando se desarrolla una respuesta inmune tipo Th2, principalmente, por células T CD4+ que producen grandes cantidades de IL-4 o IL-5. En cambio, cuando se desarrolla una respuesta de tipo Th1, la enfermedad es rápidamente controlada principalmente mediante la activación de macrófagos, principalmente por la vía del óxido nítrico (Moll, H. 1996) La eliminación total del parásito se da cuando se estimula una respuesta de tipo Th1 que libera grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , situación que puede ser inhibida por otras citocinas tipo Th2 (IL-10, IL-4). Sin embargo, la producción de anticuerpos y el desarrollo de una respuesta tipo Th2 parecen tener un efecto protector a posibles reinfecciones (Abbas et al, 1995).

Durante una infección por *Schistosoma sp.* se observa una respuesta inicial de tipo Th1, lo que se muestra como granulomas, los cuales son reacciones celulares

localizadas en las que intervienen principalmente macrófagos y fibroblastos que son los encargados de destruir el huevo del parásito depositado en los tejidos (intestino, hígado, etc) causando fibrosis del tejido (Harrison, 1983).

La respuesta granulomatosa se presenta en el inicio de la infección, pero ésta va reduciéndose conforme la infección se torna crónica, incrementándose una respuesta de tipo Th2. Además se han involucrado varios mecanismos inmunoregulatorios, como las células T CD8+ y CD4+. Estos mecanismos involucran la producción temprana de IFN- $\gamma$  en la etapa inicial de la infección, mientras que las células T CD4+ (Th2) aparecen en la fase tardía, generando una inhibición en la proliferación linfocítica y un estado anérgico (Allen et al, 1997)). Así mismo, es importante remarcar que como consecuencia de una respuesta tipo Th2 inducida por helmintos se observa eosinofilia mediada por IL-5 (Sedlik, et al, 1997).

Hay algunos tipos de parásitos que requieren el establecimiento de un tipo específico de respuesta para poder proliferar dentro del hospedero; tal como *Trichinella spiralis*. La cual requiere una elevada respuesta Th2 para poder reproducirse (Abbas et al, 1995), o el propio *S. mansoni*, que en fases muy tempranas de su vida aprovecha la secreción de TNF- $\alpha$  de su hospedero para pasar a su siguiente estadio (Amin et al, 1992)

#### \* CISTICERCOSIS POR *T. crassiceps*

La cisticercosis es una entidad patológica muy frecuente en países en vías de desarrollo, cuya gravedad va a depender del lugar anatómico en que se aloje el parásito. Este tipo de parasitosis, causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, puede presentarse en humanos y ganado porcino, siendo este último un hospedero

intermediario, mientras que el humano es hospedero intermediario y/o definitivo; y es el único que puede alojar al parásito adulto. Por lo que, al hombre, se le considera responsable de la diseminación de los huevecillos en el medio ambiente (Larraide et al, 1989).

En base a lo anterior es que se han incrementado las investigaciones sobre cisticercosis, principalmente en la búsqueda de un inmunodiagnóstico específico, confiable y reproducible que pueda manejarse para un número alto de muestras biológicas, y que permita la detección temprana de pacientes con cisticercosis (Larraide et al, 1986 y 1989a).

Así mismo, se siguen realizando investigaciones tendientes a conocer los factores biológicos que intervienen en la interacción hospedero-parásito en la cisticercosis por *T. solium*, pero debido a que es complicado y costoso realizar estos estudios en hospederos naturales, los resultados obtenidos son un tanto insuficientes para sostener las propuestas de los mecanismos que definen la sobrevivencia del parásito en el hospedero inmunocompetente (Flisser, 1989) Por lo que se han propuesto modelos experimentales que permitan estudiar con más detalle los factores que pudieran intervenir en los mecanismos de susceptibilidad o protección para esta parasitosis.

Además del interés aplicativo en el área médica, todas las cisticercosis tienen gran interés biológico, en especial para la Inmunología (Villa, et al. 1996). Puesto que los cisticercos (metacéstodos) y la forma adulta (céstodos) son organismos grandes (de varios milímetros hasta decenas de centímetros), estructural y funcionalmente complejos, ya que presentan tejidos estructurales, sistemas nervioso, muscular; aparato reproductor, órganos de fijación, especialización periférica; y

contienen numerosos y potentes antígenos (Pumarola et al, 1994). Estructuras que le permiten traspasar la barrera inmunitaria, permaneciendo por largos períodos en un hospedero inmunocompetente (Terrazas et al, 1993).

## 1 EL MODELO EXPERIMENTAL

Para lograr un mejor estudio de la cisticercosis, se empleó un modelo experimental de parasitosis murina causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps*. Este modelo ha permitido estudiar los factores biológicos participantes en el desarrollo del parásito. Lo cual, se complementa con el hecho de que *T. crassiceps* presenta una serie de semejanzas con *T. solium*, por ejemplo: a) tiene un ciclo biológico similar (de manera natural, el ratón se infecta al ingerir huevecillos presentes en el medio ambiente contaminado con heces de carnívoros pequeños que alojan al parásito adulto en el intestino, y el ciclo se completa cuando estos ratones son devorados por los carnívoros); b) las manifestaciones patológicas también son similares, debido a que el cisticerco de *T. crassiceps* puede alojarse crónicamente en los ratones sin causar daños importantes a las estructuras vecinas del hospedero (Haselgrove et al., 1987) aunque, en los últimos estadios de la infección hay una ligera inflamación en la serosa intestinal, que es semejante a aquella causada por el cisticerco de *T. solium*, que pueden relacionar los resultados encontrados en este modelo con aquellas infecciones causadas por otros céstodos incluyendo la cisticercosis humana y porcina (Larraide et al, 1989a). Otra ventaja que ofrece el modelo, es que los cisticercos de *T. crassiceps* pueden servir como una fuente importante de



antígenos útiles para el inmunodiagnóstico en cisticercosis (Larralde y cols. 1990) e incluso para vacunación, debido a que en el modelo experimental se ha encontrado inmunoprotección cruzada entre *T. crassiceps* y *T. solium* (Sciutto y cols. 1990).

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

## ii. PARTICIPACIÓN DE GENES H-2 EN LA SUSCEPTIBILIDAD

La existencia de diferencias de susceptibilidad asociadas al complejo mayor de histocompatibilidad han sido descritas recientemente (Sciutto et al, 1991). En estos trabajos se demostró que la cepa BALB/c (H-2d) fue más susceptible a la infección experimental con el cisticerco de *T. crassiceps* que las cepas BALB/b (H-2b) y BALB/k (H-2k) y otras (Sciutto et al, 1991). Es importante mencionar que estas tres cepas de ratones tienen un fondo genético común (BALB) y sólo varían en el

locus H-2, de tal manera que las diferencias de susceptibilidad entre las cepas se deben exclusivamente a esta variación genética.

### III VACUNAS

La cisticercosis por *Taenia solium* es una parasitosis frecuente en México y en otros países en desarrollo que afecta al hombre y al cerdo. La localización del parásito en el sistema nervioso central del hombre ocasiona un importante y frecuente problema de salud humana (Larralde, 1989; Terrazas, 1993), reportándose en aproximadamente el 2% de las autopsias realizadas en México.

Con el fin de tener una visión más clara sobre esta parasitosis y diseñar alternativas para reducir la incidencia de la cisticercosis porcina, investigadores dedicados a ello han utilizado un modelo experimental adecuado. Donde se evalúa la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, el cual permite obtener información necesaria para considerar a esta cisticercosis como un modelo adecuado para evaluar antígenos de potencial interés en el diseño de una vacuna y avanzar en el diseño de pruebas diagnósticas (Sciutto et al, 1990, 1991, 1995; Valdez et al., 1994). Junto con ello se han encontrado importantes diferencias de susceptibilidad a la parasitosis asociadas a factores genéticos (Fragoso et al., 1996) y sexuales (Huerta et al, 1992; Bojalil et al., 1993; Terrazas et al, 1994; Larralde et al., 1995), de tal modo que estos hallazgos llevaron a la búsqueda de genes de resistencia a la cisticercosis que podrían utilizarse para modificar la susceptibilidad natural de hospedero, como una estrategia adicional para el control de la enfermedad.

Actualmente la investigación está orientada hacia dos puntos: Evaluar diferentes procedimientos para aumentar la resistencia del cerdo a la cisticercosis, mediante la inoculación de fracciones antigénicas de *T. crassiceps* a cerdos para identificar las fracciones protectoras contra la cisticercosis. El otro aspecto importante es la identificación de antígenos recombinantes (KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12) incluidos en las fracciones protectoras contra la cisticercosis que inducen altos niveles de protección (Sciutto, et al. 1990).

Por otro lado, se han identificado genes de resistencia a la cisticercosis y se han evaluado a través de la producción de animales transgénicos para la producción de la proteína Qa-2, la cual ha demostrado ser un posible factor de resistencia a esta parasitosis. Sin embargo, el desarrollo de estas estrategias de protección no han sido basadas en parámetros inmunológicos sólidos.

#### IV. RESPUESTA INMUNE AL PARÁSITO

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

Los primeros en demostrar que el hospedero es capaz de montar una respuesta inmune humoral específica en contra de los antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* fueron Freeman en 1964 y Chernin en 1977. Posteriormente, Good y

Miller en 1978 observaron *in vitro* el efecto dañino del complemento sobre el tegumento del parásito sin afectar la viabilidad del mismo.

Trabajos más recientes han demostrado que la respuesta de tipo humoral es insuficiente para la inmunoprotección en esta parasitosis (Sciutto et al, 1990) Por el contrario, se ha observado que la transferencia pasiva de anticuerpos anti-cisticerco puede incluso facilitar el crecimiento del parásito en el animal receptor (Sciutto, 1989).

Actualmente se sabe que una respuesta inmune de tipo celular esta involucrada en la resistencia contra esta infección, lo anterior es en base a los resultados obtenidos por algunos investigadores que estimularon la respuesta inmune celular con ciclofosfamida por un lado, y por otro realizaron timentomías neonatales (Bojalil, et al. 1993). Además, los animales neonatalmente timentomizados fueron transferidos con células T inmunes generando en ellos protección, demostrándose así que la respuesta inmune dependiente de células T es importante en el control de ésta parasitosis.

Recientemente se ha demostrado que durante la fase temprana en la infección por *T. crassiceps*, existe una respuesta inmune tipo Th1, que coincide con un menor número de parásitos. Al avanzar la infección, esta respuesta es desplazada gradualmente por una tipo Th2, concomitantemente con un aumento en la carga parasitaria. De modo, que se ha propuesto que una respuesta inmune tipo Th1 puede ser protectora contra ésta infección, mientras que una tipo Th2 puede ser facilitadora de la misma (Terrazas et al., 1998).

