

14
2ej 03081

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

INTERACCIONES INMUNOENDOCRINAS EN LA
CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL MURINA:
MECANISMOS DE COLONIZACION PARASITARIA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA:

M. EN I.B.B. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES.

Director de Tesis: Dr. Carlos Larralde

MEXICO, D.F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE CENSUR**

263336



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.

PAGINACIÓN

DISCONTINUA

INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 1 |
| RESUMEN | 3 |
| INTRODUCCION | 5 |
| +Inmunoparasitología: Participación de las subpoblaciones de células Th1 y Th2. | |
| +Respuesta inmune a parásitos extracelulares | |
| +Mecanismos colonización por parásitos extracelulares | |
| +Interacciones entre los sistemas inmune y endócrino | |
| +El modelo experimental: generalidades y últimos avances. | |
| OBJETIVOS E HIPOTESIS | 22 |
| RESULTADOS | 23 |
| +Resultados adicionales | 29 |
| DISCUSION GENERAL | 40 |
| CONCLUSIONES | 54 |
| APENDICE I | 55 |
| ARTICULOS CENTRALES DE LA TESIS | |
| +ARTICULO 1 | 56 |
| SHIFT FROM AN EARLY PROTECTIVE TH1-TYPE IMMUNE RESPONSE TO A LATE PERMISSIVE TH2-TYPE RESPONSE IN MURINE CYSTICERCOSIS (<i>Taenia crassiceps</i>). Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. and Larralde C. (1998). Journal of Parasitology 84: 74-81. | |

+ARTICULO 2 61

TH1-TYPE RESPONSE IMPROVE RESISTANCE TO MURINE CYSTICERCOSIS CAUSED BY TAENIA CRASSICEPS. Terrazas L.I.; Cruz M., Rodríguez-Sosa M., Bojalil R., García-Tamayo F. and Larralde C. (1998). Enviado para su publicación a Parasitology Research.

+ARTICULO 3 87

Taenia crassiceps: ROLE OF PROSTAGLANDIN E2 IN SUSCEPTIBILITY TO MURINE CYSTICERCOSIS. Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. and Larralde C. (1998). Enviado para su publicación a Experimental Parasitology.

APENDICE II 106

Artículos derivados de este trabajo de tesis en los que se participó como coautor y que cubren los aspectos endocrinológicos de esta tesis:

Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. and Larralde C. (1994). A role for 17- β estradiol in immunoendocrine regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology*. 80: 563-568.

Larralde C., Morales J., Terrazas L.I., Govezensky T. and Romano M. (1995). Sex hormones changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 52: 575-580.

BIBLIOGRAFIA GENERAL 114

ABSTRACT

In early stages of experimental murine cysticercosis by *T. crassiceps*, there is a clear but transient Th1-type immune response characterized by high levels of IL-2, IFN- γ , concanavalin A and antigen specific response, delayed-type hypersensitivity and IgG2a antibodies, that associates with a low rate of parasite reproduction. As time of infection progresses an energetic and more permanent Th2-type response follows (characterized by high levels of IL-4, IL-6, IL-10, IgG2b and IgG1 antibodies) that in turn associates with an increment in the speed of parasite reproduction and a down-regulation of Th1-type response. The sequential activation of Th1-type and Th2-type responses in murine cysticercosis would results in increasing parasite reproduction, explaining the long time residence and the massive parasite intensity reached in chronic infections.

Resistance and susceptibility to different parasitic diseases have been associated with the predominance of Th1-type or Th2-type immune responses. However, little is known if one or the other protects in murine cysticercosis, although the above mentioned results point to the Th1-type immune response to do so. To determine the role of Th1-type and Th2-type cytokines in this parasitosis, mice were treated with, Monoclonal Antibody (MoAb) anti-cytokines or with recombinant murine (rm) cytokines during early stages of infection. Female mice receiving MoAb anti-IL-10 developed a lesser parasite burden than control mice when were infected with *T. crassiceps* cysticerci, a Th1-type response was found in these animals. On the contrary, mice receiving MoAb anti-IFN- γ showed a severe increase in the parasite burden after infection with *T. crassiceps*. Treatment with recombinant cytokines confirm these results, mice receiving IFN- γ and IL-2 developed a significantly lesser parasite burden, whereas rm IL-10 treated mice showed a significant increase in the susceptibility to the parasite. The Th1-type immune response appears to play a fundamental role in the protection against *T. crassiceps* cysticercosis, with IL-10 favoring parasite installation.

Several other factors were also analyzed in regard to their participation in susceptibility to *T. crassiceps*. We evaluated the cytokine production by peritoneal macrophages from parasitized mice. This cells produced higher levels of IL-6 in response to LPS than peritoneal macrophages from normal mice, whereas the production of IL-12 and TNF- α were not significantly modified. Macrophages from infected mice also showed

alterations in their surface markers, where the expression of B7-1 molecules were slightly down-regulated, whereas the B7-2 molecules were over-expressed at 8 weeks after infection. These data could be related with the polarization of the immune response towards a Th2-type in this infection.

In recent years, it has been shown that prostaglandins (PG) play a role in the regulation and/or polarization of the immune responses in several parasitic diseases. Here we also evaluated the role played by PG in murine cysticercosis, through of *in vivo* treatment with indomethacin (an inhibitor of PG) or PGE2. Results showed that mice treated with indomethacin during 4 weeks of infection have a significantly reduced parasite burden compared with control mice. In contrast, mice receiving PGE2 showed a higher susceptibility to the infection with *T. crassiceps*. These data suggest a role for PGE2 in the susceptibility to murine cysticercosis, which presumably exert their actions by affecting T cell responses and down-regulating of immune response against the parasite.

Our results suggest that a Th1-type immune response is involved in protection against cysticercosis caused by *T. crassiceps*, and that host's factors can be of influence on the down-regulation of this response, modifying in this way the susceptibility to the infection.

RESUMEN

El modelo experimental de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* ha sido utilizado para determinar diversos factores biológicos que participan en la relación huésped-parásito. En esta infección no se había analizado el tipo de respuesta inmune que podría estar relacionada con la resistencia o susceptibilidad. En este trabajo se estudiaron varios de los factores que pueden modular la respuesta inmune, en principio se analizó la cinética de esta respuesta durante 32 semanas después de la infección. Posteriormente se hicieron experimentos para determinar qué tipo de respuesta está asociada a resistencia y cual a susceptibilidad. Al final se analizaron otros factores biológicos que pueden alterar la susceptibilidad y/o la respuesta inmune contra la cisticercosis causada por *T. crassiceps*.

En las fases tempranas de la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*, hay una clara pero transitoria repuesta inmune tipo Th1, la cual se caracteriza por niveles altos de IL-2 e IFN- γ , una buena respuesta a la concanavalina A, al antígeno específico, de hipersensibilidad tardía y de anticuerpos IgG2a que se asociaron con un bajo crecimiento parasitario. Conforme el tiempo infección progresa hay una enérgica y permanente respuesta de tipo Th2 (caracterizada por niveles altos de IL-4, IL-6, IL-10, IgG2b y IgG1 anticuerpos) que a su vez se asoció con un incremento en la velocidad de reproducción del parásito y una disminución de la respuesta tipo Th1. La activación secuencial de las respuestas tipo Th1 y Th2 en la cisticercosis murina podría favorecer la reproducción del parásito, explicando de ésta manera la larga residencia del parásito y la masiva colonización de su huésped en las infecciones crónicas.

La resistencia y susceptibilidad a las diferentes enfermedades parasitarias han sido asociadas con el predominio de las respuesta inmunes tipo Th1 o Th2. Sin embargo, poco se conocía si un tipo de respuesta o la otra protege en contra de la cisticercosis murina, aunque los anteriores resultados apuntan a la repuesta inmune tipo Th1 como la posible protectora. Para determinar el papel de las citoquinas Th1 y Th2 en esta parasitosis, se trataron ratones con anticuerpos monoclonales (MoAb) anti-citocinas o con citocinas recombinantes murinas (rm) durante las fases tempranas de la infección. Los Ratones hembras que recibieron MoAb anti-IL-10 desarrollaron una carga parasitaria menor que los controles cuando se infectaron con el cisticerco de *T. crassiceps*, se observó una respuesta tipo Th1 en estos animales. Por el contrario, los ratones que recibieron anticuerpos anti-

IFN- γ mostraron un severo aumento en la carga parasitaria. El tratamiento con las citocinas recombinantes confirma estos resultados, pues los ratones que recibieron IFN- γ + IL-2 desarrollaron cargas parasitarias significativamente menores. Mientras que los ratones tratados con IL-10 *in vivo* mostraron un aumento significativo en la susceptibilidad al parásito. La respuesta inmune tipo Th1 tiene un papel fundamental en la protección contra la cisticercosis por *T. crassiceps*, donde la IL-10 parece favorecer la instalación del parásito.

También se analizaron otros factores con respecto a su participación en la susceptibilidad a *T. crassiceps*. Se evaluó la producción de citocinas por macrófagos peritoneales de los ratones parasitados. Estas células produjeron niveles más altos de IL-6 en respuesta al LPS que los macrófagos peritoneales de los ratones normales, mientras que la producción de IL-12 disminuyó en las primeras semanas de infección y el TNF- α no se modificó significativamente. Los macrófagos de los ratones infectados también mostraron alteraciones en sus marcadores de membrana, donde la expresión de la molécula B7-1 fue inhibida ligeramente, mientras que la molécula B7-2 se sobre expresó después de 8 semanas de infección. Estos datos podrían relacionarse con la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th2 que se observó en esta infección.

En años recientes, se ha demostrado que las prostaglandinas (PG) juegan un papel importante en la regulación y/o polarización de la respuesta inmune en varias enfermedades parasitarias. Aquí también se evaluó el papel que tienen las PG en la cisticercosis murina, a través de un tratamiento *in vivo* con indometacina (un inhibidor de PG) o de PGE2. Los resultados mostraron que los ratones tratados con indometacina durante las 4 semanas de infección tuvieron una carga parasitaria significativamente menor comparada con los ratones control. En contraste, los ratones que recibieron PGE2 mostraron una susceptibilidad mayor a la infección con *T. crassiceps*. Estos datos sugieren un papel para la PGE2 en la susceptibilidad a la cisticercosis, la cual probablemente ejerce sus acciones afectando la respuesta de las células T e inhibiendo la respuesta inmune efectora contra el parásito.

Nuestros resultados sugieren que una respuesta inmune tipo Th1 está involucrada en la protección contra la cisticercosis causada por *T. crassiceps*, y que factores del propio huésped pueden influir en la inhibición de esta respuesta, modificando de así la susceptibilidad a la infección.

INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias son un problema de salud pública a nivel mundial. Los parásitos generan mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otra clase de organismos infecciosos, principalmente en países en desarrollo. Se estima que cerca del 30% de la población del mundo está infestada con alguno de los diversos parásitos que pueden colonizar al hombre (Kollberg, 1994). La magnitud del problema es la principal razón del gran interés acerca de la inmunidad a los parásitos, provocando el desarrollo de la inmunoparasitología como una rama de la inmunología (Abbas, 1995). Los agentes causales de estas parasitosis son principalmente protozoarios y helmintos. En la mayoría de las infecciones causadas por protozoarios después de que el huésped se recupera, redunda en una respuesta inmune protectora y de larga duración. Por el contrario, las infecciones por helmintos generalmente son crónicas y persisten en el individuo durante largos períodos, siendo el huésped incapaz de generar una inmunidad protectora a pesar de la repetida exposición al parásito. Típicamente, estos helmintos son casi siempre patógenos extracelulares y no se reproducen en ausencia de un huésped intermediario o al menos poseen un paso en su ciclo de vida a través del suelo o el agua. Además, debido a que presentan ciclos de vida complejos, con antígenos estadio-específicos, el control inmunológico de estas infecciones es problemático.

Las parasitosis por helmintos son una de las causas de mayor morbilidad en la población humana, particularmente en los trópicos y subtrópicos, y especialmente en los países subdesarrollados (Maizels et al., 1993). La patogenicidad de los diferentes parásitos varía por distintas causas: la vía de entrada al huésped, el estadio que infecta al huésped, la localización anatómica en la que se instala el parásito, la cronicidad de la infección y la cantidad de individuos que infectan al huésped. La capacidad de los helmintos para sobrevivir en el huésped por largo tiempo, a pesar de ser reconocidos y atacados inmunológicamente, es uno de los principales temas

de investigación en el campo. Debido a estas razones, el desarrollo de vacunas contra parásitos ha sido considerado como un objetivo importante en países subdesarrollados. Sin embargo, puesto que se trata de organismos complejos, las vacunas posiblemente no podrán darse si no se conocen detalladamente los mecanismos inmunológicos que están involucrados en la susceptibilidad o resistencia al parásito, así como los mecanismos que utilizan éstos para evadir o resistir la respuesta inmune.

Los mecanismos que utilizan las diferentes especies de parásitos para establecerse, temporal o permanentemente, en un huésped inmunológicamente competente son complejos y variables. Algunos parásitos manipulan la respuesta inmune para favorecer su establecimiento e incluso aprovechan algunas de las citocinas secretadas por el huésped para su propio desarrollo o bien para pasar de una fase a otra dentro de su ciclo de vida (Amiri et al., 1992). Actualmente se acepta que el resultado de muchas de las infecciones parasitarias en términos de resistencia o susceptibilidad está determinado por el patrón de respuestas que tienen las diferentes subpoblaciones de células T CD4+ involucradas en la respuesta inmune antiparasitaria.

PARTICIPACIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES Th1 Y Th2 EN INFECCIONES PARASITARIAS.

Con el objetivo de conocer la participación e importancia que tienen estas subpoblaciones de linfocitos en la respuesta inmune contra patógenos extracelulares, se ha dado una intensa investigación sobre la caracterización de la respuesta inmune en contra de helmintos, especialmente en el contexto de la red de citocinas que participan durante el establecimiento y/o rechazo del parásito.