**OBJETIVOS  
E  
HIPÓTESIS**

## OBJETIVOS

### GENERALES

- Determinar la importancia de las citocinas tipo Th1 y Th2 en la fase temprana de la infección causada por *Taenia crassiceps*.

### PARTICULARES

- Determinar el efecto de un tratamiento temprano con anticuerpos monoclonales anti-IL-10, anti-IFN- $\gamma$  y anti-IL-4 in vivo sobre la susceptibilidad a *T. crassiceps*.
- Determinar el efecto de un tratamiento con IFN- $\gamma$  mezclado con IL-2 recombinante, de IL-4 y de IL-10 recombinantes sobre la resistencia a la infección con *T. crassiceps*.
- Evaluar la carga parasitaria después de estos tratamientos.
- Evaluar la producción de óxido nítrico al final de la infección para cada uno de los tratamientos.
- Evaluar el tipo de respuesta inmune predominante al final de la infección.

## HIPÓTESIS

- El tratamiento temprano de la infección con interleucinas o anticuerpos anti-interleucinas que favorecen el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1 es capaz de generar mayor resistencia contra la cisticercosis causada por *Taenia crassiceps*.

**PARTE  
EXPERIMENTAL**

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este estudio se emplearon 6 grupos de 5 ratones cada uno, donde cada grupo recibió diferente tratamiento: 3 grupos de ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps* fueron tratados con citocinas recombinantes (IFN- $\gamma$  + IL-2; IL-4, IL-10, respectivamente), y 3 grupos de animales parasitados se trataron con anticuerpos monoclonales contra IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$ , respectivamente. Los tratamientos fueron aplicados únicamente durante la primera semana de infección; además se consideró un grupo únicamente parasitado denominado grupo control; y un grupo de ratones que no fueron tratados con nada, denominado grupo normal.

Después de un mes de infección se evaluó la carga parasitaria en cada animal; las concentraciones de óxido nítrico mediante un ensayo colorimétrico, las subclases de inmunoglobulinas G (IgG1, IgG2a e IgG2b) mediante la realización de ensayos de ELISA; y la presencia o ausencia de las siguientes citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  por medio de la técnica de ELISA-sandwich en sobrenadantes de cultivo de células de bazo estimulados con concanavalina A (Con-A) o antígeno de *T. crassiceps*, así como la respuesta celular proliferativa de cada animal.

Para finalmente aplicar análisis estadístico de *t* de Student independiente mediante el programa de SPSS for Windows, versión 3.4.



## METODOLOGÍA

↳ ANIMALES: Se emplearon ratones hembra de la cepa BALB/c; los cuales fueron mantenidos bajo alimentación convencional y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

↳ OBTENCIÓN DE PARÁSITOS: Los metacéstodos de *T. crassiceps* se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones hembra BALB/c previamente infectados, al menos durante 8 semanas. Los cisticercos fueron lavados 4 veces en amortiguador de fosfato (PBS) y seleccionados para la infección de otros ratones o inmediatamente centrifugados a 45 700 g/h a 4°C para obtener el fluido vesicular que sirvió como fuente de antígeno.

↳ INFECCIÓN DE RATONES: La infección experimental se realizó mediante inyección intraperitoneal de cada ratón con 10 cisticercos de *T. crassiceps*, seleccionando aquellos con menos de 2 mm de diámetro y sin gemas.

↳ TRATAMIENTOS: Inmediatamente después de la infección, los 6 grupos de ratones fueron tratados intraperitonealmente con 100 µl de solución, a diario durante una semana, bajo el siguiente esquema :

## ESQUEMA DE TRATAMIENTO

GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS RECIBIDA
NORMAL	No recibieron ninguna.	Ninguna
CONTROL	Soío parasitados.	10 cisticercos/animal
CITOCINAS RECOMBINANTES		
IL-2 + IFN- $\gamma$ (Genzyme Diagnostic, USA)	Parasitados + 100 $\mu$ l sol. citocinas (500 U/ml para IL-2; 500 $\mu$ g/ml IFN- $\gamma$ )	50 U/animal/día para IL-2 400 pg/animal/día para IFN- $\gamma$
IL-4 (Genzyme Diagnostic, USA)	Parasitados + 100 $\mu$ l sol. citocina (20 $\mu$ g/ml)	2.0 ng/animal/día
IL-10 (Genzyme Diagnostic, USA)	Parasitados + 100 $\mu$ l sol. citocina (20 $\mu$ g/ml)	1.0 ng/animal/día
ANTICUERPOS MONOCLONALES		
anti-IL-4 (Genzyme Diagnostic, USA)	Parasitados + 100 $\mu$ l sol. anticuerpo (180 $\mu$ g/ml)	DOSIS UNICA
anti-IL-10 (Genzyme Diagnostic, USA)	Parasitados + 100 $\mu$ l sol. anticuerpo (500 $\mu$ g/ml)	DOSIS UNICA
anti-IFN- $\gamma$ (Genzyme Diagnostic, USA)	Parasitados + 100 $\mu$ l sol. anticuerpo (500 $\mu$ g/ml)	DOSIS UNICA

↳ OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO: Después de 30 días de infección, los ratones anteriormente parasitados y tratados durante el tiempo predeterminado fueron anestesiados con éter etílico para obtener una muestra sanguínea proveniente del plexo retroorbital. La sangre de cada ratón se centrifugó a 2500 rpm/10 min para separar el suero, el cual se congeló a -20°C.

Posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, se disecó el bazo para obtener las células en medio de cultivo RPMi-1640 suplementado, bajo condiciones de esterilidad, en una caja de Petri colocada sobre hielo. Entre este paso y el siguiente se contaron los cisticercos en cada animal.

Una vez disgregadas las células, se centrifugaron (2000 rpm/5 min) para separar los linfocitos del medio; los cuales se resuspendieron durante 60 segundos en una solución hemolizante<sup>1</sup>, que permite eliminar los eritrocitos presentes. Después se ajustaron a una concentración final de  $3 \times 10^6$  células viables/ml, mediante el método de azul tripano.

↳ PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS DE BAZO: Para medir su capacidad proliferativa, los linfocitos de bazo obtenidos anteriormente fueron sembrados en placas de 96 pozos (Costar, Cambridge) y estimulados con el mitógeno Concanavalina (Con-A<sup>+</sup>, Sigma) 2 µg/ml durante 72 horas de cultivo a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Dieciocho horas antes de finalizar el cultivo se agregaron 0.5 µCi de [3H]-timidina por pozo, con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol (New England Nuclear).

La placa se volvió a incubar bajo las mismas condiciones y, 18 horas después las células se cosecharon sobre tiras de papel de fibra de viano. Las cuales se

dejaron secar a totalidad, para posteriormente ser empaquetados en bolsas de polivinilo que son selladas herméticamente al calor; previa adición de 10 ml de líquido de centelleo (2,5-difeniloxazol, PPO; P,[bis(2,5-feniloxazol)]), POPOP disueltos en tolueno); para medir la radiactividad media mediante un contador de centelleo (Beta-plate), dada en cuentas por minuto (cpm).

↳ DETECCIÓN DE ANTICUERPOS: La determinación de las subclases de inmunoglobulinas tipo G (IgG1, IgG2a e IgG2b) se realizó en los sueros de cada uno de los ratones infectados mediante la técnica de ELISA-indirecta. Para ello se sensibilizaron las placas de ELISA (Costar, Cambridge) con el antígeno (fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*) diluyéndolo a 3 µg proteína/ml SSI para colocar 100 µl a cada pozo de la placa, la cual se incubó toda la noche a 4°C. Después se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20.

Se colocaron 100 µl de cada uno de los sueros diluidos 1:100 en PBS-Tween 20/BSA 3% en cada pozo, incubando 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron 4 veces y se les agregó 100 µl de anti-IgG (Sigma Immuno Chemicals, USA) marcado con peroxidasa (Amersham Co., USA), según el isotipo, diluidos 1:1000 en PBS-BSA 3%; incubando 1.5 horas a temperatura ambiente, lavando las placas 4 veces más para finalmente adicionar 100 µl del sustrato (2,2'-Azinobis[3-etilbenzotrazolina-6-acido sulfónico]-biamonio, ABTS; Sigma Immuno Chemicals, USA). Dejando que desarrollara la reacción a temperatura ambiente durante 15 a 45 minutos, para posteriormente detenerla con la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 4N. La densidad óptica de la solución contenida en cada pozo se leyó a una longitud de onda de 492 nm.

↳ DETECCION DE CITOCINAS: La concentración de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  se midieron en los sobrenadantes de los diferentes cultivos celulares, mediante la técnica de ELISA-Sandwich; para ello se utilizó 50  $\mu$ l de anticuerpos monoclonales contra cada una de las citocinas (anticuerpo de captura, 1  $\mu$ g/ml), los que se fijan a una placa de ELISA (Costar, Cambridge) de 96 pozos durante toda una noche a 4°C. Después las placas se lavaron 4 veces con PBS-Tween. Posteriormente se agregaron 100  $\mu$ l de sobrenadantes diluidos 1:2 en PBS-BSA 3%, incubando las placas a 4°C toda la noche. Después se lavaron 3 veces con PBS-Tween para enseguida añadir 100  $\mu$ l de los anticuerpos monoclonales secundarios específicos para cada interleucina, marcados con biotina (anticuerpos de detección, 1  $\mu$ g/ml), se incubaron 45 minutos a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron 6 veces y a cada pozo se adicionaron 100  $\mu$ l de la enzima estreptoavidina-peroxidasa (1:2000) en PBS-BSA 3% y se incubaron 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se lavaron 6 veces más para finalmente agregar el sustrato (2,2'-Azinobis[3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfónico]-biamonio, ABTS; Sigma Immuno Chemicals, USA).

Se dejó desarrollar la reacción a temperatura ambiente durante 15 a 45 minutos, pasado este tiempo, la reacción se detuvo con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 4N. Después se leyó la densidad óptica a una longitud de onda de 490 nm en un lector de ELISA. Los valores de las citocinas (concentración en los sobrenadantes) se obtuvieron a través de una curva patrón desarrollada con citocinas recombinantes murinas para cada una de ellas y sobre dichas curvas se interpolaron los datos obtenidos con los sobrenadantes.