Las clonas de células Th CD4+ pueden subdividirse de acuerdo al patrón característico de citocinas que secretan después de ser estimuladas (Mosmann et al., 1986; Coffman et al. 1987). En general, una estimulación antigénica repetida de células Th CD4+, *in vitro*, da como resultado el

desarrollo de un patrón restringido en la producción de citocinas que por lo general son de uno u otro de los dos tipos siguientes:

- 1.- Patrón Th1, provocado por las células que producen IFN- γ , IL-2 y linfotoxina. Este tipo de células son las responsables de la inmunidad mediada por células (activación de macrófagos, citotoxicidad dependiente de anticuerpos y de la hipersensibilidad retardada).
- 2.- Patrón Th2, provocado por las células que producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. La principal característica de este subtipo celular es que generan y mantienen respuestas inmunes de tipo humoral (proliferación y diferenciación de linfocitos B; elevación de producción de IgG₁ e IgE; inmunidad de las mucosas a través de la activación de las células cebadas y de la producción de IgA; inducen también la proliferación y diferenciación de eosinófilos).

Una vez que han sido estimuladas y que se han expandido estos dos subtipos celulares tienden a regularse negativamente uno a otro, a través de la acción de las diferentes citocinas que producen. El IFN- γ disminuye la proliferación de las células Th2, la liberación de IL-10 por macrófagos y el reclutamiento de eosinófilos; mientras que IL-4 e IL-10 inhiben la acción del IFN- γ sobre sus células blanco, e incluso disminuyen la producción de esta citocina y de IL-2 por las células Th1, así como la proliferación de éstas (Fiorentino et al., 1992; Romagnani, 1997).

A pesar de que los mecanismos mutuamente excluyentes que se dan entre estas dos subpoblaciones celulares han sido estudiados en detalle, no existen evidencias contundentes de cómo se desarrolla una respuesta de tipo Th1 o Th2 *in vivo* (Kelso, 1995). Varias evidencias sugieren que los fenotipos maduros Th1 y Th2 no están presentes entre la población de linfocitos CD4⁺ vírgenes periféricos, sino que se diferencian de una población común (Th0) después del evento primario de activación. En general una mayor proporción de células CD4⁺ se diferencian hacia el fenotipo Th1 ante una primera estimulación con un mitógeno policlonal (Concanavalina A, Fitohemaglutinina, anticuerpos anti-TCR o anti-CD3) debido a que existe una mayor cantidad de

linfocitos que secretan IL-2 e IFN- γ que de aquéllos que secretan IL-4 o IL-10 (Romagnani, 1997). Sin embargo, ante una subsecuente re-estimulación, estas poblaciones secretan linfocinas características de ambas subpoblaciones maduras, para posteriormente predominar las células que secretan IL-10 e IL-4.

La hipótesis más aceptada en cuanto al desarrollo de una respuesta tipo Th1 o Th2 es que la proporción relativa de cada tipo celular depende del ambiente de citocinas que están presentes durante los eventos de activación o de clonación y del tipo de células presentadoras de antígeno que se encuentren activas (Gajewsky et al., 1992; Swain, 1995), entre otras señales polarizadoras (Constant y Bottomly, 1997). Las interleucinas que favorecen el desarrollo de una respuesta tipo Th1 o Th2 son principalmente la IL-12 y la IL-4, respectivamente, aunque recientemente se ha dado gran importancia a la IL-6 en la polarización hacia una respuesta Th2 (Rincón et al., 1997; VanHeyningen et al., 1997).

Los parásitos, en contraste a otros patógenos, tienden a causar infecciones crónicas que llevan a una estimulación antigénica sostenida con la consecuente alteración en los mecanismos inmunológicos que deben regularse para no mantener una respuesta potencialmente dañina para el propio huésped (Romagnani, 1994). Estas observaciones han dado origen al estudio de los mecanismos que regulan la polarización de la respuesta inmune hacia la predominancia de una de las 2 subpoblaciones de células de la respuesta inmunológica. El desarrollo de una respuesta excluye a la otra con profundas implicaciones en la resistencia o en la susceptibilidad a cualquier infección (Pearce y Reiner, 1995).

Los modelos animales de enfermedades parasitarias han sido muy útiles para conocer el papel de las subpoblaciones Th en la mediación de los principales eventos patogénicos como consecuencia del reconocimiento de antígenos extraños. Existen diferentes modelos de parasitosis en los cuales están bien caracterizados los tipos de respuesta inmune que pueden llevar hacia

protección o susceptibilidad. Por lo menos hay 5 modelos murinos bien estudiados: las infecciones con *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum*, *Trichuris muris*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Schistosoma mansoni*. En los modelos de leishmaniosis y malaria, los huéspedes que son capaces de desarrollar una respuesta inmune tipo Th1 temprana y lo suficientemente sostenida son resistentes a tales patógenos siendo el IFN- γ aparentemente necesario para el control de ambas infecciones. Mientras tanto, si el huésped desarrolla una respuesta de tipo Th2 se vuelve susceptible a una infección progresiva (Locksley et al., 1991; Romani et al., 1993). En cambio, en los modelos con parásitos intestinales (*Trichuris* y *Nippostrongylus*), el patrón Th2 genera la protección contra estos patógenos. Esto significa que la respuesta de tipo Th2 ha sido asociada con la protección del huésped en parasitosis por helmintos, mientras que las respuestas tipo Th1 no son protectoras, incluso pueden ser inmunopatológicas (Else and Grencis, 1991) o bien eliminar una respuesta tipo Th2 potencialmente protectora como sucede con *Strongiloides stercoralis* (Rotman et al., 1997).

La respuesta inmune ante las infecciones por helmintos generalmente se caracteriza por una alta producción de IgE, IgG1, IgG4, eosinofilia localizada y periférica así como por la participación de basófilos y células cebadas, todas estas respuestas son reguladas principalmente por citocinas Th2.

En las infecciones crónicas por helmintos como en la esquistosomiosis, oncocercosis, y la filariasis, existe una respuesta proliferativa T antígeno-específica deprimida, asociada con una baja producción de IFN- γ e IL-2. En cambio, la producción de IL-4 está aumentada (Freedman et al., 1991). En estas mismas infecciones se ha determinado que la frecuencia de las subpoblaciones T CD4+ que producen citocinas de tipo Th2 en respuesta a antígenos parasitarios, varían de 1:800 a 1:1200. Lo anterior demuestra una clara polarización de la respuesta inmune hacia Th2 en las infecciones por helmintos, como un intento infructuoso de control (Modlin y Nutman, 1993).

LAS INFECCIONES POR HELMINTOS Y LA RESPUESTA INMUNE.

Las infecciones por helmintos son universalmente asociadas con altos niveles de IgE, eosinofilia y mastocitosis, todas ellas respuestas dependientes de las citocinas tipo Th2 (Finkelman et al., 1997). Estudios previos que demostraron que los eosinófilos y la IgE pueden matar a los parásitos *in vitro*, han llevado a la suposición de que estas respuestas dependientes de Th2 son las principales responsables de la destrucción de parásitos extracelulares y por lo tanto se adoptaron como los principales mecanismos inmunes efectores contra helmintos (Capron y Capron, 1994; Sher et al., 1992). Sin embargo, existe una sorprendente contradicción *in vivo*, debido a que en la mayoría de las infecciones por helmintos existen grandes cargas parasitarias a pesar de que el huésped desarrolla una respuesta Th2 abundante (Allen y Maizels, 1997). Por lo tanto, existe la posibilidad de que las respuestas tipo Th2 sean inducidas por los helmintos para inhibir la respuesta Th1 potencialmente protectora, o por el propio huésped para evitar reacciones inmunopatológicas relacionadas con una fuerte y persistente respuesta tipo Th1 (Romagnani, 1994).

En las infecciones intestinales es poco más claro que la expulsión de estos parásitos (*Trichuris*, *Nippostrongylus*) y la baja producción de huevecillos, es mediada por la acción de la IL-4, posiblemente porque induce un aumento en la peristaltis o en la producción de moco, más que otro mecanismo inmune efector. La evidencia de que la IL-4 (y por extensión una respuesta tipo Th2) tiene un papel protector en las infecciones intestinales por nemátodos ha sido extrapolada a todos los helmintos (Allen y Maizels, 1997). Sin embargo, la evidencia de que las respuestas tipo Th2 son protectoras contra parásitos extracelulares que residen en otros tejidos no está aún clara.

En el modelo de esquistosomiosis, los eventos inmunológicos que generan resistencia no han sido bien establecidos. En algunas fases de su ciclo de vida una respuesta tipo Th1 es

restrictiva para el parásito, en otros aparentemente una respuesta Th2 es la que genera protección, principalmente mediada por altos niveles de IgE específica (Capron and Capron, 1994). Sin embargo, en la patología asociada a la formación de granulomas existe una importante participación de las citocinas secretadas por las células Th2 (Terry, 1994).

En esta parasitosis hay una gran complejidad entre la respuesta inmune, la protección del huésped y las reacciones patológicas, por ejemplo, la patología asociada a esta enfermedad se debe principalmente a la respuesta granulomatosa crónica del propio huésped. El análisis de la cinética de la respuesta inmune en ratones infectados con este parásito reveló que existe una inhibición de la respuesta tipo Th1 (Grzych et al., 1991) y un incremento en la producción de citocinas tipo Th2 al momento de la deposición de los huevecillos, lo que sugiere una participación importante de la respuesta Th2 más que de Th1 en la formación de la lesión (Pierce et al., 1991). Datos posteriores demostraron que la inyección de anticuerpos anti-IL-4 a ratones agudamente infectados inhibían la formación del granuloma hepático, mientras que la inyección de IL-4 recombinante aumentaba esta patología (Romagnani, 1994). Por otro lado, la inhibición en la formación del granuloma se ha asociado principalmente a la IL-12 y al IFN- γ , en donde la administración de IL-12 exógena junto con antígenos de huevecillos ha llevado a la eliminación total del granuloma y a una respuesta tipo Th1 sostenida (Wynn et al., 1994). En el ratón se ha demostrado que los macrófagos activados con IFN- γ y que liberan óxido nítrico son capaces de matar a este parásito, involucrando nuevamente a las células Th1, que son las principales productoras de IFN- γ (Maizels et al., 1993).

En la filariosis causada por *Brugia malayi* existe el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th2 conforme avanza el tiempo de infección. Sin embargo, la resistencia a este nemátodo no parece ser dependiente de esta respuesta, ya que ratones knockout para IL-4 fueron igualmente susceptibles a las microfilarias (Lawrence et al., 1995).

En la infección causada por *Onchocerca volvulus* (onchocercosis) se ha asociado una respuesta Th2 con protección, donde la producción de IL-2, IL-4 e IL-5 son las citocinas principalmente involucradas, mientras que la IgG1 específica es el anticuerpo más relevante, debido fundamentalmente a que se han encontrado en niveles elevados en los individuos inmunes a esta infección. Cuando estas citocinas son eliminadas *in vivo* causan una importante reducción en los niveles de protección de los huéspedes (Lange et al., 1994).

En la cisticercosis, causada por *T. solium* o la experimental por *T. crassiceps*, los mecanismos inmunológicos relacionados con resistencia o susceptibilidad son poco conocidos. Se ha tratado de dar importancia a los eosinófilos presentes alrededor de los parásitos, pero los datos no son convincentes, *in vitro* se ha demostrado que el suero de animales inmunizados puede dañar el tegumento del parásito pero no logran matarlo (Molinari et al., 1993). En general varios autores han descartado a la respuesta inmune humoral como mediadora de la protección contra este parásito, la respuesta inmune celular y las citocinas que participan en la regulación de ésta durante la infección son muy poco conocidas, por consiguiente la participación de una respuesta inmune tipo Th1 o Th2 en esta enfermedad es desconocida.

A pesar de que la participación de los subtipos celulares Th1 y Th2 son muy importantes en la regulación de la respuesta inmune en contra de las diferentes parasitosis, ésta no es la única barrera del huésped que debe burlar un parásito para establecerse transitoria o permanentemente, sino que debe sortear otros mecanismos de agresión, para los cuales han desarrollado complicadas y variadas formas de colonizar a un huésped inmunológicamente competente.

MECANISMOS DE COLONIZACION DEL HUÉSPED POR PARÁSITOS

EXTRACELULARES.

Los múltiples estadios de desarrollo, la variación antigénica, la conservación de secuencias altamente repetitivas, el uso de células derivadas del huésped para su secuestro, el escape de los

fagolisosomas para invadir el citoplasma, o el uso de moléculas del propio huésped para enmascaramiento molecular, son algunos de los mecanismos más utilizados por los parásitos intracelulares para evadir la respuesta inmune. Sobre cada uno de ellos existen revisiones recientes muy completas (Marrack y Kappler, 1994). Sin embargo, los mecanismos utilizados por los parásitos extracelulares son poco conocidos y sólo hasta recientemente se han estudiado más a fondo. Si parásitos relativamente sencillos como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, etc. han desarrollado diferentes estrategias para evadir la respuesta inmune, es obvio que los parásitos extracelulares y macroscópicos, que son más complejos, hayan desarrollado un número de estrategias complementarias para sobrevivir en un huésped inmunológicamente hostil.

Los mecanismos de colonización usados por los parásitos extracelulares pueden ser categorizados en dos grandes ramas. La primera reúne a todos aquellos que evitan la inducción inicial de una respuesta inmune, y la segunda la de los parásitos que pueden incapacitar los mecanismos efectores desarrollados tempranamente por el huésped.

Recientemente, se han identificado diferentes factores parasitarios, secretados o excretados que tienen el potencial de modificar la respuesta inmune, como es el caso del Factor Inhibidor de Neutrófilos (NIF) que fue descubierto en *Ancylostoma caninum* (Moyle et al., 1994). Este factor es una glicoproteína de 41 kDa que inhibe la activación de neutrófilos por CD11b/CD18 y, además, la adherencia de estas células al endotelio vascular. Otro factor secretado por un parásito extracelular es la acetilcolinesterasa (AChE), que puede tener diferentes acciones en la interacción huésped-parásito, los cuales van desde inhibir el movimiento peristáltico intestinal hasta regular la respuesta inflamatoria al inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias (Pritchard, 1995) y por lo tanto evitar el infiltrado inflamatorio que sería dañino para el parásito, como sucede con *Heligmosomoides polygirus* los cuales tienen la capacidad de inhibir la mastocitosis y de esta forma permanecer en el intestino (Maizels et al., 1993).

La respuesta inmune puede favorecer la inducción de explosiones respiratorias en las células fagocíticas y la liberación de gránulos y enzimas lisosomales, que tienen el potencial para dañar a los parásitos, principalmente a través del contenido de gránulos tóxicos, que liberan especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la secreción de óxido nítrico (NO). El contenido de tales gránulos daña directamente las membranas de los parásitos, y las ROS pueden iniciar la peroxidación de los lípidos de las membranas parasitarias con la subsecuente formación de peróxidos y aldehídos citotóxicos. Las ROS también pueden dañar directamente las proteínas y los ácidos nucleicos del parásito. Para protegerse de estos ataques, los parásitos han desarrollado un mecanismo de resistencia a través de la producción y secreción de dos agentes antioxidantes como son la glutatión-S-transferasa (GST) y la superóxido dismutasa (SOD) como es el caso de *Necator americanus* (Brophy et al., 1994).

Por otro lado, factores secretados o excretados por parásitos, como *N. americanus*, pueden actuar como proteasas que fragmentan a los anticuerpos en sus regiones Fab, de tal forma que son capaces de bloquear los ataques mediados por complemento o evitar la fagocitosis por IgG o IgM (Killan et al., 1988). Un fenómeno similar ha sido descrito también para *Spirometra mansoni* (Kong et al., 1994), *Schistosoma mansoni* (Auriault et al., 1980) y *Fasciola hepatica* (Carmona et al., 1993). Esta fragmentación de las inmunoglobulinas por proteasas de origen parasitario es importante, no únicamente por su potencial para la evasión inmunológica de la citotoxicidad mediada por anticuerpos, sino también porque la degradación de IgG produce moléculas biológicamente activas que pueden unirse a receptores de células efectoras e inducir la liberación de citocinas lejos del sitio donde está localizado el parásito y afectar así el resultado final de la infección. No solo algunos parásitos secretan proteasas que afectan a los anticuerpos, sino también pueden secretar inhibidores de proteasas que afectan la respuesta inmune del huésped a otros niveles, como es el caso de *Ascaris lumbricoides* que secreta un inhibidor aspártico-

proteasa que bloquea la presentación de antígeno por células B (Bennet et al., 1992), y de las larvas de *T. taeniformis* que secretan una molécula conocida como taeniastina que es un inhibidor de la serin-proteasa cuyo efecto es la inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos y de la proliferación de células T, así como la producción de IL-2 (Leid et al., 1987).

Otra forma que se ha descrito de desviar la respuesta inmune dañina para el parásito hacia una respuesta no dañina para el mismo es la secreción de glicolípidos o azúcares que inducen en los macrófagos o células B la producción de prostaglandinas y de IL-10, las cuales son conocidas por polarizar la respuesta inmune hacia Th2; este fenómeno ha sido descrito para *S. mansoni* y *T. taeniformis* (Velupillai et al., 1994; Maizels et al., 1993).

En la cisticercosis, los mecanismos de colonización parasitaria han sido poco estudiados. Se ha reportado la existencia del antígeno B (paramiosina) que podría evitar el ataque del complemento hacia el parásito (Laclette et al., 1992). Recientemente se han descrito, pero no caracterizado, dos factores solubles del cisticerco de *Taenia solium* que pueden inhibir la proliferación de linfocitos *in vitro* (Tato et al., 1995). Letonja y cols. en los 70's describieron varios factores sulfatados que inhibían también la acción del complemento sobre *T. taeniformis*. En la cisticercosis por lo general, la inflamación alrededor de esos parásitos es escasa o nula (Larralde, 1989). Sin embargo, poco se han estudiado los factores del parásito que podrían participar en este fenómeno; en este contexto sólo se conoce que algunos productos de secreción del cisticerco de *T. crassiceps* inhiben la degranulación de las células cebadas (Seifert and Geyer, 1989).

Otra de las formas que utilizan los parásitos, particularmente *Schistosoma*, para colonizar y establecerse por largos períodos en su huésped es la generación de una inmunidad concomitante. Esto consiste en que los parásitos adultos están protegidos de la respuesta inmune que ellos mismos provocan, pero los parásitos nuevos que tratan de invadir al huésped son susceptibles a estos ataques. Aparentemente esta "protección" se genera por la capacidad que tiene el parásito de

retener en sus membranas antígenos del huésped desde sus estadios tempranos, como glicoproteínas de los grupos sanguíneos AB, moléculas del MHC del huésped e inmunoglobulinas (Terry, 1994).

Un novedoso mecanismo de colonización que ha sido descrito recientemente, es aquél en el que los parásitos pueden aprovechar algunas de las citocinas (TNF- α) secretadas por su huésped para pasar de una fase de su ciclo de vida a otra, como es el caso de *Schistosoma mansoni* (Sher, 1992), o bien para mejorar su capacidad reproductora (Amiri et al., 1992). Recientemente nosotros hemos observado que la infección por *T. crassiceps* puede alterar el sistema endócrino de su huésped para favorecer un medio ambiente que le permite mejorar su crecimiento y reproducción; tal alteración parece estar mediada por factores del propio huésped, como la alta producción de IL-6 (Larralde et al, 1995; apéndice II).

INTERACCION ENTRE EL SISTEMA INMUNE Y EL ENDOCRINO.

Existe gran variedad de evidencias clínicas y experimentales indicando la existencia de una interacción bidireccional entre el sistema inmune y el sistema endócrino. Actualmente se acepta que la respuesta inmune es influida por diversas hormonas como las sexuales y los glucocorticoides. Por otro lado, algunas moléculas de la respuesta inmune afectan al sistema endócrino, principalmente a través de las interleucinas que se producen.

Los principales órganos del sistema inmune son el blanco de diferentes hormonas. Se han detectado receptores para glucocorticoides, andrógenos y estrógenos en el timo, bazo y médula ósea. También distintas células periféricas poseen receptores para estas hormonas, exceptuando a los andrógenos (Schuurs y Verheul, 1990).

Los glucocorticoides, secretados principalmente por las glándulas suprarrenales, son potentes anti-inflamatorios y moduladores de la respuesta inmune. Estas moléculas reducen la transcripción de varias citocinas proinflamatorias como: IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF- α .

En el timo inducen la muerte apoptótica de timocitos inmaduros y reducen también el tamaño de éste órgano, sobre todo en situaciones de estrés (Ballow y Nelson, 1997). Se han reportado varios efectos de estas hormonas sobre diferentes poblaciones celulares del sistema inmune. En eosinófilos y neutrófilos inhiben la adherencia de éstos a las paredes de los vasos sanguíneos, de tal forma que no pueden migrar hacia los sitios de inflamación, además la degranulación de éstas células también es afectada negativamente. En los monocitos y macrófagos hay una reducción en sus receptores Fc y una alteración en el procesamiento del antígeno. No necesariamente éstas acciones sobre el sistema inmune son negativas, de hecho los glucocorticoides se han utilizado en la clínica para evitar procesos inflamatorios dañinos (Ballow y Nelson, 1997).

Otras hormonas que afectan de manera importante el desarrollo de la respuesta inmune y de algunas enfermedades son los esteroides sexuales. Se conocen varias enfermedades parasitarias y autoinmunes que afectan de manera diferencial a hembras y machos.

La mayoría de los estudios se han enfocado sobre el efecto de los estrógenos y andrógenos sobre las células T. En el timo hay una correlación entre el inicio de la pubertad en los varones con una disminución en el tamaño de este órgano. Sin embargo, no ha sido posible, hasta ahora, detectar receptores de testosterona en los linfocitos circulantes, por lo que se ha inferido que el efecto de estas hormonas es sobre células dendríticas y/o epiteliales (Viselli et al., 1995).

En el bazo se ha observado un incremento en su tamaño, sobre todo en las regiones donde se encuentran las células B, cuando los andrógenos se retiran del individuo, ya sea por castración quirúrgica o química. En la médula ósea se han observado resultados similares, indicando que el receptor para andrógenos está presente en las células B inmaduras, pero no en las células B maduras (Viselli et al., 1997), además, esta hormona no altera la producción de inmunoglobulinas. La observación de que algunas líneas celulares provenientes de células del estroma de la médula ósea disminuyen su producción de IL-6 en presencia de andrógenos, apoya esta idea. A pesar de

lo anterior, es conocido que los andrógenos tienen un efecto inhibitor en algunas enfermedades autoinmunes como en lupus, tiroiditis y en la diabetes de ratones no obesos (Fox, 1992). Sin embargo, el mecanismo preciso por el cual actúa no es conocido. Otros efectos de los andrógenos (testosterona) son: aumenta el número de células CD8+ e incrementa los niveles de IL-2 e IL-3, mientras que inhibe la producción de IL-4 e IL-5.

Por otro lado, se ha demostrado que estrógenos (17 β -estradiol, progesterona) pueden influir en varios niveles del sistema inmune. Por ejemplo, aquí sí se han podido detectar receptores para esta hormona en las células circulantes. En los macrófagos aumenta su capacidad fagocítica, su producción de IL-1 (Hu et al., 1988) e inhibe la producción de NO (Roberts et al., 1996). En los linfocitos B aumenta la secreción de anticuerpos. En las células NK se ha observado un efecto negativo sobre su actividad, la cual disminuye de manera muy importante cuando se añade progesterona, este efecto ha sido más claramente observado durante el embarazo, cuando hay niveles altos de ambas hormonas, en este proceso se ha demostrado una inhibición de la respuesta Th1 paralelamente con un incremento en de la respuesta Th2 conforme el embarazo progresa (Roberts et al., 1996).

Las hembras, en general, tienen mayores niveles de Ig's que los machos en diferentes enfermedades (rubeola, brucellosis y hepatitis). En cambio, los estrógenos inhiben la respuesta inmune celular (Schuurs et al., 1990). El receptor para 17 β -estradiol ha sido identificado en células CD8+, células del timo, y en monocitos/macrófagos. Los estrógenos en general incrementan la producción de anticuerpos pero inhiben la proliferación de los linfocitos T, inhiben también el número y la actividad citolítica de las células CD8+. Otros efectos conocidos son el incremento en la producción de IL-5, IL-6 e IFN- γ , y un decremento en la producción de TNF- α e IL-2 (Roberts et al., 1996).

El efecto inverso, acción de moléculas del sistema inmune sobre el sistema endócrino, también ha sido estudiado. Se sabe que algunas interleucinas como la IL-6 e IL-1 pueden afectar el funcionamiento de la actividad cerebral, como es la inducción de fiebre y de sueño. El TNF- α en niveles elevados puede afectar el metabolismo de los lípidos. El efecto más claro entre estas interacciones se ha observado en la atrofia tímica y en la timectomía neonatal, en donde se ha detectado que la falta del timo genera un decremento en la producción de hormonas sexuales, lo cual implica que factores del timo (timosinas) tienen efecto sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (Grossman, 1985).

EL MODELO EXPERIMENTAL: GENERALIDADES Y ÚLTIMOS AVANCES.

En los últimos años el modelo experimental murino de cisticercosis causada por *Taenia crassiceps* ha sido utilizado para estudiar los diferentes factores biológicos que participan en la inducción de susceptibilidad o resistencia en esta parasitosis. *T. crassiceps* presenta la particularidad de que en su fase de metacéstodo puede reproducirse asexualmente por gemación, lo que ha permitido mantenerlo fácilmente por pases intraperitoneales de un ratón a otro (Freeman, 1964) durante varios años.

Con este modelo se ha avanzado en la sustitución de antígenos de *T. solium* por antígenos de *T. crassiceps* para su utilización en el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis humana, debido a la gran similitud antigénica que presentan ambos parásitos (Larralde et al, 1990). Por el lado inmunológico, se han tratado de obtener diferentes vacunas en contra de esta parasitosis a partir de extractos totales con resultados alentadores (Sciutto et al., 1990). Recientemente se ha observado que antígenos semipurificados de un extracto total presentan un perfil diferente de protección, ya que algunos facilitan (bajo peso molecular) y otros protegen (alto peso molecular) la instalación de este parásito (Valdez et al., 1994). Actualmente se llevan a cabo esquemas de

vacunación con antígenos de *T. crassiceps* en contra de la cisticercosis porcina (Sciutto et al., 1995).

En investigación básica, este modelo ha sido útil para explorar los factores genéticos y sexuales que participan en la susceptibilidad al parásito. Así, es conocido que la resistencia a este parásito está asociada al MHC que presenta el huésped. Los trabajos de Sciutto et al. (1990), han revelado que las cepas H2-d son susceptibles, mientras que las cepas H-2b son resistentes. En particular la región Qa-2 es la que participa de manera más importante en este fenómeno (Fragoso et al., 1998).

Con respecto a los factores sexuales que participan en esta parasitosis se ha encontrado que las hembras presentan una mayor carga parasitaria que los machos, independientemente de la cepa que provengan, sea ésta resistente o no (Larralde et al., 1989). La gonadectomía hace a las hembras más resistentes y a los machos más susceptibles a esta parasitosis, eliminándose así las diferencias de susceptibilidad entre sexos (Huerta et al., 1992). Los mecanismos de acción de las hormonas sexuales en esta parasitosis no han sido bien establecidos, pero hay suficiente evidencia indicando que la acción de estas hormonas es a través del sistema inmune y no directamente sobre el parásito (Huerta et al., 1992), probablemente influyendo a nivel del timo y en células T periféricas (Bojalil et al., 1993). Recientemente se ha comprobado que la hormona sexual más importante en esta parasitosis es 17β -estradiol cuyo nivel influye directamente en una mayor susceptibilidad en ambos sexos y afecta negativamente la respuesta de hipersensibilidad tardía a antígenos específicos del parásito (Terrazas et al., 1994; anexo II).