↳ DETERMINACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO: Las células de bazo, de los animales de los diferentes grupos, se cultivaron como se mencionó anteriormente y en los sobrenadantes obtenidos de estos cultivos se determinó la producción de óxido nítrico, a través de la identificación de uno de los metabolitos más estables como es el NO<sub>2</sub>. La determinación se llevó a cabo a través de una reacción colorimétrica generada por el colorante de Griess (Ding et al., 1988). Brevemente, se hizo una curva patrón con diluciones dobles de nitrato de sodio (100 μM a 0.05 μM) en una placa de 96 pozos, en los demás pozos se agregaron 25 μl de los sobrenadantes de los cultivos linfocitarios. Posteriormente se hacen reaccionar con 50 μl del reactivo de Griess, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para posteriormente leer la placa en el lector de ELISA a 550 nm. Finalmente, los valores de absorbancia se interpolaron dentro de la curva antes mencionada.

↳ CONTEO DE PARÁSITOS: Al animal muerto por dislocación cervical se le abrió la cavidad peritoneal para extraer los cisticercos de *T. crassiceps* mediante el empleo de una jeringa con la cual se lavó la cavidad con PBS hasta obtener la totalidad de la población parasitaria.

Se lavaron varias veces con PBS hasta que el sobrenadante quedó claro y se depositaron en una caja de Petri para su conteo.

# RESULTADOS

# EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

## ANTI-CITOCINAS

### \* NÚMERO DE PARÁSITOS

Con el propósito de analizar la influencia de las citocinas tipo Th1 y tipo Th2 sobre la susceptibilidad a la cisticercosis experimental, se llevó a cabo un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-interferón  $\gamma$ , anti-IL-10 ó anti-IL-4 al momento de infectar intraperitonealmente a los ratones con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. El tratamiento con anti-IFN  $\gamma$  indujo en estos animales un incremento en la carga parasitaria del 90% con respecto al grupo control (Fig. 1,  $P < 0.01$ ); mientras que el grupo tratado con anti-IL-4 no modificó significativamente la susceptibilidad al parásito. Por otro lado, los animales que recibieron anti-IL-10 presentaron una disminución significativa (mayor al 50%) en su carga parasitaria con respecto al grupo parasitado.

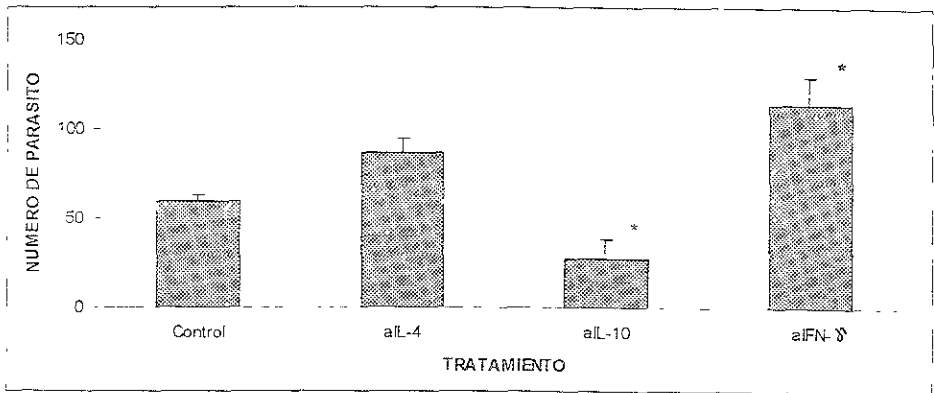


Figura 1. Efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-citocinas, en la susceptibilidad a *T. crassiceps*. Nótese el incremento en la carga parasitaria de los animales tratados con anti-IFN- $\gamma$ , y la disminución de la misma en el tratamiento con anti-IL-10; \* indica  $P < 0.02$  con respecto al grupo control.



\* CITOCINAS

➤ IL-4

La figura 2 muestra como el tratamiento con los diferentes anticuerpos anti-citocinas no modificaron la producción de interleucina 4, la cual siguió produciéndose en la misma proporción en todos los grupos, en comparación con el grupo control.

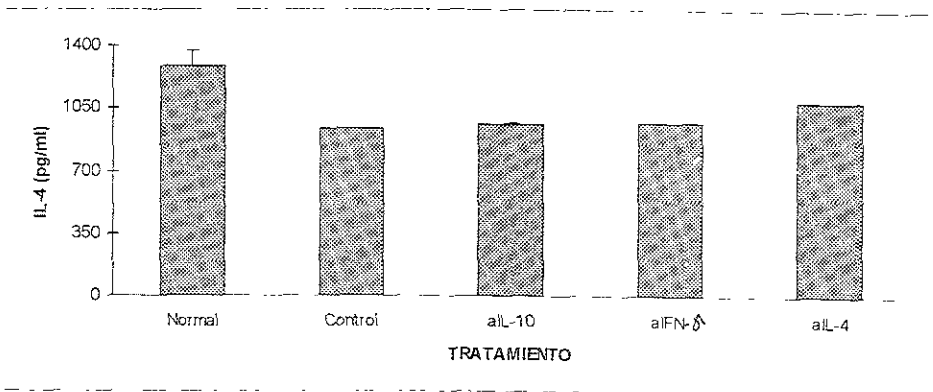


Figura 2 Análisis de interleucina 4 producida por linfocitos de bazo in vitro mediante la inducción con concanavalina A

➤ IL-10

La producción de interleucina 10 no se modificó significativamente (8.4%) en el grupo control con respecto al grupo normal. Por otro lado el tratamiento con anti-interleucina 10 no bloqueó completamente la producción de esta citocina (Fig. 3), mientras que al tratarlos tempranamente con anti-IFN- $\gamma$  se observó un incremento del 48% con respecto al grupo parasitado,  $p < 0.05$ .

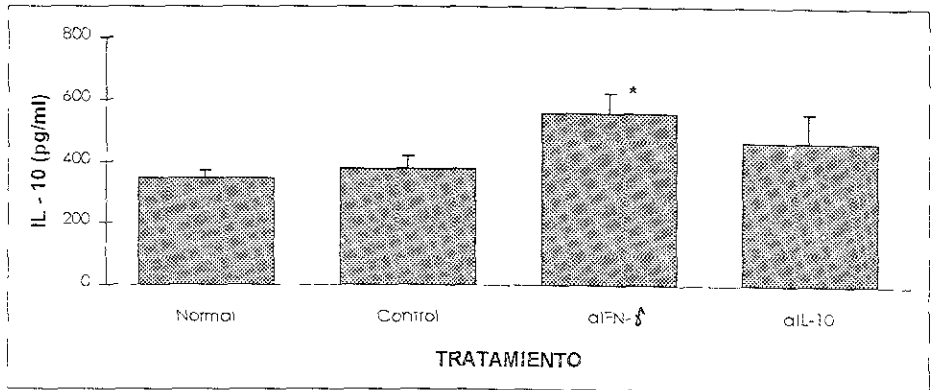


Figura 3. Análisis de interleucina 10 producida por linfocitos de bazo in vitro mediante la inducción con concanavalina A (\*  $p < 0.05$ )

➤ IFN- $\gamma$

El IFN- $\gamma$  es una citocina característica de una respuesta tipo Th1, y frecuentemente es considerada como un marcador de este tipo de respuesta. En estos ensayos fue medida, como una forma de determinar la polarización de la respuesta inmune. El tratamiento con anti-interleucina 10 produjo un decremento significativo (66%) en la producción de esta citocina con respecto al grupo normal ( $p < 0.05$ ). Mientras que el tratamiento con anti-interferón gama abatió la producción de esta citocina en los sobrenadantes de cultivo con respecto al grupo de animales sanos, efecto parecido al observado con el grupo control (57% de disminución) con respecto al mismo grupo (Fig. 4).

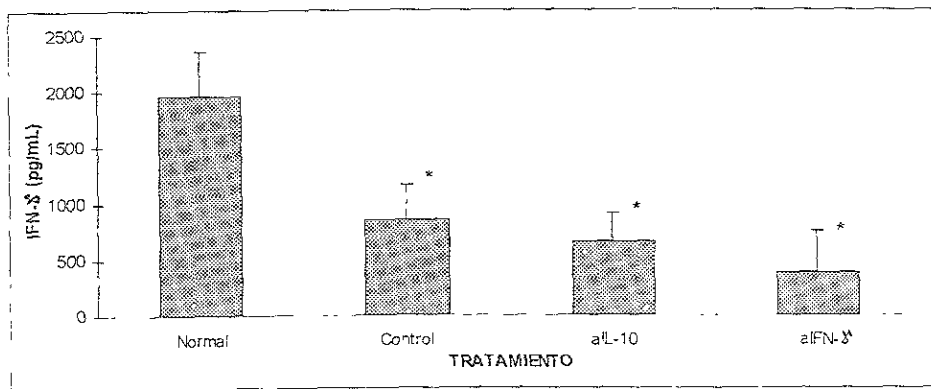


Figura 4. Análisis de interferón gamma producido por células de bazo in vitro mediante la estimulación con Con-A (\*\*  $p < 0.01$ )

\* ANTICUERPOS

Aquí, de las diferentes subclases de anticuerpos del isotipo IgG anti-cisticerco que presentaron los animales sólo parasitados (sin tratamiento), los de la subclase IgG2b fueron los que se encontraron más elevados, seguidos por los IgG1 y por último los niveles más bajos fueron los de IgG2a.

➤ IgG1

La subclase de anticuerpos IgG1 ha sido ampliamente relacionada con una respuesta de tipo Th2 en diferentes infecciones. Los distintos tratamientos influyeron considerablemente en los niveles de estos anticuerpos, puesto que el grupo sólo parasitado produjo un significativo 93% de incremento con respecto al grupo normal. Por otro lado, los animales tratados con anti-IFN- $\gamma$  presentaron los niveles más altos de IgG1 (3.1%) con respecto al grupo control, mientras que el tratamiento con anti-interleucina 10 produjo un decremento importante (34.2%) sobre esta subclase de anticuerpo (Fig. 5) al compararlo contra el mismo grupo.