Por otro lado, el uso de este modelo experimental ha ayudado a conocer que la respuesta de tipo humoral no parece participar de manera importante en el control de la parasitosis, debido a que los títulos de anticuerpos específicos no se correlacionan con la resistencia al mismo (Hermánek y Prokopic, 1989; Sciutto, 1989), mientras que la respuesta de tipo celular es la que

parece estar involucrada en la eliminación del parásito, ya que la timentomía neonatal hace más susceptibles a los animales y la transferencia pasiva de células T inmunes les confiere resistencia (Bojalil et al., 1993). Además, se ha encontrado una correlación positiva entre una mayor intensidad de la respuesta de hipersensibilidad retardada y el bajo número de parásitos instalados (Terrazas et al., 1994; apéndice II), lo que sugiere más firmemente que la respuesta de tipo celular es la que puede estar involucrada en la resistencia a esta parasitosis.

Como puede apreciarse en el apartado anterior, el estudio del modelo murino de infección con el cisticerco de *T. crassiceps* ha generado importantes y nuevos enfoques en el conocimiento de las complejas interacciones entre el huésped y los patógenos extracelulares. Utilizando este modelo, la investigación básica está llevando activamente a la identificación de factores del huésped que pueden promover o restringir el desarrollo de inmunidad en contra de la cisticercosis. Sin embargo, la inmunobiología de la cisticercosis experimental no ha sido completamente estudiada. Existen pocos datos relacionados con la caracterización de los factores inmunológicos del huésped que realmente estén determinando la resistencia y susceptibilidad a este parásito, así como la identificación de áreas donde una mayor investigación es requerida para un mejor entendimiento de los eventos inmunológicos que son activados por parásitos extracelulares que infectan crónicamente a su huésped. Por esta razón se ha hecho necesario llevar a cabo una caracterización inmunológica durante la infección aguda y crónica con el cisticerco de *T. crassiceps* con el propósito de establecer el tipo de respuesta inmune que está involucrada en estas dos fases de la infección, así como las citocinas que participan en el desarrollo de tales respuestas. Por otro lado, también ha sido necesario establecer los posibles factores del propio huésped que pudieran interferir con una buena respuesta inmune protectora.

OBJETIVOS:

- 1) Determinar la cinética de la respuesta inmune celular y humoral durante la fase aguda y crónica de la infección experimental con el cisticerco de *Taenia crassiceps*.
- 2) Establecer las diferentes citocinas que pudieran participar en la protección o en la susceptibilidad a este parásito.
- 3) Conocer factores del propio huésped que pueden participar en el establecimiento y crecimiento del parásito.
- 4) Definir alguna de las estrategias que utiliza el parásito para colonizar al huésped.

HIPOTESIS.

Dado que es conocido que la respuesta inmune de tipo humoral no genera protección contra la cisticercosis experimental murina, y que, en los períodos tempranos de la infección, no existe un crecimiento parasitario importante ni una respuesta humoral específica, se propone lo siguiente: durante las primeras semanas de infección, el huésped es capaz de iniciar una respuesta restrictiva específica contra el parásito, probablemente celular, la cual es abatida cuando la infección se torna crónica, permitiendo así el establecimiento y desarrollo del parásito. Es posible que exista una polarización de una respuesta tipo Th1 (protectora) al inicio de la infección, hacia una respuesta de tipo Th2 (facilitadora) conforme la infección se vuelve crónica. Durante esta transición inmunológica es posible que factores del huésped y del parásito puedan tener un papel relevante en favorecer esta polarización.

RESULTADOS

Los resultados de ésta tesis se presentan en forma de artículos, los primeros trabajos que se realizaron con el fin de conocer la influencia de las hormonas sexuales en la susceptibilidad en esta infección se presentan en el apéndice II, en donde puede apreciarse que los estrógenos parecen modular favorablemente el desarrollo de la infección por *T. crassiceps*. Los artículos referidos son "A role for 17- β -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)" por Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. y Larralde C., que fue publicado en *Journal of Parasitology* (1994), 80:563-568.

En dicho artículo se demuestra que la susceptibilidad y la respuesta de hipersensibilidad retardada antígeno específica en la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*, es modulada de manera muy importante por los estrógenos.

El otro artículo que toca el tema sobre las interacciones Inmunoendócrinas en esta parasitosis es el siguiente "Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis" por Larralde C., Morales J., Terrazas L.I., Govezensky T. y Romano M., que fue publicado en *Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology* (1995), 52: 575-580.

En este artículo se reporta un incremento en los niveles de estrógenos en el suero (principalmente en los machos) conforme la infección se torna crónica, aunado a lo anterior se detectaron niveles de IL-6 elevados tanto en sobrenadantes de cultivos de linfocitos como en el suero de los animales infectados, en este artículo se propone a la IL-6 como uno de los posibles mediadores en el proceso de feminización observado.

ARTICULO 1.

El tema central de esta tesis se enfocó principalmente hacia el estudio de la respuesta inmune que se desarrolla durante la infección experimental con el cisticerco de *T. crassiceps* y los factores que pueden influir en ella. La cinética de dicha respuesta se siguió durante 32 semanas en ambos sexos, hasta ese momento no se había explorado el desarrollo de la respuesta inmune en esta infección parasitaria y tampoco la participación de las diferentes citocinas en la regulación del crecimiento parasitario.

Los principales datos obtenidos en cuanto a la cinética de la respuesta inmune durante el desarrollo de la infección con *Taenia crassiceps* están publicados en el primer artículo del apéndice I. Dicho artículo se titula: "Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)" por Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. y Larralde C., que fue publicado en *Journal of Parasitology* (1998), 84:74-81.

Los datos obtenidos de este primer artículo indican claramente que al inicio de la infección con el cisticerco de *T. crassiceps* existe una respuesta de tipo Th1 (alta respuesta proliferativa a Con-A y al antígeno específico, altos niveles de IL-2 e IFN- γ y los niveles más altos de anticuerpos específicos de la subclase IgG2a), la cual fue asociada a un crecimiento parasitario restringido. Al avanzar el tiempo de infección la respuesta inmune empieza a polarizarse hacia una respuesta de tipo Th2 (altos niveles de IL-4, IL-6 e IL-10, así como un aumento en los anticuerpos específicos de las subclases IgG1 e IgG2b), paralelamente a esta respuesta se observó un mayor crecimiento parasitario, y además, una respuesta de tipo Th1 totalmente abatida. Por otro lado, pocas diferencias en la respuesta inmune entre sexos fueron observadas a lo largo de las 32 semanas de infección

Las conclusiones principales de este artículo son que existe un desplazamiento de una respuesta tipo Th1 inicial hacia una respuesta de tipo Th2 en las fases tardías de la infección, lo cual podría estar relacionado con la resistencia y/o susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina.

ARTICULO 2.

Una vez que se había determinado la existencia de un desplazamiento de una respuesta tipo Th1 (probablemente protectora) hacia una respuesta tipo Th2 (probablemente facilitadora de la infección) en la cisticercosis experimental murina, se decidió comprobar si esta hipótesis era correcta.

Para abordar este punto se diseñaron experimentos de bloqueo o adición de citocinas características de cada tipo de respuesta. Los datos obtenidos de estos experimentos fueron enviados a publicar (el artículo lo aceptaron con modificaciones menores) con el título: "Th1-type cytokines improve resistance to murine cisticercosis caused by *Taenia crassiceps*" por Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. y Larralde C. Parasitology Research.

En estos experimentos se bloquearon de manera temprana y temporal (con anticuerpos monoclonales) algunas citocinas de tipo Th1 (anti-IFN- γ) o de tipo Th2 (anti-IL-4 y anti-IL-10). Por otro lado, se realizó el experimento contrario, que consistió en inocular al inicio de la infección y diariamente durante 1 semana citocinas recombinantes murinas de tipo Th1 (IL-2 + IFN- γ) o Th2 (IL-4 e IL-10).

Los resultados más relevantes de este artículo indican que las citocinas de tipo Th1 favorecen la resistencia al cisticerco de *T. crassiceps*, esto fue asociado a una mejor respuesta Th1, en donde se detectó una mayor respuesta a la Con-A, mayores niveles de IL-2, de IFN- γ , y de anticuerpos específicos de la subclase IgG2a. Por el contrario, cuando el IFN- γ fue bloqueado

o cuando se inocularon tempranamente las citocinas de tipo Th2, al menos la IL-10, se favoreció significativamente el establecimiento parasitario.

ARTICULO 3.

Puesto que con los datos obtenidos en los dos artículos anteriores se había dilucidado que la respuesta inmune tipo Th1 podría ser protectora en la infección contra el cisticerco de *T. crassiceps* y que la tipo Th2 podría facilitar la infección, era necesario conocer porqué la respuesta Th1 no podía sostenerse naturalmente o porqué aparecía la respuesta de Th2. Una manera de abordar este punto era determinar si algún factor del propio huésped estaba facilitando la polarización de la respuesta inmune hacia Th2.

Debido a que es conocido que en otras infecciones parasitarias la prostaglandina E2 participa de manera importante en la susceptibilidad, principalmente cuando las infecciones se toman crónicas, y debido a que recientemente estas sustancias han sido consideradas como importantes reguladoras de la respuesta inmune, se decidió estudiar el papel de la prostaglandina E2 en la susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps* y su posible relación con la respuesta inmune en esta infección.

Los resultados obtenidos con estos experimentos se encuentran en el artículo titulado: "*Taenia crassiceps*: Role of PGE2 in susceptibility to murine cysticercosis" por Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T. y Larralde C., este artículo fue enviado para su publicación a la revista *Experimental Parasitology*.

Los datos que se presentan en dicho artículo indican que la prostaglandina E2 (PGE2) participa de una manera importante en la susceptibilidad a esta infección, porque cuando se aplicó in vivo un inhibidor de la síntesis de PGE2 (indometacina), los animales presentaron menores cargas parasitarias. En cambio, cuando los animales recibieron PGE2 in vivo, desarrollaron cargas parasitarias significativamente mayores que aquéllos tratados con el placebo (control). Aunado a

estos hallazgos, se apreciaron también modificaciones en la producción de algunas citocinas y en la respuesta a Con-A de los linfocitos de bazo, según los tratamientos aplicados. El tratamiento con PGE2 inhibió la respuesta a Con-A y abatió los niveles de IL-2. En cambio, cuando los animales fueron tratados con indometacina se observó una mayor respuesta a la Con-A, así como niveles altos de IL-2. Además, los linfocitos del bazo de estos animales produjeron menores niveles de IL-6 y de IL-10 que los parasitados y tratados únicamente con el placebo. En conjunto estos datos sugieren una participación importante de la PGE2 en la modulación de la respuesta inmune en este modelo experimental de cisticercosis.

RESULTADOS ADICIONALES

En ésta última sección, se pretendió conocer la respuesta de una de las poblaciones celulares del sistema inmune que se encuentran en más estrecho contacto con el cisticerco de *T. crassiceps*, los macrófagos peritoneales. Estos experimentos se desarrollaron con la idea de que éstas células pueden ser una de las principales protagonistas en la polarización de la respuesta inmune en la cisticercosis experimental, dada su capacidad de presentar antígenos y de secretar diferentes citocinas que pueden ser fundamentales en el desarrollo posterior de la respuesta inmunológica en contra del parásito.

Fundamentalmente en esta sección se describe como los macrófagos cambian su patrón de secreción de citocinas conforme la infección avanza. Cuando el parásito se ha establecido, los macrófagos presentan una mayor producción de IL-6 que de IL-12, lo cual podría ser uno de los factores que favorecen la polarización de la respuesta inmune hacia Th2. Por otro lado, también se analizó la expresión de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 en los macrófagos de los animales infectados, dichas moléculas han sido recientemente relacionadas con el desarrollo de la respuesta inmune. En nuestro caso se encontraron evidencias de que existe una mayor expresión de la molécula B7-2, la cual ha sido descrita como una molécula que favorece la respuesta Th2. La

implicación de estos hallazgos dentro de la regulación de la respuesta inmune en la cisticercosis experimental se abordan en la discusión general.

RESULTADOS ADICIONALES

ANALISIS DE LA PRODUCCION DE IL-6, IL-12 Y DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS B7-1 Y B7-2 EN MACROFAGOS PERITONEALES EN LA INFECCION CON *Taenia crassiceps*.

Una de las principales poblaciones celulares involucradas en la generación de una respuesta inmune específica y de unión con la inmunidad natural o innata son los macrófagos, cuya función dentro de la respuesta específica puede darse a dos niveles, como célula presentadora de antígeno y como una población efectora, principalmente en infecciones por parásitos intracelulares o en una respuesta anti-tumoral (Trinchieri et al., 1997). La activación de los macrófagos representa uno de los principales eventos en la resistencia innata a las infecciones intracelulares. Los macrófagos se activan en respuesta a una infinidad de estímulos que se producen durante los procesos infecciosos e inflamatorios, y en el desarrollo de respuestas inmunes mediadas por células T, éstas células secretan entonces una serie de citocinas proinflamatorias las cuales contribuyen a una mayor capacidad fagocítica de los macrófagos y a la activación de varias manifestaciones de la respuesta inflamatoria. Su acción citolítica ha sido ampliamente reconocida en varias infecciones intracelulares como es el caso de *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Plasmodium*, en donde varias citocinas, principalmente el IFN- γ , pueden activar a los macrófagos para que destruyan a los parásitos. En cambio, solo en una parasitosis extracelular (*Schistosoma mansoni*) se ha demostrado su capacidad para eliminar al patógeno (James y Nacy, 1993), en donde la molécula efectora principal capaz de matar a la esquistosomula es el óxido nítrico (NO).

Dentro de su función reguladora en la respuesta inmune, los macrófagos tienen un papel fundamental desde el momento de la presentación de antígeno a las células T vírgenes o de memoria, y además como fuente de citocinas tempranas que pueden modificar de manera importante el desarrollo de dicha respuesta. En particular, las citocinas presentes durante la

expansión de las células T influye sobre la capacidad de los linfocitos Th para diferenciarse hacia Th1 o Th2, los macrófagos después de su activación pueden secretar citocinas que afectan directamente esta diferenciación, ya que estas células son una fuente importante de IL-6, IL-10 e IL-12. La IL-12 se produce rápidamente después de una infección, probablemente por el contacto directo de la célula fagocítica con el patógeno (bacteria, parásito o toxinas) y de esta forma puede influir sobre el desarrollo de una respuesta inmune. Sin embargo, otra de las citocinas que producen los macrófagos en grandes cantidades es la IL-6 y esta ha sido recientemente involucrada en la diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th2 (Rincón et al., 1997). La IL-10 en cambio, es principalmente una citocina reguladora de la actividad del propio macrófago y de otras células inmunes, recientemente se ha descrito que la IL-10 puede inhibir la producción de IL-12, teniendo entonces una acción autócrina sobre el mismo macrófago.