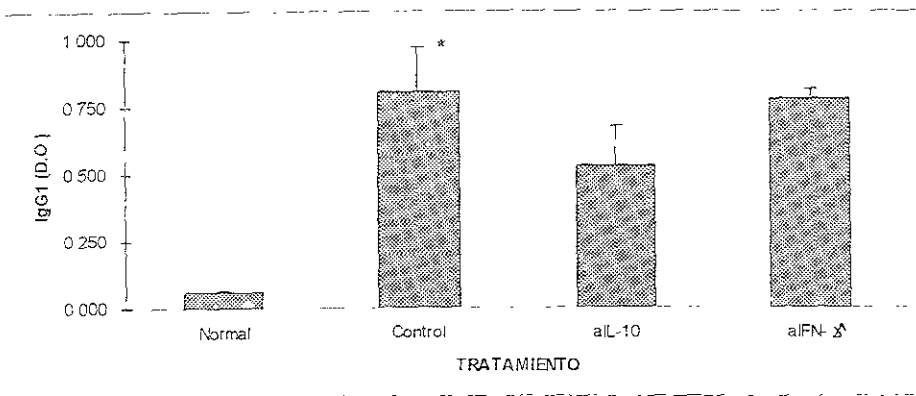


Figura 5. Análisis de anticuerpos específicos del isotipo IgG1 séricos producidos por el hospedero después de un mes de infección intraperitoneal por metacístodos de *T. crassiceps*. (\*  $p < 0.05$  con respecto al grupo normal)

➤ IgG2a

La presencia de esta subclase de anticuerpo en el suero se ha asociado a respuestas de tipo Th1, en nuestros animales sólo parasitados el nivel de IgG2a fue menor que el de las otras subclases. El grupo de animales únicamente parasitados produjo un aumento del 50.4% al compararlo con el grupo normal. El tratamiento con anti-IFN- $\gamma$  incrementó ligeramente (3.4%) la producción de este anticuerpo con respecto al grupo control, mientras que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-IL-10 lo modificó en 17.9%, con respecto al mismo grupo (Fig. 6).

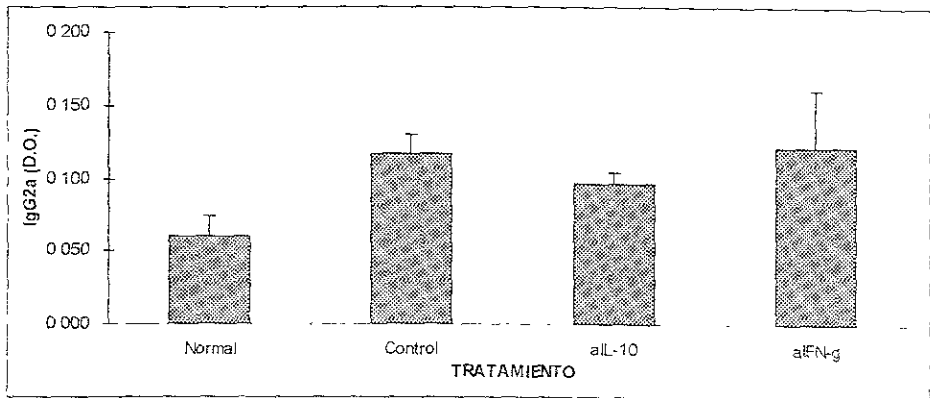


Figura 6. Análisis de anticuerpos isotipo IgG2a sericos producidos por el hospedero cuatro semanas después de iniciar un estado infeccioso con metacístodos de *T. cruzi*.

- ÓXIDO NÍTRICO

Los cultivos celulares de los animales sólo parasitados presentaron los niveles más altos de óxido nítrico (47.3%) con respecto al grupo normal. Al tratar a los animales con anti-interferón gamma, se obtuvieron niveles menores (19.8%) a los obtenidos con los animales parasitados. Notándose una disminución del 36.6% en el grupo tratado con anti-interleucina 10 al compararlos con el mismo grupo (Fig. 7).

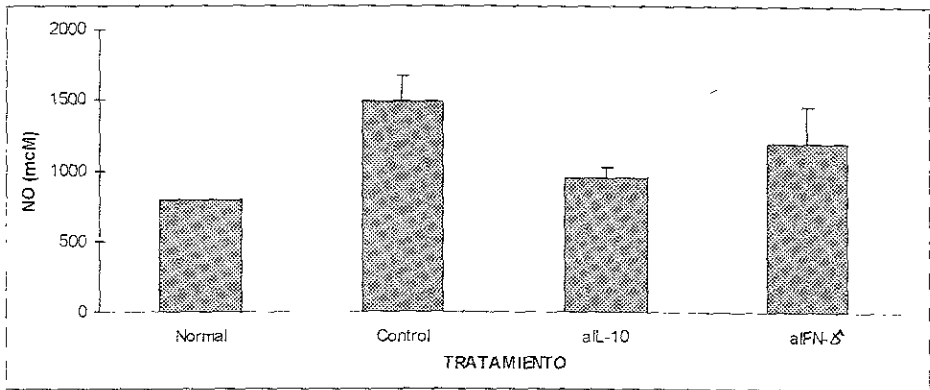


Figura 7. Determinación de oxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de células de bazo mediante la inducción con antígenos parasitarios de *T. crassiceps*.

•RESPUESTA PROLIFERATIVA A CON-A Y A ANTIGENOS ESPECIFICOS DE *T. crassiceps*  
(INCORPORACIÓN DE TIMIDINA)

La respuesta proliferativa de los linfocitos T a Con-A y a antígenos específicos, son consideradas como medidas de la respuesta inmune celular. Aquí fueron evaluadas para determinar la eficacia de los tratamientos aplicados. Las células de los animales solo infectados con *T. crassiceps* presentaron una respuesta proliferativa significativamente menor (162%) a la Con-A que los animales normales. El tratamiento temprano con anti-interleucina 10 indujo una recuperación en la respuesta a Con-A (89,000 cpm), que fue semejante a la que se presenta en el grupo normal (110,000 cpm). Los animales tratados con anti-interferón gamma presentaron niveles disminuídos (58%) como respuesta al compararlo con el grupo control (Fig. 8).

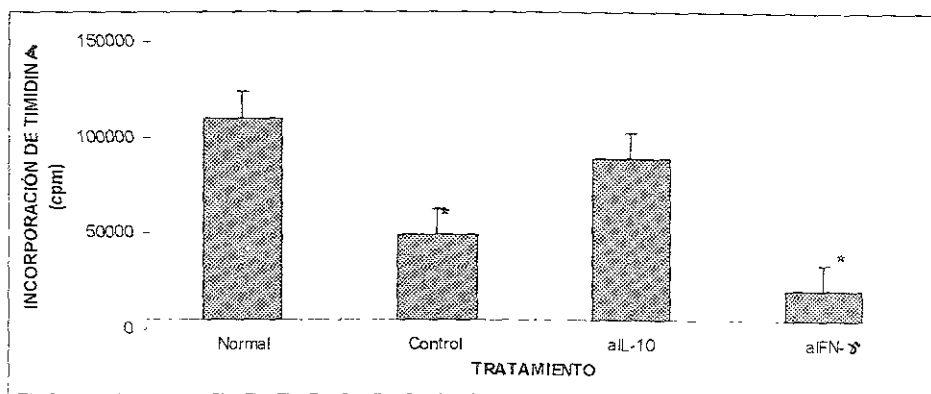


Figura 8. Análisis de proliferación de células de bazo cultivadas in vitro y estimulados con el mitógeno Con- A. (\*\* p < 0.01 con respecto al grupo normal \* p < 0.05 con respecto al grupo control)

La respuesta proliferativa de los linfocitos de bazo al antígeno de *T. crassiceps* en los animales parasitados sin tratamiento fue baja (1920 cpm), como ya había sido reportada previamente (Terrazas et al, 1998). Sin embargo, el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-interleucina 10 indujo una respuesta proliferativa antígeno-específica significativamente mayor que en los controles ( $p < 0.05$ , 118%). Mientras que el tratamiento con anti-IFN- $\gamma$  indujo una reducción en esta respuesta (43%), con respecto al grupo únicamente parasitado (Fig. 9).

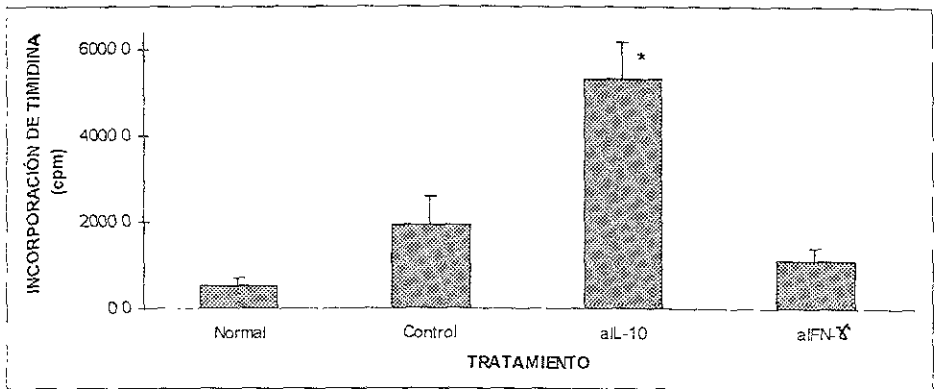


Figura 9. Respuesta celular al antígeno de *T. crassiceps*. Obsérvese que la respuesta es aumentada por el tratamiento con anti-IL-10 (\*  $p < 0.05$ ).



## EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON CITOCINAS RECOMBINANTES

\* NÚMERO DE PARÁSITOS

Con el propósito de determinar que efecto podría tener la presencia temprana de algunas citocinas tipo Th1 o Th2 en la evolución de la infección por *T. crassiceps*, se desarrollaron experimentos en los cuales durante la primera semana de infección los animales parasitados recibieron citocinas recombinantes por vía intraperitoneal. El tratamiento inicial con interleucina 10 provocó un incremento significativo (66%) en la carga parasitaria ( $P < 0.05$  con respecto al control). El tratamiento con interleucina 4 no modificó de manera significativa el desarrollo de la infección por *T. crassiceps*. En cambio, el tratamiento con IFN- $\gamma$  + IL-2 generó una restricción muy significativa en el crecimiento parasitario ( $P < 0.01$ , 85% con respecto al grupo parasitado), modificando de esta manera la susceptibilidad a la infección (Fig. 10).

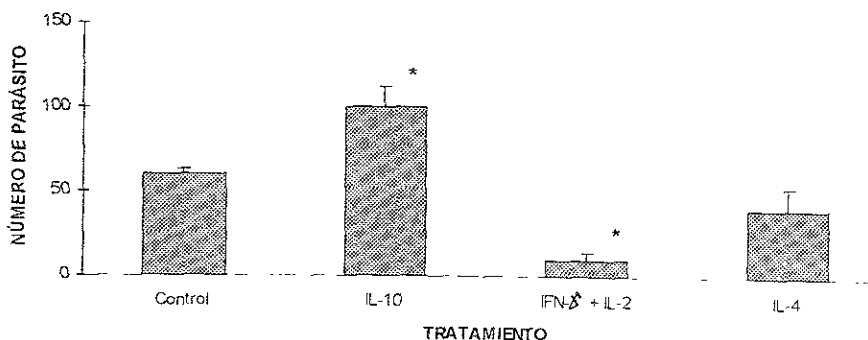


Figura 10. Determinación del número de cisticercos en animales infectados con metacístodos de *T. crassiceps* que fueron tratados con interleucinas recombinantes murinas (\*  $p < 0.05$ )

◦ CITOCINAS

➤ IL-2

La IL-2 es una interleucina fundamental para el desarrollo de una respuesta inmune (principalmente de tipo Th1) y para la proliferación de los linfocitos. En este estudio la IL-2 se detectó por la técnica de ELISA, la figura 11 muestra que la producción de esta citocina fue disminuida (472%) por la sola infección con *T. evansi* con respecto al control, mientras que los animales tratados con interferón gamma e interleucina 2 produjeron una mayor cantidad de IL-2 (208.8%), pero aún con ello fue el 46.1% menor de la que produjo el grupo normal. Por otro lado, el tratamiento con IL-10 recombinante indujo un decremento del 29% en la producción de IL-2, con respecto al grupo control. Lo que indica que la infección parasitaria induce una disminución en la producción de esta interleucina y que los tratamientos realizados no fueron suficientes para restablecerla a niveles normales.

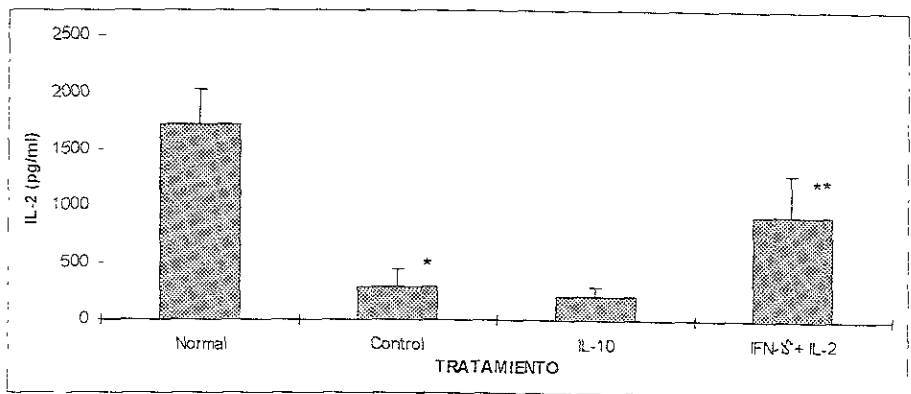


Figura 11. Análisis de interleucina 2 producida por células de bazo in vitro mediante la inducción con Con-A (\*  $p < 0.05$  con respecto al normal \*\*  $p < 0.05$  con respecto al control)

## ➤ IL-4

Los datos mostrados en la figura 12 nos indican que tampoco importa el tipo de tratamiento que se les dé a los animales ya que en cualquiera de los casos, incluyendo el grupo normal, la cantidad producida de interleucina 4 es la misma, independientemente de si hay infección o tratamiento alguno.

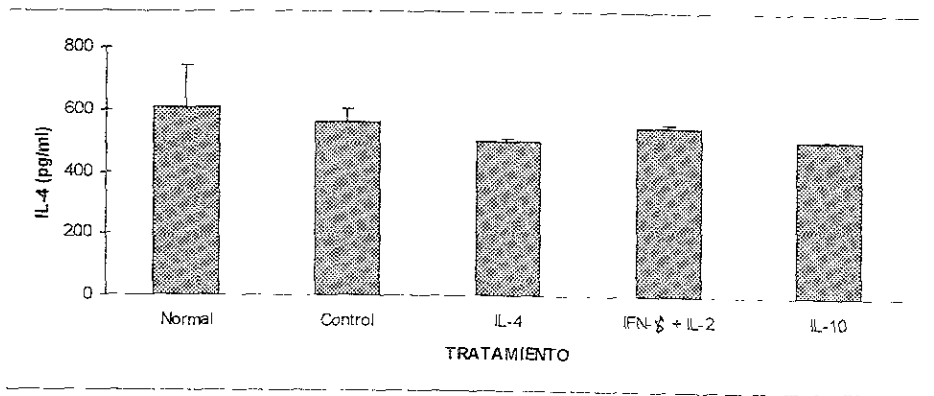


Figura 12. Análisis de interleucina 4 producida por células de bazo in vitro mediante la inducción con concanavalina A

➤ IFN- $\gamma$

La sola infección con *T. evansi* generó una menor producción de IFN- $\gamma$  en las células estimuladas con Con-A de 228.4% con respecto al grupo normal. Mientras que el tratamiento con IFN- $\gamma$  + IL-2 provocó un incremento significativo (695.2%) en la producción de esta citocina. Por otro lado la inyección temprana de interleucina 10 indujo también una menor producción de IFN- $\gamma$  (29.2%), todo en comparación con el grupo control (Fig. 13)

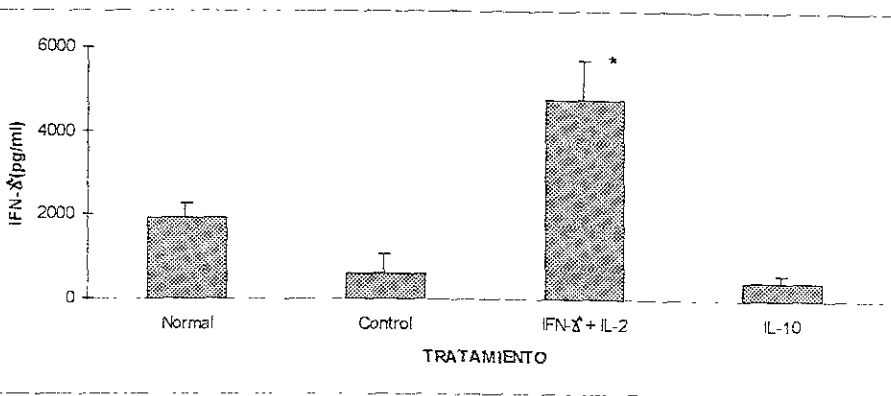


Figura 13. Análisis de interferón gamma producido por células de bazo in vitro con Con-A (\* p<0.05, \*\* p<0.01)

◦ ANTICUERPOS

➤ IgG1

La producción de anticuerpos de isotipo IgG1 son indicativos de una infección reciente puesto que se sintetizan como mecanismo de respuesta. Por ello, el grupo control presentó un incremento notable con respecto al grupo normal (93.6%). La presencia de anticuerpos del isotipo IgG1 disminuyó significativamente (79.3%) cuando los animales fueron tratados con IFN- $\gamma$  + IL-2, al compararse con el grupo parasitado. En tanto que el tratamiento con interleucina 10 produjo una ligera reducción (no significativa, 46.9%) con respecto al grupo control (Fig.14).

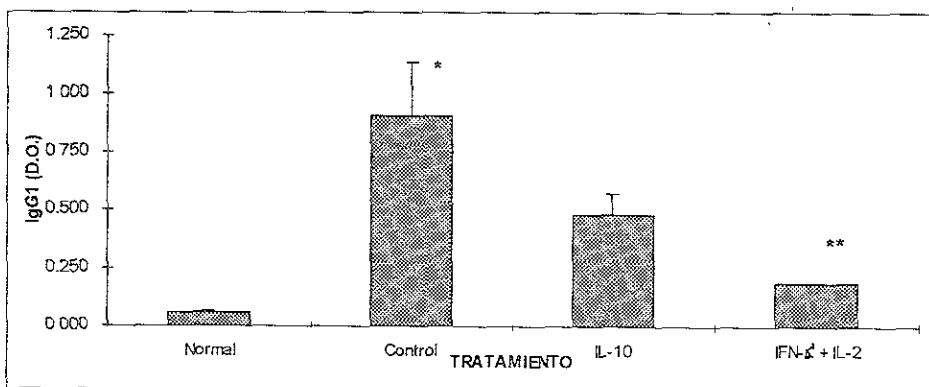


Figura 14. Análisis de anticuerpos isotipo IgG1 séricos producidos por el hospedero después de una infección con metacéstodos de *T. crassiceps*. (\*  $p < 0.05$  con respecto al grupo normal; \*\*  $p < 0.05$  con respecto al grupo control)

## ~IgG2a

Los niveles de IgG2a específica a los antígenos de *T. crassiceps* se encontraron en niveles elevados en los animales sólo infectados (61.1% con respecto al grupo normal), pero estos niveles se incrementaron significativamente (144.9%) cuando los animales recibieron el tratamiento previo con interferón gamma + interleucina 2 (Fig.15); mientras que en los animales tratados con interleucina 10 presentaron incremento del 10.1% con respecto a los animales parasitados.

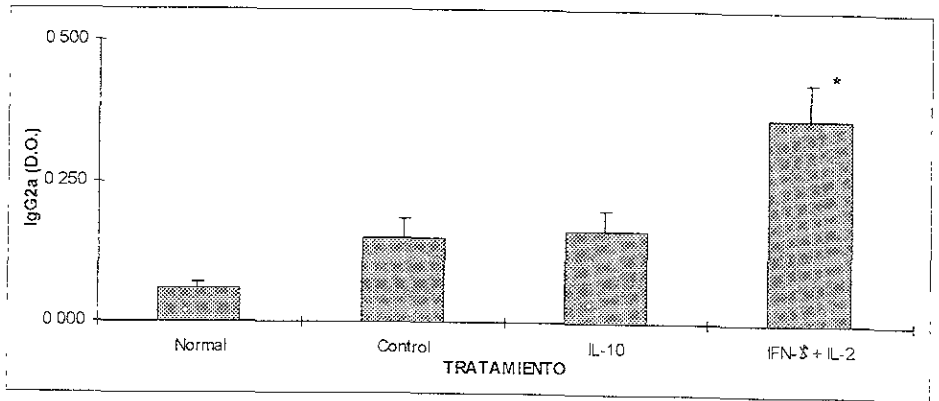


Figura 15. Análisis de anticuerpos isotipo IgG2a antígeno-específicos producidos por el hospedero a lo largo de un mes de infección intraperitoneal por metacéstodos de *T. crassiceps* (\*\* p<0.01)

## γIgG2b

Esta subclase de anticuerpo ha sido asociado a respuestas tipo Th2, de manera que en los animales infectados con *T. crassiceps* se detecta en niveles altos después de 30 días de infección (93%, con respecto al grupo normal), este patrón fue modificado por el tratamiento con IFN- $\gamma$  + IL-2, ya que este grupo presentó niveles significativamente menores de este anticuerpo ( $P < 0.05$ , 70.3% con respecto al control). El grupo tratado con interleucina 10 presentó niveles ligeramente menores (27%) con respecto al grupo control (Fig. 16).