Por otro lado, los macrófagos como células presentadoras de antígeno pueden influir sobre el desarrollo de una respuesta inmune no solo por las citocinas que secretan al ser estimulados, sino también por las moléculas accesorias que son necesarias para generar un buen estímulo antigénico. Entre estas, las principales son las moléculas B7-1 y B7-2 que están relacionadas con la segunda señal necesaria que requiere el linfocito T para activarse. Estas moléculas se unen a CD28 o CTL4-A (Lenschow et al., 1996) que se encuentran en la membrana de los linfocitos T e inducen en ellos diferentes señales que llevan a su proliferación y activación, cuando esta interacción no se lleva a cabo hay anergia (June, 1994). Recientemente, se ha propuesto que dependiendo de cual molécula coestimuladora se una a CD28 el linfocito Th0 puede diferenciarse hacia Th1 o Th2, de modo que si B7-1 es el que se une entonces hay una respuesta tipo Th1, en cambio cuando B7-2 es la molécula que genera la segunda señal entonces la respuesta puede polarizarse hacia Th2 (Lenschow et al., 1996), además estas moléculas parecen tener un papel fundamental en el desarrollo y regulación de algunas enfermedades

autoinmunes (Kuchroo et al., 1995), parasitarias (Gause et al., 1996) o alérgicas (Keane-Myers et al., 1998).

En la cisticercosis experimental murina no se conoce el papel que desempeñan los macrófagos durante el inicio, progresión y regulación de la respuesta inmune en contra de este parásito.

Este trabajo se realizó con el propósito de explorar la respuesta de las células que están en contacto más estrecho con el cisticerco de *T. crassiceps* y con el objetivo primordial de conocer las principales citocinas que producen los macrófagos peritoneales durante la cinética del crecimiento parasitario en esta infección. Además se analizaron las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 a las cuales se les ha dado gran importancia recientemente en el desarrollo de la respuesta inmune.

MATERIALES Y METODOS

Animales. Se utilizaron hembras y machos de 6-8 semanas de edad de la cepa BALB/c, los cuales se mantuvieron en condiciones estándar en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Parásitos. Se utilizó la cepa ORF del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Infecciones. Los animales se infectaron por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps* de aprox. 2mm de diámetro sin gemaciones.

Obtención de Macrófagos. Los macrófagos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones sanos y con 1, 4, 8 y 16 de infección. A los animales sanos se les inocularon 3 ml de medio de tioglicolato al 3% estéril, se dejaron por 4 días y después se sacrificaron, se les inyectó i.p. 5 ml de solución de Hank's estéril, se dio masaje en el peritoneo y después se extrajeron las células con una jeringa. Estas células se lavaron 2 veces con la solución de Hank's y se lisaron los eritrocitos con choque osmótico inducido con cloruro de amonio. Las células se ajustaron a 1×10^6 /ml, posteriormente se sembró 1ml de esta suspensión celular en placas de poliestireno de 24 pozos, se incubaron durante 2 h a 37 C y 5% CO₂, posteriormente con medio tibio RPMI-1640 suplementado, se lavaron estos cultivos para eliminar las células no adherentes, las células adherentes fueron 90 % macrófagos de acuerdo con la tinción de esterasa inespecífica.

Los macrófagos de los animales infectados se obtuvieron de la cavidad peritoneal de la misma forma descrita arriba, solo que en estos no se inyectó el medio de tioglicolato.

Estimulación de Macrófagos. Los cultivos de macrófagos fueron estimulados con 10 µg/ml de LPS más 50 ng/ml de IFN-γ recombinante murino durante 24 horas. Pasado este periodo los sobrenadantes se cosecharon y se centrifugaron para eliminar células. Posteriormente se congelaron a -70 C hasta su uso.

Detección de Citocinas. En los sobrenadantes de cultivo se midieron IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α , todos por ELISA-Sandwich, los pares de anticuerpos específicos y las citocinas recombinantes fueron todas de la marca Pharmingen.

Detección de B7-1 y B7-2 por FACS. En los macrófagos peritoneales de animales con 8 semanas de infección y su correspondiente control sano de la misma edad, se analizaron por inmunofluorescencia indirecta la presencia de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. Estos macrófagos se obtuvieron como se mencionó antes, solo que no fueron estimulados con LPS o IFN- γ , sino que se dejaron toda la noche a 37 C y 5% CO₂, posteriormente se retiraron de la placa con un gendarme de hule y se procesaron para su análisis por FACS. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti B7-1 y anti B7-2 IgG de rata anti-ratón (Pharmingen) de acuerdo a las instrucciones de los productores. Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-IgG de rata marcado con FITC (Sigma), este último sirvió como control de pegado inespecífico.

Análisis estadístico. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney en todos los casos, se consideró como límite de significancia estadística cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

Con el propósito de determinar las principales citocinas secretadas por los macrófagos peritoneales de los animales infectados con el cisticerco de *T. crassiceps* se analizaron estas células en diferentes tiempos de infección. Así, se observó que los niveles de IL-6 producidos en respuesta a LPS + IFN- γ en la primera semana de infección fueron similares a los detectados en los macrófagos de los animales normales en ambos sexos. Estos niveles de IL-6 aumentaron significativamente en la cuarta semana de infección, en este momento se detectaron diferencias entre sexos, donde las hembras presentaron los mayores niveles. Durante la octava semana de infección se mantuvieron elevados los niveles de esta citocina en ambos sexos. En cambio, en periodos más avanzados de la infección con *Taenia crassiceps* los macrófagos de los machos produjeron niveles de IL-6 mucho mayores que las hembras, en las cuales los niveles de IL-6 decrecieron a valores normales (Figura 1, $P < 0.05$). En general puede observarse que estos niveles de IL-6 tienden a disminuir en las hembras conforme la infección avanza, en cambio en los machos sucede lo contrario, pues en periodos de infección más avanzados se detectaron mayores niveles de IL-6, de forma que las diferencias entre los sexos son nuevamente significativas (Figura 1).

Por otro lado, la secreción de IL-12 ante el mismo estímulo también presentó variaciones dependiendo del tiempo de infección que tenían los animales al momento de obtener los macrófagos, de modo que en las infecciones tempranas se detectaron niveles significativamente menores de IL-12 en los animales infectados que en los sanos. Sin embargo, al avanzar el tiempo de infección los niveles de IL-12 tienden a aumentar en ambos sexos en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos peritoneales de los animales infectados, de tal forma que a las 8 semanas de infección los niveles de esta citocina fueron significativamente mayores que los de los animales sanos (Figura 2, $P < 0.05$). En donde las hembras presentaron los niveles más altos. Sin

embargo, en periodos de infección más avanzados la producción de IL-12 se encontró significativamente disminuida en ambos sexos con respecto a los controles sanos.

La producción de TNF- α por los macrófagos de los animales infectados no presentó alteraciones cuando se compararon con los niveles obtenidos de los macrófagos de animales sanos (datos no mostrados).

En lo que respecta a la presencia de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 en los macrófagos de los animales infectados se encontraron algunas diferencias importantes. En primera instancia se observó una disminución en el porcentaje de células positivas de B7-1 en los animales infectados con respecto a los controles (60% contra 72% respectivamente), mientras que el porcentaje de positividad para B7-2 en estas mismas células se incrementó en los animales parasitados comparados con los animales sanos (90% contra 75%, respectivamente, Figura 3). Sin embargo, lo más interesante no fue el aumento en la población de células positivas para B7-2 en los macrófagos de los animales infectados, sino el incremento en la intensidad de fluorescencia de esta molécula, que fue de hasta tres veces mayor que la de los sanos (Figura 4). Lo que indica un importante incremento en la expresión de esta molécula coestimuladora durante la infección con el cisticerco de *T. crassiceps*, la cual podría tener alguna implicación inmunológica en la regulación de la respuesta anti-parasitaria.

PIES DE FIGURA.

FIGURA 1.- Detección de IL-6 en sobrenadantes de cultivo de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones infectados con *T. crassiceps*. 1×10^6 macrófagos fueron estimulados con LPS (10 μ g/ml) más IFN- γ (50 ng/ml) durante 24 h, posteriormente se cosecharon los sobrenadantes y se detectó por ELISA los niveles de IL-6. Puede observarse que los niveles de IL-6 se incrementan cuando los macrófagos se obtienen de infecciones más avanzadas (* $P < 0.05$).

FIGURA 2.- Efecto de la infección con *T. crassiceps* sobre la producción de IL-12 por macrófagos peritoneales. Los macrófagos se estimularon como se mencionó antes. En general se observa que la producción de IL-12 se mantiene por debajo de lo normal en los macrófagos provenientes de los animales infectados (* $P < 0.05$), con excepción de la octava semanas post-infección, en donde se detectaron los niveles más altos de esta interleucina.

FIGURA 3.- Porcentaje de células positivas a B7-1 y B7-2 en macrófagos peritoneales de ratones sanos e infectados con *T. crassiceps*. A) Ratones sanos fueron inyectados i.p. con 3 ml de tioglicolato estéril, 72 h después sus macrófagos peritoneales fueron aislados y procesados para detectar B7-1 y B7-2 por FACS. B) Ratones con 8 semanas de infección fueron sacrificados y sus macrófagos peritoneales se procesaron para detectar B7-1 y B7-2 por FACS. Puede observarse un decremento del 10% en la expresión de B7-1 en los macrófagos de los animales infectados, mientras que la población de células positivas para B7-2 se incrementó aprox. 10% con respecto a los animales sanos.

FIGURA 4.- Expresión de B7-1 y B7-2 sobre macrófagos peritoneales de animales sanos e infectados con *T. crassiceps*. Aquí puede observarse que los niveles de expresión de la molécula B7-1 en los animales no cambió de manera importante, mientras que la expresión de B7-2 se incrementó más del 100 % con respecto a los macrófagos de los animales sanos.