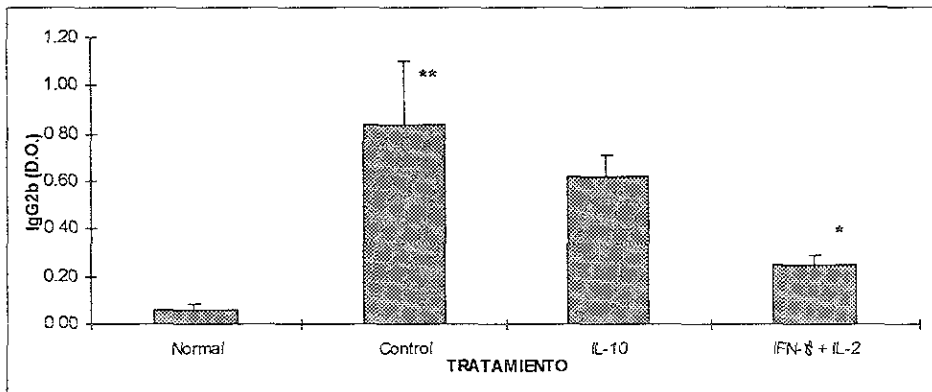


Figura 16. Análisis de anticuerpos específicos del isotipo IgG2b séricos producidos por el hospedero a lo largo de una infección intraperitoneal por metacístodos de *T. crassiceps*. (\*  $p < 0.05$  con respecto al grupo parasitado; \*\*  $p < 0.01$  con respecto al grupo normal).

## • ÓXIDO NÍTRICO

El óxido nítrico es producido por macrófagos activados principalmente por IFN- $\gamma$ , y por otras células como las endoteliales y las nerviosas (Ignarro et al, 1993). La infección con *T. crassiceps* favorece la producción de este gas, pues se detectó en mayores niveles que en los cultivos de células de bazo de los animales sanos (51.6%), siguiendo los grupos tratados con interleucina 10 (46.4%) e interferón gamma (29.2%), al compararse con el grupo control. (Fig. 17).

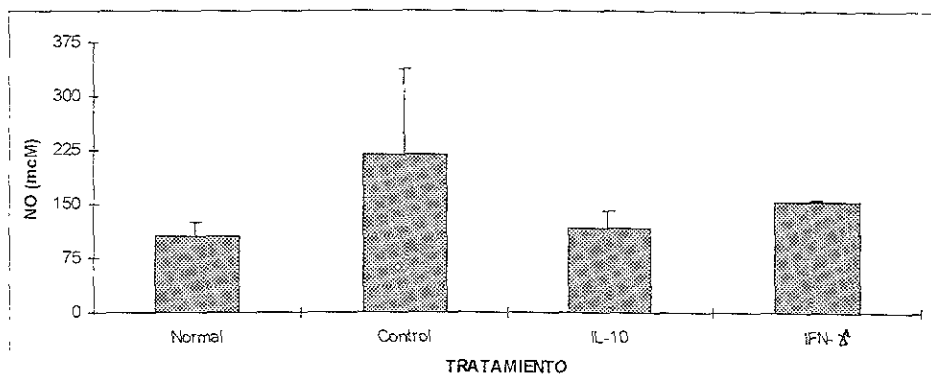


Figura 17. Análisis de producción de óxido nítrico por células de bazo in vitro mediante la inducción con Con-A, mediante un ensayo colorimétrico (Griess, et al. 1991)



• RESPUESTA A CON-A

Nuevamente la respuesta a Con-A se observó disminuída en los animales parasitados (172%, con respecto al grupo normal), incrementándose el efecto proliferativo de la concanavalina A en un 270% con la presencia de interferón gamma + IL-2, con respecto al grupo control. Sin embargo, el incremento más notable en esta respuesta(383%) se observó en los animales que habían recibido el tratamiento con interleucina 10, con respecto al mismo grupo (Fig. 18).

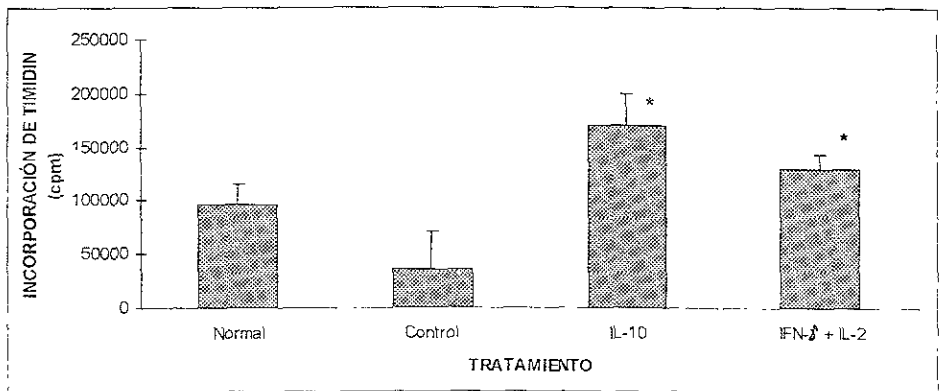


Figura 18 Análisis de proliferación celular estimulado in vitro con un mitógeno de linfocitos T (Con-A); (\*  $p < 0.05$ )

# DISCUSSION

El control de las enfermedades parasitarias está muy ligado a las respuestas inmunes tipo Th1 y tipo Th2, las cuales se caracterizan por un dominio en la producción de las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 y favorecen la secreción de anticuerpos IgG2a (Th1); o bien por la producción de altos niveles de IL-4, IL-6, IL-10 y de anticuerpos de los subtipos IgG1 e IgG2b (Th2) (Carter, et al. 1996). Actualmente algunos autores han encasillado estos tipos de respuesta en la generación de protección contra parásitos intracelulares en los cuales una respuesta tipo Th1 es la protectora (Sander, et al. 1995), mientras que la respuesta tipo Th2 se ha asociado a la protección contra parásitos extracelulares (Sedlik, et al. 1996)

En la cisticercosis experimental murina la relevancia de una respuesta tipo Th1 o Th2 no había sido explorada. Trabajos recientes, han empezado a analizar estos tipos de respuesta, encontrándose que en los animales crónicamente infectados hay una respuesta tipo Th2 dominante y un gran número de parásitos en los hospederos (Villa y Khun, 1996; Terrazas et al. 1998). En cambio al inicio de la infección se había encontrado una respuesta dominante tipo Th1 asociada a un número restringido de parásitos (Terrazas et al., 1998); lo anterior llevó a la hipótesis de que una respuesta tipo Th1 inicial podría estar relacionada con protección en contra del cisticerco de *T. crassiceps*.

Los resultados obtenidos durante este estudio, donde los animales se trataron con IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  + IL-2 y sus respectivos anticuerpos monoclonales anti-citocinas al momento de la infección, nos indican que efectivamente una respuesta de tipo Th1 puede inducir protección contra éste parásito, puesto que la carga parasitaria

disminuye si se induce este tipo de respuesta desde el inicio de la infección. Así, al tratar con anticuerpos monoclonales anti-IL-10 se observó una disminución notable de la carga parasitaria puesto que este anticuerpo neutraliza la acción de la interleucina 10, la cual es producida por una respuesta de tipo Th2. Este aspecto se ve reforzado con el grupo tratado con IFN- $\gamma$  + IL-2, donde el crecimiento parasitario se apace notablemente debido a que ambas citocinas favorecen el desarrollo de una respuesta tipo Th1.

Al mismo tiempo estas citocinas favorecen la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a, los cuales son mecanismos protectores mediatos e inmediatos contra una infección parasitaria (Abbas, y cols. 1995). Esto se comprobó con la determinación de interferón gamma y de anticuerpos de isotipo IgG2a, los cuales presentaron niveles altos en los animales tratados con IFN- $\gamma$  + IL-2, además se observó un incremento en la respuesta proliferativa a la Con-A y en las células de estos animales. Con el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-IL10 se observaron resultados similares pero el más sobresaliente fue el incremento en la respuesta a Con-A y antígeno específica. Lo anterior probablemente se debe a que se está inhibiendo el establecimiento de una respuesta tipo Th2 mediante la neutralización temprana de la IL-10 proporcionado por el microambiente celular, que se produce durante la instalación del proceso infeccioso dentro del hospedero. Ya que es conocido, que el desarrollo de una respuesta tipo Th1 y/o Th2 depende del microambiente en el que se inicia dicha respuesta (Cua et al, 1996). Aunado a que ambos tipos de respuesta se encuentran regulados entre sí de acuerdo a las citocinas que produce cada tipo de subpoblación linfocitaria (Sedlik, 1997). Por ello la inhibición de una citocina de tipo Th1 por la acción de otra del tipo Th2 provoca

una inactivación de la primera respuesta y por ende el establecimiento de la segunda, y viceversa, provocando distintos estados inmunológicos en el hospedero

Por otro lado, al tratar con anticuerpos anti-IFN- $\gamma$  se observó un incremento en la carga parasitaria debido a que se neutraliza el interferón gamma; producido de manera normal por linfocitos T citolíticos y células T cooperadoras de la subclase Th1, lo cual aparentemente favoreció el establecimiento del parásito en el hospedero puesto que con la ausencia de esta citocina hay una falta de activación en los macrófagos, los cuales podrían actuar contra el parásito, de tal modo que éste último se establece y crece más rápidamente. Aún cuando, en este grupo de animales los niveles de óxido nítrico se encontraron elevados, indicando la existencia de macrófagos activados por lo que la relación entre esto y la susceptibilidad al parásito no queda clara Otro punto que apoya lo anterior es la síntesis de inmunoglobulinas ya que las subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2, además de mantener un balance entre ambas respuestas mediante la producción de distintas citocinas, también están involucrados en la producción y diferenciación de anticuerpos producidos por los linfocitos B. Así, los linfocitos Th1 inducen mayor cantidad de anticuerpos isotipo IgG2a; mientras que los linfocitos Th2 inducen una mayor producción de los isotipos IgG1, IgG2b e IgE (Carter, 1996)

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo anteriormente expuesto, ya que al tratar con anticuerpos monoclonales anti-interferón gamma, inhibidor de una respuesta tipo Th1, se incrementó la síntesis de anticuerpos de isotipo IgG1, característico de una respuesta tipo Th2. Este aspecto se ve reforzado con la disminución de las inmunoglobulinas de isotipo IgG2a ocasionado por el mismo tratamiento, lo que indica claramente que se está favoreciendo la

polarización de la respuesta inmune específica hacia un tipo Th2 y por ende generando una mayor susceptibilidad al parásito

Cabe señalar que el incremento en los niveles de interferón gamma al tratar a los animales con anti-IL-10 y la notable disminución al tratar con anti-interferón gamma, se debe a que ambas citocinas son antagonistas entre sí; es decir, regulan el desarrollo de un tipo de respuesta o de otro según las condiciones de la infección (Carter, 1996).

Así mismo, al tratar a los animales con IL-10 recombinante, se favoreció el desarrollo parasitario puesto que esta citocina propicia el establecimiento de una respuesta tipo Th2 desde un inicio y por ello los parásitos se establecen más rápidamente y de forma permanente.

La idea de que una respuesta tipo Th1 puede ser protectora se refuerza con los resultados obtenidos con el tratamiento temprano con IL-2 e IFN- $\gamma$ , en donde se observó la mayor resistencia al parásito. Dentro de los parámetros inmunológicos que se analizaron, los más sobresalientes en este caso, fue el incremento en la respuesta proliferativa a Con-A, mayores niveles de IL-2 y de IFN- $\gamma$ , así como de IgG2a, todo ello con respecto a los animales controles.

Así mismo, se sabe que un tratamiento previo con algunas citocinas puede inducir o inhibir la producción de óxido nítrico que es neutralizado por los radicales peróxido presentes en el medio. Por ello es que en los cultivos linfocitarios de animales normales, que fueron estimulados con Con-A hubo un decremento notorio en la producción de óxido nítrico. Mientras que los animales controles presentaron una producción mayor de la molécula oxidante debido a que presentó una mayor proliferación celular lo que indica que el sólo hecho de presentar una infección

favorece la liberación de óxido nítrico. Ya que se sabe que uno de los factores principales que favorece su producción, es el que el organismo presente una infección puesto que al tener una función oxidante le permite al organismo contrarrestar la enfermedad. Mientras que en los demás grupos de tratamiento no se observan cambios considerables en la producción de óxido nítrico, puesto que el solo establecimiento del parásito induce su producción sin importar que estimulación reciba, antes o durante el proceso infeccioso (Migliorini, et al. 1991). Sin embargo, la presencia de niveles altos o bajos de óxido nítrico no correlacionaron con la mayor o menor carga parasitaria

En este esquema de tratamientos, con citocinas recombinantes, la elevada producción de óxido nítrico indica la activación de macrófagos principalmente (Sedlik, 1997); lo que se contrapone con el incremento del número de parásitos al tratar a los animales con IL-10, puesto que es una citocina que inhibe la actividad de los macrófagos. Y como es conocido, los macrófagos activados producen óxido nítrico e IL-12 como respuesta a un proceso invasivo, con el fin de eliminar el agente causal de la enfermedad. Por otro lado, al tratar a los animales con anticuerpos anti-interleucina 4 se estimuló la producción de óxido nítrico debido a que la interleucina 4 inhibe a la enzima que actúa sobre la L-arginina para posteriormente producir óxido nítrico. Este efecto se ve sinergizado con la presencia de anti-interleucina 10 (Romani, et al. 1994).

Con esto, se reafirma que el papel del óxido nítrico en esta infección no es clara pues su incremento o disminución no produce cambios en la respuesta a diferentes tratamientos; ya que no correlacionó con el mayor o menor número de parásitos encontrados.

Por otro lado la producción de IgG1 se encontró disminuida con el tratamiento con IFN- $\gamma$  + IL-2. Debido a que la producción de este isotipo de anticuerpos es inducida por citocinas provenientes de linfocitos Th2, es muy probable que el decremento observado puede deberse a un estado de inhibición de la respuesta tipo Th2 por la presencia temprana de IFN- $\gamma$  e IL-2.

Mientras que en el tratamiento con IL-10, los niveles de anticuerpos de isotipo IgG2b se mantienen debido a que este tipo de inmunoglobulinas son características de una respuesta de tipo Th2, al igual que las citocinas del tratamiento por lo que prevalece una respuesta de este tipo. En contraste, el tratamiento con IFN- $\gamma$  + IL-2 indujo una disminución significativa marcada, en este subtipo de IgG, indicando un dominio de la respuesta tipo Th1.

En el caso de la IL-4 se observó una producción muy semejante de esta citocina con todos los tratamientos. Por lo que se puede decir que esta citocina tiene poca relevancia dentro de la inmunidad contra el cisticerco de *Taenia crassiceps*, fundamentado sobre todo por el tratamiento con anticuerpos anti-IL 4 o bien con IL-4 recombinante, ya que estos no modificaron la susceptibilidad a éste parásito.

La respuesta in vitro a mitógenos específicos, concanavalina A (Con-A), para linfocitos T es considerada como una medida del estado inmunológico celular del organismo, pero se debe considerar que su inducción es inespecífica. Así, el tratamiento con una mezcla de interferón gamma e interleucina 2 favoreció la proliferación celular puesto que ambas citocinas son inductoras de la proliferación y diferenciación de las subpoblaciones linfocitarias.



Por otro lado, la presencia del antígeno de *T. crassiceps* indujo una mayor proliferación celular en los animales tratados con anti-IL-10, lo cual indica que la inhibición de una respuesta tipo Th2 genera una mejor respuesta celular que coincidió con una disminución en el número de parásitos. Esto indica que in vivo se favorece la presencia de una respuesta tipo Th1 que protege al hospedero contra este parásito.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser útiles para la búsqueda de vacunas contra la cisticercosis, pero con una mayor base inmunológica de la que se tenía hasta ahora.

Cabe señalar, que actualmente se tiene un cierto dogma sobre el que una respuesta tipo Th1 protege al hospedero contra parásitos intracelulares; mientras que una respuesta tipo Th2 lo protege contra parásitos extracelulares (Terrazas et al, 1998; Sedlik et al, 1997). Aspecto que nuestros datos no confirman, ya que la protección contra el cisticerco de *T. crassiceps* parece ser mediada por una respuesta tipo Th1, mientras que una respuesta tipo Th2 parece facilitar la infección. En cambio, estos datos coinciden con los de Allen y Maizels, 1997, quienes indican que al menos otros dos parásitos extracelulares (*Brugia malayi* y *Schistosoma mansoni*) son sensibles a una respuesta tipo Th1.

**CONCLUSIONS**

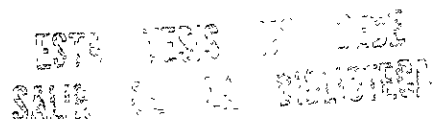
Con los datos obtenidos del presente trabajo, se puede concluir lo siguiente:

- Aparentemente la inducción temprana de una respuesta inmune tipo Th1 favorece la resistencia contra la cisticercosis causada por *T. crassiceps*.
- El establecimiento de esta infección parasitaria durante un tiempo relativamente largo favorece el desarrollo de una respuesta tipo Th2.
- La inducción temprana de una respuesta inmune tipo Th2 aumenta la susceptibilidad a *T. crassiceps*.
- La IL-10 se perfila como la principal citocina mediadora de susceptibilidad en la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps*.
- El óxido nítrico no presentó relevancia sobre la polarización de la respuesta que pudiera afectar el establecimiento del parásito *Taenia crassiceps*.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbas A. K. (1995). *Inmunología Celular y Molecular*. Segunda edición. Edit. Interamericana. España.
- Adorini L. And Sinigaglia F. (1997). Pathogenesis and immunotherapy of autoimmune diseases. *Immunology Today*. 18, 5: 209-211.
- Allen J. E. and Maizels R. M. (1997). Th1 - Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?. *Immunology Today*. 18, 8: 387-392.
- Arai T., Hiromatsu K., Nishimura H., Kimura Y., Kobayashi N., et al. (1995) Effects of in vivo administration of anti-IL-10 monoclonal antibody on the host defence mechanism against murine *Salmonella* infection. *Immunology*. 85: 381-388.
- Assano. M., Kohanawa M., Minagawa T. and Nakane A. (1996). Reciprocal action of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 promotes granulomatous inflammation induced by *Rhodococcus aurantiacus* in mice. *Immunology*. 88: 394-399.
- Barnard A., Mahon B. P., Watkins J., Redhead K. and Mills K. H. (1996). Th1/Th2 cell dichotomy in acquired immunity to *Bordetella pertussis*: variables in the *in vivo* priming and *in vitro* cytokine detection techniques affect the classification of T-cell subsets as Th1, Th2 o Th0. *Immunology*. 87:372-380.
- Bojalil, R.; Terrazas, L. I. Govezensky, T; Scitto, E. and Larralde C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. 79(3):384-389.
- Brostoff J., Scadding G. K., Male D. K., et al. (1991) *Inmunología Clínica*. Mosby/Doyma Libros. España.

- Bullock, W. E., Carlson, E. M. and Gershon, R. K. (1978). The evolution of immunosuppressive cell populations in experimental mycobacterial infection. *Journal of Immunology*. 120: 1709-1716.
- Carter, L.L. and Dutton, R. W. (1996). Type 1 and Type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Current Opinion Immunology*. 8: 336-342.
- Casino R. P., Kylcoyne M. C., Quyyumi A. A., Hoeg M. J. and Panza A. J. (1993). The role of nitric oxide in endothelium dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation*. 88:2541-2547.
- Cassatella M. A. Meda L., Gasperini S., D'Andrea A., Ma X. and Trinchieri G. (1995). Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *European Journal of Immunology*. 25: 1-5.
- Cua, D. J., Coffman, R. L. and Stohlman, S. A. (1996). Exposure to T helper 2 cytokines in vivo before encounter with antigen selects for T helper subsets via alterations in antigen-presenting cell function. *Journal of Immunology*. 157: 2830-2836.
- Cumberbatch M., Dearman J. and Kimber I. (1996). Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells. *Immunology*. 87: 513-518.
- De Kossodo S. and Grau G. E. (1993). Profiles of cytokine production in relation with susceptibility to cerebral Malaria. *Journal of Immunology*. 151 (9):4811-4820.
- Fiorentino D. F., Bond M. W. And Mossman T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*. 170: 2080-2095.



- Flisser A. (1989). *Taenia solium* cysticercosis: some mechanisms of parasite survival in immunocompetent host. *Acta Leidensia*. 57,2: 259-263.
- Ferguson T. A., Dube P. and Griffith T. (1994). Regulation of contact hypersensitivity by interleukin 10. *Journal Experimental of Medicine*. 179: 1597-1604.
- Gross A. and Frankenburg S. (1989). *Plasmodium berghei*: Immunosuppression of the cell-mediated immune response induced by nonviable antigenic preparations. *Experimental Parasitology*. 68:83-92.
- Haczku A., Macary P., Haddad E., Huang J., Kemeny M., et al. (1996). Expression of TH-2 cytokines interleukin-4 and -5 of Th-1 cytokine interferon- $\gamma$  in ovalbumin-exposed sensitized Brown-Norway rats. *Immunology*. 88:247-251.
- Harrison. (1983). *Principios de Medicina Interna*. Décima edición. Edit. McGraw-Hill. México. 866-876.
- Hockett R. D., Cook J. R., Findlay K. and Harding C. V. (1996). Interferon- $\gamma$  differentially regulates antigen-processing functions in distinct endocytic compartments of macrophages with constitutive expression of class II major histocompatibility complex molecules. *Immunology*. 87: 68-75.
- Huerta, L; Terrazas, L. I.; Sciutto, E. and Larralde, C. (1992). Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Parasitology*. 78 (3): 471-476..
- Ignarro J. L., Fukuto M. J., Griscavage M. J., Rogers E. N. and Byrns R. E. (1993). Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: Comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Procedures National Academy Scientific*. 90: 8103-8107.