FIGURA 1

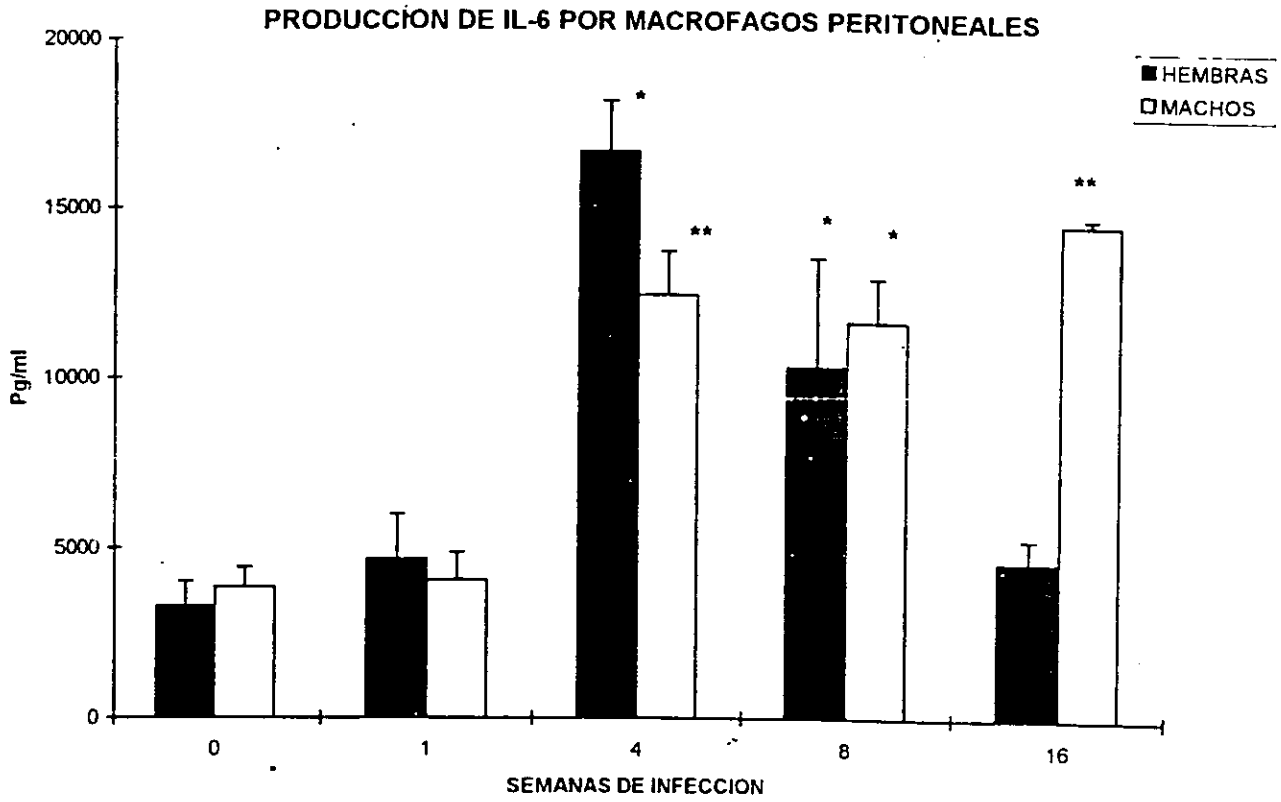


FIGURA 2

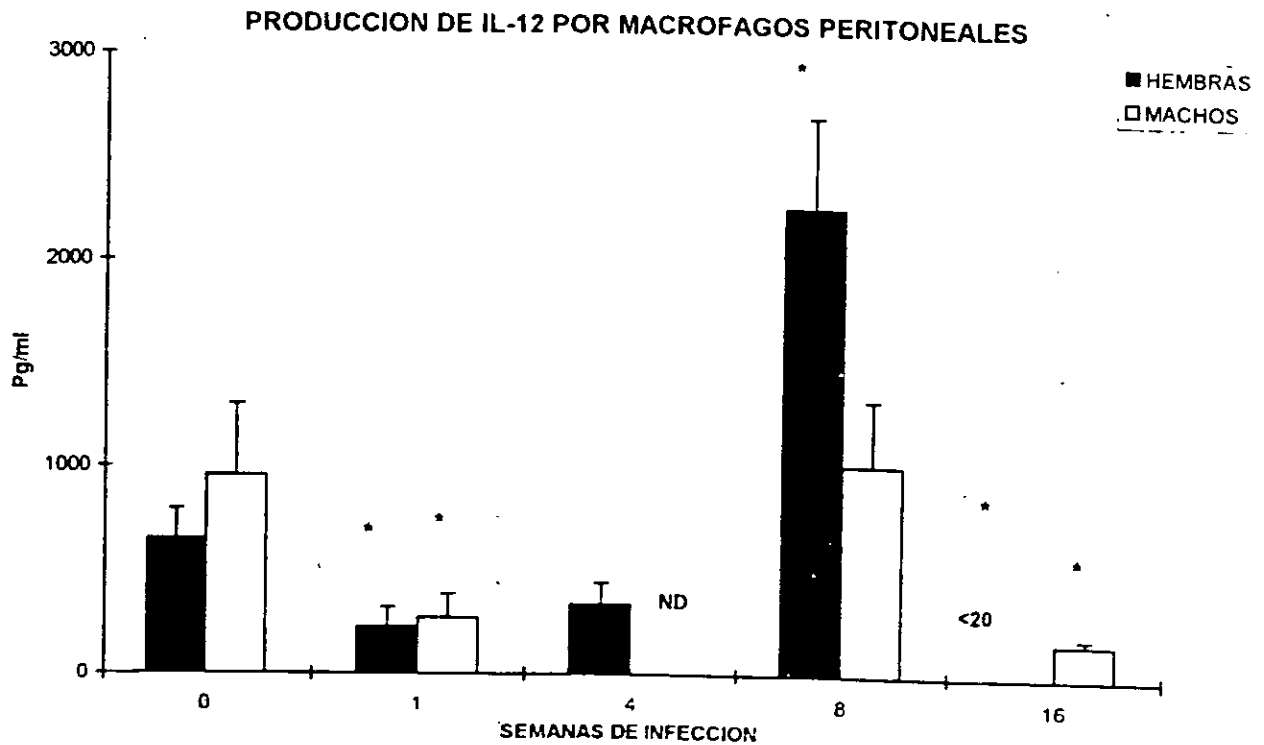


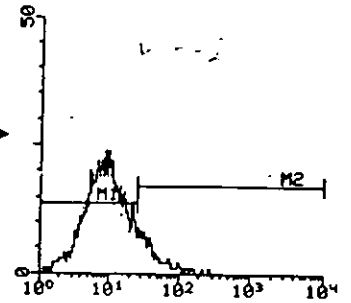
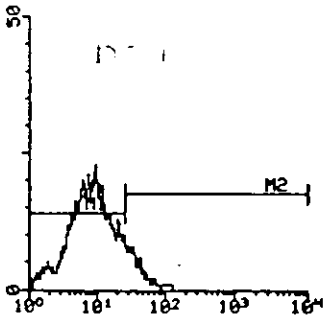
FIGURA 3

EXPRESION DE LAS MOLECULAS DE MEMBRANA B7-1 Y B7-2 EN MACROFAGOS PERITONEALES

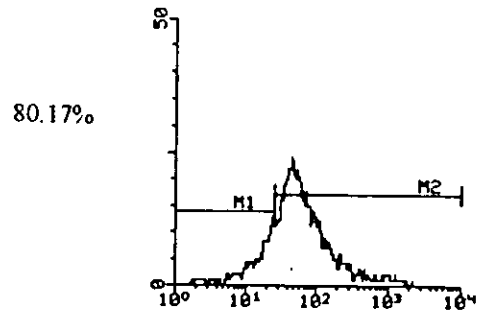
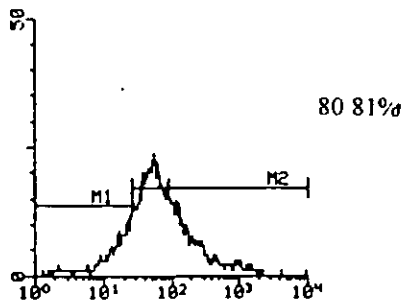
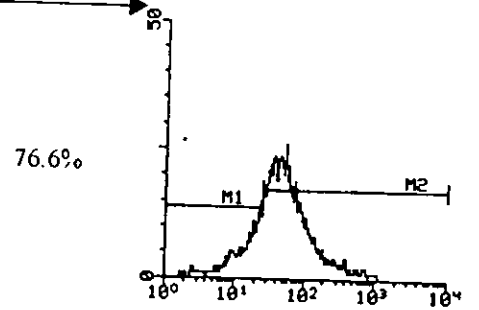
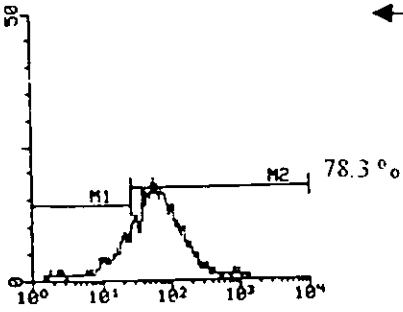
EXPRESION DE B7-1

EXPRESION DE B7-2

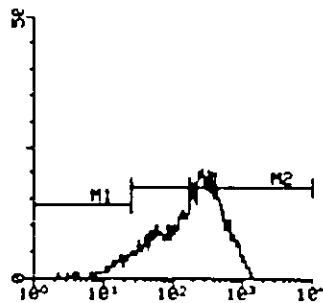
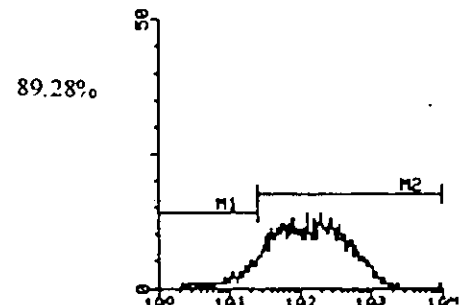
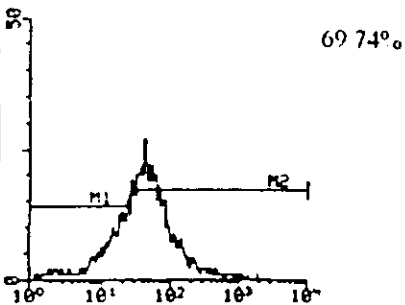
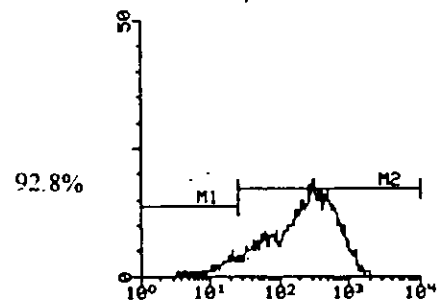
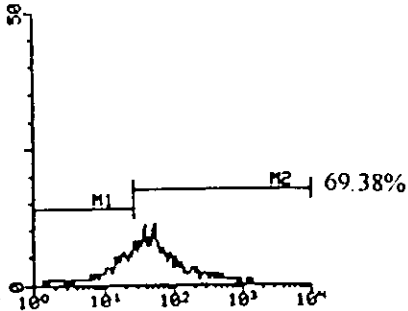
← CONTROL DE SEGUNDO ANTICUERPO →



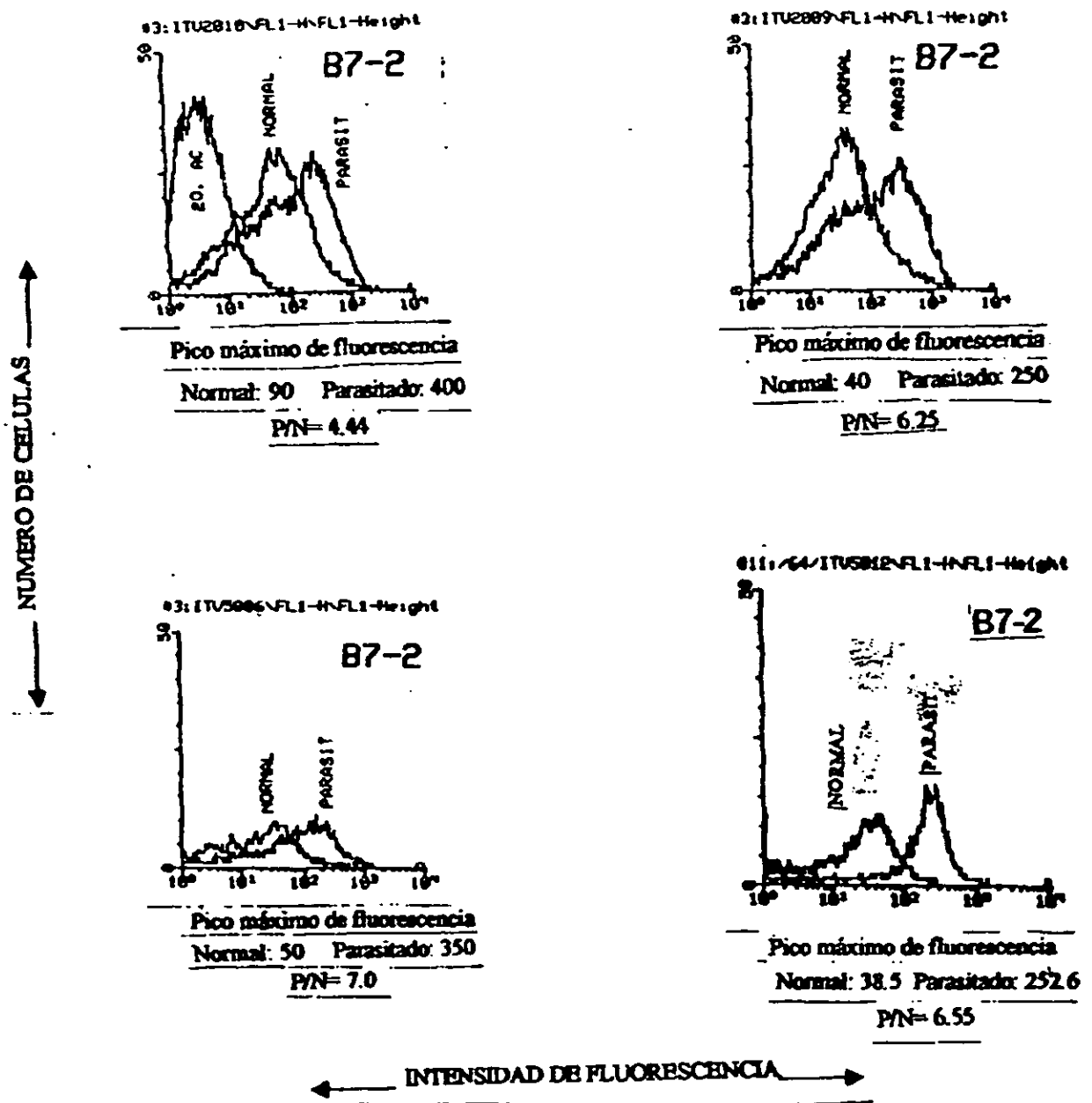
← RATONES SANOS →



← RATONES CON 8 SEMANAS DE INFECCION →



92.9%



P/N indica cuantas veces más expresión de B7-2 hay en los macrófagos de los animales parasitados con respecto a los sanos

FIGURA 4

DISCUSIÓN GENERAL

El control de las enfermedades parasitarias está muy ligado al tipo de respuesta inmune que se desarrolla durante la infección. La respuesta tipo Th1 se caracteriza, principalmente, por un dominio en la producción de IFN- γ e IL-2, que favorecen una respuesta celular, activación de macrófagos y producción de anticuerpos de la subclase IgG2a. La respuesta tipo Th2 se caracteriza por la producción de altos niveles de IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10 que favorecen la respuesta humoral y una mayor producción de anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2b e IgE (Mosmann y Coffman, 1989; Carter et al., 1996; Abbas et al., 1996).

En las parasitosis intracelulares, en general las respuestas tipo Th1 son capaces de controlar la infección (Reiner et al., 1994). En algunas parasitosis, principalmente en las intestinales y las causadas por helmintos, las respuestas de tipo Th2 pueden tener un efecto negativo sobre el peso, establecimiento y en la fecundidad de los parásitos (Pritchard, 1995). De estos hallazgos se generalizó la idea de que las respuestas dominadas por un patrón de citocinas tipo Th2 protegían contra los parásitos extracelulares. Actualmente, algunos autores han encasillado estos tipos de respuesta en dos niveles, el primero en la generación de protección contra parásitos intracelulares, en los cuales una respuesta Th1 es protectora (Sander et al., 1995), el segundo implica que la respuesta Th2 establece una protección contra parásitos extracelulares (Urban et al., 1994; Finkelman et al., 1997).

La participación de ambos tipos de respuesta en la cisticercosis experimental murina era desconocida, y no se habían caracterizado las citocinas y por ende los tipos de respuesta inmune que participan en la resistencia o susceptibilidad contra la infección. Hasta este momento en la cisticercosis experimental murina causada por *T. crassiceps* sólo se conocía que la respuesta inmune humoral no era importante en la inmunoprotección y que probablemente una respuesta de

tipo celular podría mediar la resistencia al parásito (Sciutto, 1989; Bojalil et al., 1993). Los resultados aquí presentados indican que existe una respuesta inmune tipo Th1 durante las primeras 2 semanas de infección, con una alta respuesta de hipersensibilidad retardada antígeno-específica asociada con una alta respuesta proliferativa *in vitro* a la Con-A y al antígeno de *T. crassiceps* en los linfocitos obtenidos del bazo de los animales infectados. Asimismo se demostró, una producción normal de IL-2 e IFN- γ , los niveles más altos de anticuerpos de tipo IgG2a y bajos de niveles de IL-4, IL-6, IL-10 y de anticuerpos de los subtipos IgG1 e IgG2b; todo ello asociado con una baja carga parasitaria. Después de la 4a. semana de infección se observó una marcada inhibición en la respuesta de hipersensibilidad retardada, en la respuesta proliferativa de los linfocitos a Con-A y al antígeno específico, así como en los niveles de IL-2 e IFN- γ en los sobrenadantes de los linfocitos de los animales parasitados, además también se detectó una disminución significativa en los niveles de IgG2a antígeno-específicos en estos mismos animales. Se encontraron niveles significativamente mayores de IL-4, IL-6 e IL-10 y de anticuerpos específicos de los subtipos IgG1 e IgG2b, concomitante al establecimiento y crecimiento sostenido de la carga parasitaria.