- Kawano Y. and Noma T. (1996). Role of interleukin-2 and interferon- $\gamma$  in inducing production of IgG subclasses in lymphocytes of human newborns. *Immunology*. 88: 40-48.
- Lamont A. G. and Adorini L. (1996). IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunology Today*. 17 (5): 214-217.
- Larralde C., Lacleffe J. P. , Owen C. S., Sciutto E., Montoya R. M., Díaz M. L., et al. (1986). Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 35:965-973.
- Larralde C., Montoya R. M., Sciutto E., Díaz M. L., Govezensky T. and Coltorti E. (1989). Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 40:282-290.
- Larralde C., Sciutto E., Huerta L., Terrazas I., Fragoso G., et al. (1989). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 57 (2): 131-134.
- Larralde C., Sofelo J., Montoya R. M., Palencia G., Padilla A., Govezensky T. Díaz M. L. And Sciutto E. (1990). Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 114: 926-928.



- Levinson, E., Jawe'z, E. (1992). *Microbiología e Inmunología*. Edici. El Manual Moderno, México.
- Levi-Schaffer F., Barkans J., Newman T. M., Ying S., Waxel'n M., et al. (1996). Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology*. 87: 155-161.
- Lezama D. C., Isaac, M. A. (1995). *Inmunobiología de las Leishmaniasis*. Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, México.
- Mécheri S. and David B. (1997). Unravelling the mast cell dilemma: culprit or victim of its generosity?. *Immunology Today*. 18, 5: 212-215.
- Migliorini, P., Corradin, G. and Belz C. S. (1991). Macrophage NO<sub>2</sub> production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN-γ. *Journal of Immunology Methods* 139: 107-114.
- Moll H. (1996). Immune responses to parasites: the art of distinguishing the good from the bad. *Immunology Today*. 17, 12: 551-552.
- Moreno R., J. (1996). *Respuesta inmune y Mecanismos de Autoinmunidad*. Edici. Limusa, México, D. F.
- Morhenn V. B. (1997). Langerhans cells may trigger the psoriatic disease process via production of nitric oxide. *Immunology Today*. 18, 9: 433-436.
- Morris S. C., Madden K. B., Adamczewski J. J., Gause W. C., Hubbard B. R., et al. (1994). Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and ig isotype selection. *Journal of Immunology*. 152: 1047-1056.

- Mosmann T. R. and Sad S. (1995). Interleukin (IL) 4, in the absence of antigen stimulation induces an anergy-like state in differentiated CD8<sup>+</sup> TC<sub>1</sub> cells: loss of IL-2 synthesis and autonomous proliferation but retention of cytotoxicity and synthesis of other cytokines. *Journal Experimental of Medicine*. 182: 1505-1515.
- Mossman T. R. and Coffman R. L: (1987). Two types of mouse heiber T-cell clone. Implications for immune regulation. *Immunology Today*. 8: 223-227.
- Nicholson, L. B., Kuchroo, V. K. (1996). Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Current Opinion in Immunology*. 8:837-842.
- Orange J. S., Wolf S. F. and Biron C. A. (1994). Effects of IL-12 on the response and susceptibility to experimental viral infections. *Journal of Immunology*. 152: 1253-1264.
- Park Y. C., Jun C. D., Kang H. S., Kim H. D., Kim H. M. and Chung H. T. (1996). Role of intracellular calcium as a priming signal for the induction of nitric oxide synthesis in murine peritoneal macrophages. *Immunology*. 87: 296-302.
- Pearman E., Kroeze W. K., Hazlett F. E., Chen S. A., Mawhorter S. D., et al. (1993). *Brugia malayi*: Acquired resistance to microfilariae in Balb/c mice correlates with local Th2 responses. *Experimental Parasitology*. 76: 200-208.
- Perlman, H. et al. (1994). *Clinical Experimental Immunology*. 97: 284-292.
- Powrie F., Menon S. and Coffman R. L. (1993). Interleukin-4 and Interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *European Journal of Immunology*. 23: 3043-3049.

- Pozo M. A. del, Sánchez-Mateos P. and Sánchez-Madrid F. (1996). Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment?. *Immunology Today*. 17 (3): 127-131.
- Pritchard K. A., Groszek L., Smalley D. M., Sessa W. C., Wu M., et al. (1995). Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. *Circulation Reserch*. 77:510-518.
- Pumarola, A., Rodriguez, A., et al. (1994). *Microbiología y Parasitología Médica*. Segunda edición. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. España.
- Ramírez F. and Silva A. (1997). Glucorticoids enhance concanavalin A induced mitogenic response through the inhibition of nitric oxide production. *Immunology*. 90: 66-73.
- Roitt I. M. (1994). *Inmunología*. Séptima edición. Edit. Interamericana-McGraw Hill. España.
- Romani, L. et al (1992). Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *Journal Experimental Medicine*. 176:19-25.
- Romani, L. et al (1994). Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *Journal Immunology*. 152: 3514-3521.
- Sander B., Skansén-Saphir U., Damm O., Hakansson L., et al. (1995). Sequential production of Th1 and Th2 cytokines in response to live bacillus *Calmette-Guérin*. *Immunology*. 86: 512-518.
- Seder, R. A. and Pau. W.E. (1994). *Annual Review of Immunology*. 12: 635-637.

- Sedlik, C., Dériaud, E., Leclerc, C. (1997). Lack of Th1 or Th2 polarization of CD4<sup>+</sup> T cell response induced by particulate antigen targeted to phagocytic cells. *International Immunology*. 9 (1): 91-103.
- Sciutto E. (1989). Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *T. solium*. Tesis Doctoral. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. México, D. F.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R. M., et al. (1990). Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine cysticercosis. *Parasite Immunology*. 12: 687-696.
- Sciutto E., Fragoso G., Díaz M. L., Valdés F., et al. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research*. 77: 243-246.
- Stites D. P. (1993). *Inmunología Básica y Clínica*. Séptima edición. Edit. El Manual Moderno. México, D. F.
- Swain S. L., Croft M., Dubey C., Haynes L., Rogers P., et al. (1996). From naive to memory T cells. *Immunological Reviews*. 150: 143-167.
- Terrazas, L. I. (1993). Interacciones inmunoendócrinas en la Cisticercosis Experimental Murina causada por *Taenia crassiceps*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M.

- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T. and Larraide C. (1994). A role for 17- $\beta$ -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal Parasitology*. 80(4): 563-568.
- Terrazas, L.I.; Bojalil R.; Govezensky T. and Larraide C. (1998). Shift from an early protective Th1 type response to late permissive response in murine cysticercosis (*T. crassiceps*). *Journal of Parasitology*. 84(1):74-81.
- Villa O. F. and Kuhn R. E. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology*. 112: 561-570.
- Wynn T. A., Eltoun Y., Oswald Y. P., Cheever A. W. and Sher A. (1994). Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *The Journal of Experimental Medicine*. 179: 1551-1561.
- Wynn T. A., Jankovic D., Hieny S., Cheever A. W. and Sher A. (1995). IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- $\gamma$ . *The Journal of Immunology*. 154: 3999-4009.
- Zambrano S. A. (1993). *Inmunología*. Edii. Interamericana-McGraw Hill, México, D. F.

# APPENDICE

- AMORTIGUADOR PBS 10X

Pesar 3.86 g de fosfato monobásico de sodio, 10.22g de fosfato dibásico de sodio y 74.0 g de cloruro de sodio; se reúnen en un vaso de precipitados donde se disuelven hasta su totalidad verificando que su pH se encuentre entre 7.2 y 7.4. Finalmente se lleva a un volumen de 1000 ml

- SOLUCIÓN HEMOLIZANTE

Se prepara la solución A y B por separado. Para la solución A se disuelven 0.87 g de cloruro de amonio (0.16 M) en 100 ml de agua; mientras que para la solución B es necesario disolver 2.05 g de tris-base (0.17 M) en 100 ml de agua. Finalmente se toman 8 partes de la solución A y 2 partes de la solución B, las cuales se mezclan y se verifica que el pH sea de 7.4. Por último, se esteriliza por filtración.

- SOLUCIÓN DE CONCANAVALINA A (Con-A)

Se pesan 25 mg de Con-A que se disuelven en 10 ml de una solución de cloruro de sodio 6 M, agitando toda la noche para mejor disolución. Posteriormente se determina la absorbancia que presenta la solución a una longitud de onda de 280 nm; de tal modo que 1.5 U de absorbancia son igual a 1 mg de Con-A.

- MEDIO DE CULTIVO PARA LINFOCITOS DE BAZO

Preparar 100 ml de medio RPMI 1640 en polvo (Gibco, BRL) con agua bidestilada mediante agitación continua, ya que se reconstituyó totalmente se

enriquecen o suplementan 90 ml de medio con 1 ml de aminoácidos no esenciales 1%, 10 ml de suero bovino fetal 10%, 1 ml de penicilina-estreptomicina 1%, y 0.5 ml de solución amortiguadora HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperina N,2-etanosulfónico 25 mM y amortiguador de bicarbonato de sodio 2%)

- SOLUCIÓN PBS-BSA 3%

A 100 ml de amortiguador PBS 1X se le adicionan 3 g de albúmina sérica bovina (BSA), agitando vigorosamente hasta su disolución total, pero evitando que se forme espuma en la solución.

- SOLUCIÓN PBS-TWEEN 20

A un litro de amortiguador de PBS 1X se le adicionan 0.5 ml de Tween 20, mezclando de manera suave para evitar formación de espuma en la solución.

- SOLUCIÓN PBS-BSA-TWEEN 20

A 100 ml de solución PBS-Tween 20 se le adicionan 3 g de albúmina sérica bovina, agitando vigorosamente tratando de que no se forme espuma sobre la superficie.

- REACTIVO DE GRIESS

Para obtener esta solución se prepara una solución de dihidrocloruro de naffletilendiamina 0.1% en agua, y otra solución de sulfanilamida 1% en 5% ácido fosfórico; ambas por separado. Ya que se tienen listas se mezclan en cantidades



iguales, quedando lista para usarse. Esta última mezcla se mantiene estable durante 12 h a 4°C, pero las soluciones por separado tienen una estabilidad mucho mayor.