Lo anterior sugiere que al inicio de la infección con *T. crassiceps* se presenta una respuesta inmune Th1 asociada con un bajo número de parásitos, pero conforme la infección avanza aparece una respuesta inmune Th2, que se asoció con un incremento significativo en el número de parásitos.

Los mecanismos desplazan la respuesta tipo Th1 (probablemente protectora) hacia una respuesta de tipo Th2 (facilitadora) en esta infección no han sido bien establecidos. Es factible que la estimulación constante de los macrófagos participe de manera importante, pues es conocido que estas células son una de las fuentes más importantes de algunas interleucinas involucradas en la regulación de la respuesta inmune como la IL-12, IL-10 e IL-6. La acción principal de la IL-12 es

inducir en los linfocitos Th1 la producción de IFN- γ y esta citocina es la principal inductora de la iniciación de la respuesta Th1 (Romagnani, 1997). Aparentemente, la IL-12 es negativamente afectada sobre todo al inicio de la infección con *T. crassiceps*. La acción principal de la IL-10 es inhibir los efectos de otras citocinas sobre el macrófago evitando la activación citolítica de estas células por IFN- γ e inhibiendo la producción de TNF- α (Fiorentino et al, 1991) y de óxido nítrico (Romani et al, 1994). La IL-10 también inhibe la proliferación antígeno-específica de las células Th1 y la producción de IL-2 y de IFN- γ (Taga y Tosato, 1992). Esto implica que la aparición temprana de IL-10 desempeña un papel importante en el desplazamiento de la respuesta inmune Th1 hacia una Th2 en esta parasitosis. Nuestros resultados sugieren que la producción de IL-10 empieza a aumentar a partir de la segunda semana de infección, incrementándose hasta 5 veces con respecto a los animales sanos. El gran incremento en esta interleucina puede deberse a que existen varias fuentes alternativas de IL-10, que se activan en diferentes momentos de la infección. Además de los macrófagos, otras fuentes importantes de IL-10 son también las células Th2 (Mosmann y Coffman, 1987) y las células B1 (O'garra et al., 1992), lo cual implica una mayor contribución hacia la respuesta Th2 que se establece conforme la infección avanza.

La IL-6 ha sido relacionada recientemente con la polarización de la respuesta inmune hacia Th2 (Rincón et al., 1997). La producción de esta interleucina se eleva significativamente en diferentes compartimentos de los animales infectados, por ejemplo en linfocitos de bazo estimulados con Con-A, en macrófagos peritoneales y en suero. Es probable que el incremento temprano de esta citocina sea un factor importante en la polarización de la respuesta inmune en la cisticercosis murina.

Si se mantuviera una respuesta inmune tipo Th1 durante más tiempo en la cisticercosis murina, podrían eliminarse un mayor número de parásitos. Los experimentos en los que se administraron anticuerpos monoclonales anti-IL-10 y anti-IFN- γ , apoyan esta propuesta, pues los

animales que recibieron el tratamiento con anticuerpos anti-IL-10 durante la fase temprana de la infección desarrollaron cargas parasitarias significativamente menores que los controles. Por otro lado, los ratones que recibieron el tratamiento con anticuerpos anti-IFN- γ , presentaron cargas parasitarias hasta 90% mayores que los controles. El tratamiento con citocinas recombinantes murinas (IFN- γ + IL-2) durante la primera semana de infección generó mayor resistencia a la infección con *T. crassiceps*. Estos resultados fortalecen la idea de que una respuesta Th1 puede estar asociada a una mayor protección en contra de éste parásito. El efecto observado puede deberse a que la presencia temprana de niveles altos de IL-2 e IFN- γ favorecen la inducción de una respuesta inmune protectora tipo Th1, ya que es conocido que el microambiente de citocinas en el cual se inicia el desarrollo de una respuesta inmune es fundamental para la polarización de la misma (Constant y Bottomly, 1997). La mayor respuesta a Con-A y al antígeno parasitario que se detectó en los linfocitos de los animales que recibieron anticuerpos anti-IL-10, también apoya esta idea. Además, presentaron niveles normales de IFN- γ , mientras que los animales que recibieron IFN- γ +IL-2 produjeron mayores niveles de IFN- γ y de anticuerpos específicos del isotipo IgG2a, también mostraron una reducción significativa en los niveles de IgG1 e IgG2b, modificando así la relación IgG1:IgG2a de 7.8 en los animales controles a 0.47 en los animales tratados con estas citocinas; todo esto es promovido por una respuesta Th1 (Abbas et al., 1996). Otros resultados que apoyan esta idea son aquéllos que se obtuvieron del tratamiento con IL-10 recombinante, en los que se observó un incremento significativo en la susceptibilidad al parásito, asociado a una respuesta tipo Th1 de menor intensidad (baja respuesta proliferativa a Con-A y bajos niveles de IgG2a y de IFN- γ). Es probable que una respuesta inmune de tipo Th1 temprana pueda restringir el establecimiento del cisticerco de *T. crassiceps*, mientras que la IL-10 se perfila como una de las citocinas que favorecen el cambio hacia una respuesta Th2 en la cisticercosis murina. Algunos resultados similares han sido observados en otras infecciones parasitarias (Chensue et al. 1994;

Mathew et al. 1990, Scott, 1992; Romani et al., 1994); en todas ellas se ha propuesto a la IL-4 como la principal interleucina que participa en la polarización de la respuesta inmune hacia Th2. Sin embargo, trabajos recientes realizados con ratones knock-out para IL-4 han demostrado que a pesar de la falta de producción de esta interleucina, se desarrolla una respuesta de tipo Th2 cuando los animales son parasitados con *Leishmania major* (Noben-Trauth et al., 1996). Estos datos apoyan la idea de que una de las citocinas más importantes que participan en la polarización de la respuesta inmune hacia el subtipo Th2 es la IL-10. Específicamente en la cisticercosis murina, la IL-4 no tiene gran relevancia, puesto que los tratamientos con anti-IL-4 o con IL-4 recombinante *in vivo* no modificaron la susceptibilidad a la cisticercosis por *T. crassiceps*.

Los resultados obtenidos invitan a reflexionar sobre las investigaciones que se llevan a cabo en la búsqueda de una vacuna contra esta parasitosis. Los intentos realizados hasta ahora, aunque alentadores, han sido casi bastante empíricos pues se ha buscado inducir protección contra la cisticercosis porcina con extractos totales aplicados en dosis extrapoladas de experimentos en modelos murinos (Sciutto et al., 1994), o bien directamente, sin utilizar un modelo experimental apropiado (Molinari et al., 1993). Puesto que ni siquiera en los modelos murinos era conocido cómo se desarrolla la respuesta inmune en contra del cisticerco, qué tipo de respuesta es la protectora y cual la facilitadora. Estudios recientes están de acuerdo con nuestros resultados, pues indican que diferentes antígenos obtenidos de un mismo extracto parasitario pueden facilitar la instalación del cisticerco de *T. crassiceps*, y otros antígenos pueden proteger contra la infección (Valdez et al., 1994). Es evidente que se deben buscar estrategias (dosis, antígenos y adyuvantes adecuados) que induzcan una respuesta inmune Th1, protectora en contra de este parásito.

Nuestros resultados apuntan hacia la idea de que existen factores del propio huésped que pueden modificar el curso de la respuesta inmune en esta parasitosis. Las observaciones de que los niveles de estradiol se incrementan en la fase crónica de la infección (Larralde et al., 1995;

apéndice II) y el hecho de que éstos pueden alterar la respuesta inmune (Terrazas et al., 1994; apéndice II), principalmente la de tipo Th1. hablan de mecanismos complejos que ejerce el parásito para posibilitar la colonización de su huésped, alterando los niveles hormonales que aparentemente favorecen su instalación: altos niveles de estradiol y bajos de testosterona (Larralde et al., 1995), que a su vez pueden alterar la respuesta inmune celular específica en contra del cisticerco de *T. crassiceps* (Terrazas et al., 1994, apéndice II). El fenómeno de estrogenización generado por el parásito, requiere la participación del sistema inmune, principalmente por la alta producción de IL-6. la cual es conocida por su acción pleiotrópica (Dinarello, 1990), pues tiene la capacidad de ejercer efectos biológicos sobre el sistema nervioso central y sobre el endocrino. En este último podría alterar la actividad de la aromatasa p-450 y por este mecanismo convertir la testosterona hacia estradiol (Larralde et al., 1995, apéndice II). Si se correlaciona la producción elevada y crónica de IL-6 con el aumento en los niveles de estradiol en suero y el incremento en el número de parásitos en ambos sexos, se estaría frente a un claro ejemplo de interacción inmunoendócrina en esta parasitosis. Es obvio que en esta interacción participan otros factores, ya que en otras parasitosis una elevada producción de IL-6 no ha sido asociada con cambios hormonales (Truyens et al., 1994). Probablemente la clave sea la cronicidad del estímulo antigénico y el tiempo que permanecen elevados los niveles de IL-6.

El hecho de que se haya encontrado poco dimorfismo sexual en lo que respecta a la respuesta inmune y en la producción de interleucinas durante las fases aguda y crónica de la infección por *T. crassiceps*, no debilita la idea de que los estrógenos influyan negativamente sobre la respuesta inmune Th1 (Schuurs, 1992, Terrazas et al. 1994, apéndice II), y que esto sea uno de los principales motivos de la diferencia en susceptibilidad entre sexos. Cabe mencionar que estos ensayos fueron *ex vivo* con un período de incubación de 24 a 72 horas fuera del ambiente hormonal original, de tal forma que durante el cultivo de los linfocitos de machos y de hembras, se

desarrollaron en un ambiente hormonal con condiciones semejantes. Es ahí donde podrían haberse perdido algunas de las posibles diferencias más sobresalientes entre sexos. Además, varios autores indican que donde se observa un mayor dimorfismo sexual de la respuesta inmune es en aquellas situaciones en las que los niveles de hormonas sexuales están presentes en concentraciones ligeramente mayores de las fisiológicas (Pung et al., 1992; Terrazas et al., 1994). Es clara la necesidad de llevar a cabo nuevos experimentos en los cuales se evite el paso *in vitro* de las células para detectar *in situ* las diferentes citocinas que participan en esta parasitosis. También sería deseable realizar un análisis de la expresión de los RNAm de las citocinas en diferentes órganos linfoides durante diferentes momentos de la infección. Esto implica analizar la presencia de las diferentes interleucinas en su ambiente natural y sería aquí en donde podría apreciarse la influencia de las hormonas sexuales durante las primeras semanas de infección y su participación en la polarización de la respuesta inmune hacia Th2. En las fases crónicas de la infección se esperaría que las respuestas fueran similares, como lo indican los datos presentados aquí, puesto que los niveles de estrógenos son muy similares entre machos y hembras después de la 8a. semana de infección (Larralde et al., 1995, Apéndice II). A pesar de lo anterior, se pudieron observar algunas diferencias claras entre sexos, como la menor producción de IFN- γ en las hembras al inicio de la infección, menor respuesta de DTH a antígenos específicos, y una producción más rápida y mayor de IL-10 en las fases tempranas de la infección. La producción de IL-6 en macrófagos peritoneales de las hembras infectadas es mayor que la de los machos durante las primeras semanas de infección, mientras que en los tiempos más avanzados estas diferencias se pierden, sugiriendo una relación con la mayor susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps* observada en las hembras.

Para que las células T en reposo o vírgenes puedan ser eficientemente activadas a ejercer sus funciones efectoras, requieren recibir 2 señales por parte de las células presentadoras de antígeno (Lenschow et al., 1996). La primera señal proviene del complejo TCR-CD3 que

reconoce el antígeno específico presentado sobre las moléculas del MHC. La segunda señal es provista principalmente por la molécula CD28 después de ligarse con el receptor de la familia B7 que se encuentra en la membrana de la célula presentadora de antígeno al igual que las moléculas de MHC cargadas con el antígeno específico. La capacidad de las células presentadoras de antígeno para dar la segunda señal a las células T en reposo es inducida principalmente por antígenos de agentes infecciosos y es de vital importancia para el desarrollo de la respuesta inmune específica, ya que en la ausencia de la vía de co-estimulación CD28-B7, las células T pueden volverse no respondedoras (anérgicas) o morir por apoptosis (June et al., 1994). Trabajos recientes han descrito la existencia de dos moléculas estructuralmente relacionadas con B7, denominadas B7-1 y B7-2, a las cuales se les ha adjudicado funciones diferentes (Lenschow et al., 1996). CD28 y CTLA-4 pueden unirse a B7-1 o B7-2 pero con diferente afinidad, CTLA-4 > CD28, pero la señal que produce es inhibitoria para la célula. En cambio, la señal generada por CD28 es de coestimulación (June et al., 1994). Recientemente, se ha dado gran importancia a la interacción de estas moléculas (coestimulación) en el desarrollo de una respuesta inmune polarizada, de modo que se ha propuesto que la generación de una respuesta Th1 o Th2 es dependiente de la señal coestimuladora mediada por B7. En algunos modelos se ha demostrado que B7-1 y B7-2 pueden regular diferencialmente el desarrollo de una respuesta tipo Th1 o Th2 (Kuchroo et al., 1995). Algunos trabajos indican que B7-1 favorece la activación de células Th1, mientras que B7-2 favorece la polarización hacia una respuesta Th2 (Lenschow et al., 1996, Constant y Bottomly, 1997). Podría especularse que debido a la constante interacción de los macrófagos con la gran cantidad de antígenos que producen los parásitos, se pueden sobreestimar y modificar la expresión de alguna de las moléculas que originan las señales co-estimuladoras, llevando a las células Th1 anti-cisticerco a sufrir anergia o apoptosis conforme el tiempo de infección avanza. De ésta manera se perdería la respuesta Th1 específica como se

demuestra en la baja respuesta de DTH después de la segunda semana de infección y la baja respuesta proliferativa al antígeno *in vitro*. Alternativamente, los macrófagos sobreestimulados provenientes de los animales infectados podrían cambiar el patrón de citocinas en respuesta al antígeno o a LPS e influir sobre el desarrollo de la respuesta inmune.

Los resultados preliminares en los cuales se analizaron por FACS la presencia de B7-1 y B7-2 en macrófagos peritoneales de animales sanos o con 8 semanas de infección, demuestran que los macrófagos provenientes de los animales infectados presentaron una disminución en el porcentaje de células positivas a B7-1; mientras que el nivel de expresión de la molécula B7-2 se incrementó hasta 3 veces con respecto a los animales sanos, presentando además una mayor expresión de B7-2 que de B7-1. Estos datos encajan en el tópico actual sobre el papel de estas moléculas en el desarrollo de la respuesta inmune, en donde la coestimulación de los linfocitos CD4+ con moléculas B7-1 ha sido asociada con el desarrollo de una respuesta Th1, mientras que la coestimulación con B7-2 se asocia a una respuesta Th2 (Greenwald et al., 1997; Keane-Myers et al., 1998). La alteración de la expresión o el bloqueo de estas moléculas coestimuladoras tiene efectos diferenciales en distintas enfermedades, tanto autoinmunes como parasitarias (Corry et al., 1994; Kuchroo et al., 1995). En infecciones con parásitos intracelulares se han observado alteraciones en la expresión de estas moléculas en los macrófagos, lo que a su vez altera su capacidad de presentar antígenos (Frosch et al., 1997). La alteración en la expresión de B7-1 y B7-2 en los macrófagos peritoneales de los animales infectados con *T. crassiceps* podría estar relacionada con la polarización de la respuesta inmune observada en esta parasitosis. Una objeción a esta propuesta podría ser que las células Th2 también necesitan de la coestimulación CD28-B7. Sin embargo, las células Th2 dependen de CD28 sólo al inicio de la estimulación, pero más tarde parecen ser mucho menos dependientes de esta señal (MacKnight et al., 1994). Por el contrario, la mayoría de las clonas Th1 continúan requiriendo la co-estimulación de CD28 para su activación

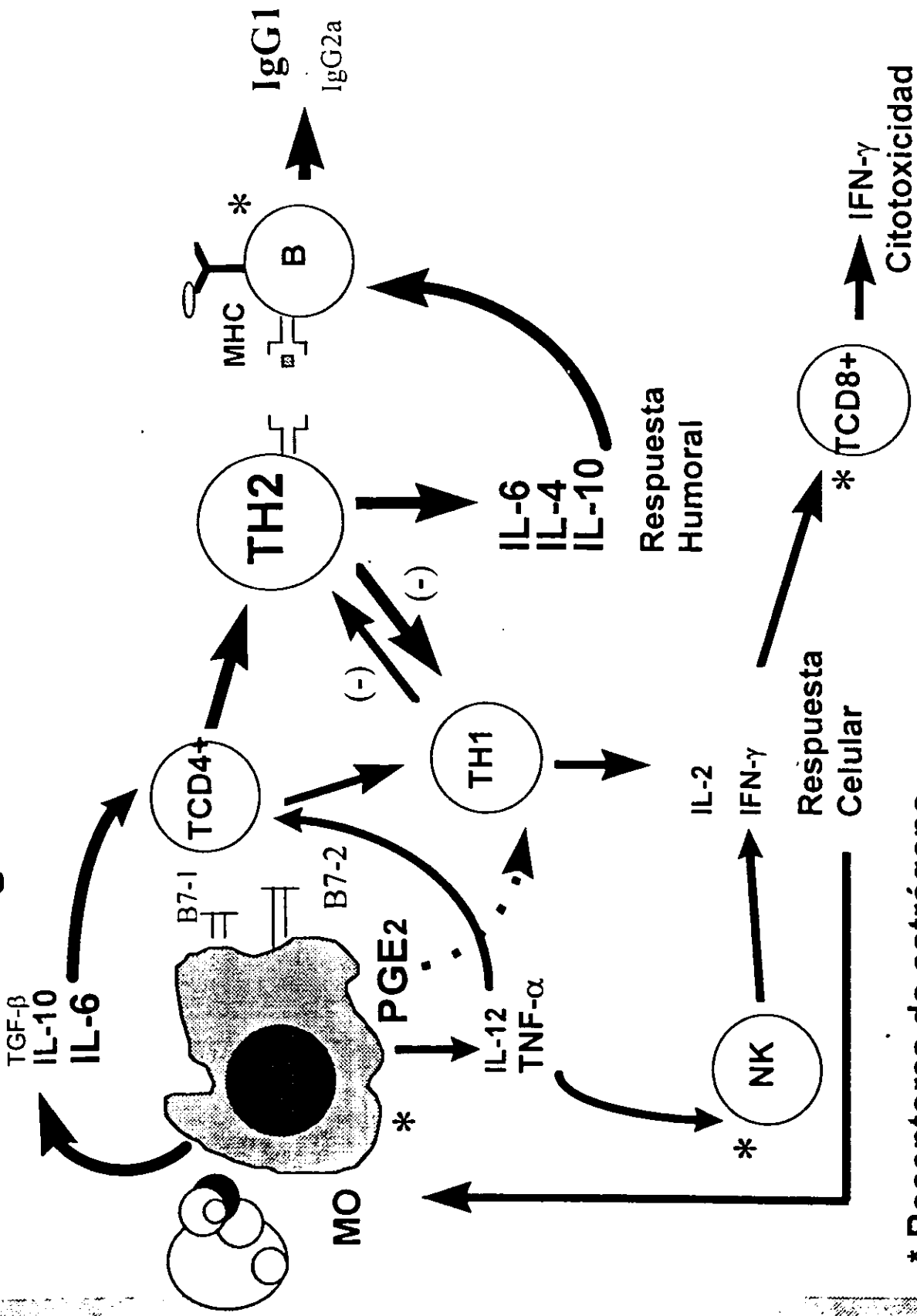
y posterior re-estimulación (Allison, 1994; Gause et al., 1997, Farber, 1998). Por otro lado, las células Th2 responden mejor a la presentación de antígeno por linfocitos B (Duncan y Swain, 1994; Conrad y Kaufmann, 1995), de modo que podrían ser estimuladas por estas células en tiempos más avanzados de la infección para seguir proliferando y secretando sus interleucinas e inhibir de esta manera a las células Th1 por la acción de IL-4 e IL-10. De esta forma, la respuesta anticistierco podría ser forzada a polarizarse hacia una respuesta Th2 (ver figura final).

La observación de que los macrófagos peritoneales de los animales infectados con *T. crassiceps* secretan cantidades significativamente mayores de IL-6 en respuesta al estímulo con LPS e IFN- γ , mientras que los niveles de IL-12 son menores y los de TNF- α no son alterados, indican que los macrófagos tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune en esta infección, puesto que recientemente la IL-6 ha sido involucrada en la polarización de la respuesta inmune hacia Th2 (Rincón et al., 1997). Esto adquiere interés al observar que los macrófagos producen mucho más IL-6 que IL-12 y esto podría favorecer el rápido establecimiento de una respuesta tipo Th2 a nivel local y sistémico (Afonso et al., 1994; Abbas et al., 1996).

Los macrófagos hiperestimulados son capaces de producir otros factores que interfieren con la activación de los linfocitos Th1 y Th2. Se sabe que la liberación de NO y TGF- β puede suprimir la respuesta inmune celular (mediada por Th1). Otro de los factores más importantes que liberan los macrófagos al ser estimulados crónicamente, es la prostaglandina E2 (Edwards et al, 1986). Además de ser considerada importante en los fenómenos de inflamación, es un factor capaz de modular la respuesta inmune. La PGE2 es conocida por inhibir la producción de IL-2 e IFN- γ por células Th1 en humanos y en el ratón, mientras que por otro lado favorece la secreción de IL-4 e IL-5 por las células Th2 (Watanabe et al., 1994). Su mecanismo de acción parece darse a través de la inducción de altos niveles de AMPc intracelular en estas células, con la consiguiente elevación del Ca⁺⁺ intracelular, el cual tiene un efecto diferencial sobre las subpoblaciones Th1 y

Figura final.- Esta figura representa la red inmunológica que aparentemente está involucrada en la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*. Aquí se esquematiza la polarización de la respuesta inmune hacia Th2 cuando la infección se ha establecido. Puede observarse en mayores dimensiones a la respuesta inmune de tipo Th2; las citocinas más claramente involucradas son la IL-10 e IL-6. Además, se esquematiza la importancia que tienen los macrófagos en esta infección como fuente de diferentes citocinas, de la alteración de moléculas de membrana y de la producción de prostaglandinas, las cuales pueden influir negativamente sobre la respuesta inmune protectora en la cisticercosis. Por último, también se señalan las células en las que se han encontrado receptores para estrógenos y que podrían mediar las diferencias de susceptibilidades entre sexos.

Red Inmunológica en la Cisticercosis Murina



Th2, dado que estas poseen distintas sensibilidades a los incrementos de AMPc y Ca⁺⁺ (Gajewsky et al., 1992). Así, las células tipo Th2 requieren un alto influjo de Ca⁺⁺ para responder óptimamente (Gajewsky et al., 1994), mientras que las células Th1 son muy sensibles a cambios drásticos en las concentraciones de Ca⁺⁺ intracelular. Cuando se dan estos cambios, las células Th1 pueden tornarse anérgicas. De esta forma los niveles altos de PGE2 participan como uno de los mecanismos que llevan al desplazamiento de una respuesta Th1 a una Th2 en la cisticercosis murina. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta idea, puesto que aquellos ratones que recibieron un tratamiento *in vivo* con indometacina (inhibidor de la síntesis de PGE2) desarrollaron cargas parasitarias significativamente menores (P<0.05) que los controles y de los que recibieron el placebo. Además, la más alta respuesta a la Con-A y la mayor secreción de IL-2 obtenida en los linfocitos de estos animales sugiere al menos un retardo en el desplazamiento de la respuesta Th1 a Th2 en este modelo. También se encontró que los niveles de IL-6 en los cultivos de linfocitos estaban disminuidos por el tratamiento con indometacina. Los estudios realizados *in vitro* indican un efecto positivo de la indometacina en el cultivo de las células de los animales infectados, debido a que mejora la respuesta a Con-A. Estos resultados señalan a los macrófagos como los principales productores de PGE2; ya que al retirarlos del cultivo de linfocitos, la respuesta a la Con-A mejoró significativamente y la adición de indometacina no tuvo efecto alguno. Por otro lado, los resultados obtenidos con el tratamiento con PGE2 *in vivo* (100 µg/pellet/ratón) apoyan lo anteriormente expuesto, fundamentalmente porque los animales que recibieron PGE2 presentaron cargas parasitarias significativamente mayores (P<0.05) que los controles.

La cronicidad de la infección es un factor importante en el cambio de una respuesta tipo Th1 hacia una Th2 en la cisticercosis experimental murina. Una de las causas podría ser la hiperestimulación de los macrófagos, lo que llevaría no sólo a un incremento en los niveles de IL-

10 e IL-6, sino también a una mayor secreción de PGE2 que inhibirían específicamente la actividad de las células tipo Th1. Recientemente, en otras infecciones crónicas causadas por *Mycobacterium avium* (Barrow et al., 1993) y *Schistosoma mansoni* (Velupillai y Harn, 1994), se han detectado glicolípidos capaces de inducir una alta producción de PGE2 por los macrófagos. Una observación interesante es que en los metacéstodos de *T. crassiceps* y *T. solium* se han detectado compuestos glicolipídicos (Kunz et al., 1991; Dennis et al., 1992; Dennis et al., 1993) con estructuras similares a los de *M. avium*. Se podría especular, que la inducción de una alta producción de PGE2 (probablemente por moléculas liberadas por el parásito) es un mecanismo que utiliza el cisticerco para colonizar a su huésped. Si esto se lleva a cabo por la secreción de compuestos glicosilados queda aún por definirse. Pero abre, sin duda, un campo de investigación nuevo en esta parasitosis. Valdría la pena caracterizar los efectos de los glicolípidos sobre la producción de PGE2 y determinar su posible efecto inmunomodulador.

Todo apunta hacia una participación activa e importante de los macrófagos en la cisticercosis experimental murina, tanto al inicio como en la progresión de la infección. La participación de los macrófagos puede darse en varios niveles, desde la misma presentación de antígeno hasta la activación de las células Th1 a través de la IL-12 y de la señal coestimuladora mediada por B7-1. La presencia temprana de IL-12 y la unión CD28/B7-1 favorecen la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 (Hsieh et al, 1993; Afonso et al.,1994; Constant y Bottomly, 1997). ¿Por cuanto tiempo se mantendrá la respuesta tipo Th1?, ¿Lo suficiente para eliminar al patógeno?, ¿Qué pasa si se mantiene esta respuesta?. Estudios recientes, en los que se ha utilizado la IL-12 recombinante para favorecer la respuesta Th1 en diferentes parasitosis han producido resultados alentadores. Por ejemplo, en la leishmaniosis la utilización de IL-12 como adyuvante ha mejorado notablemente la eliminación del parásito (Afonso et al.,1994); en la enfermedad de Chagas se han obtenido resultados parecidos utilizando la misma IL-12

recombinante murina (Petray et al., 1994). Debido a que estos estudios no son a largo plazo, no es posible conocer los efectos adversos de la presencia permanente de una respuesta de tipo Th1. Existen datos recientes que sugieren que una respuesta de tipo Th1 permanente, sin regulación negativa (generada por células tipo Th2), puede llevar al desarrollo de patologías (Romagnani, 1994; 1997), de ahí que la presencia de una respuesta tipo Th2 pueda aparecer después de cierto tiempo para regular una respuesta inmune potencialmente dañina (Abbas et al., 1996; Romagnani, 1997).

La idea de utilizar diferentes interleucinas como adyuvantes para mejorar una respuesta inmune protectora apoya la idea de que antes de desarrollar un protocolo de vacunación, es necesario conocer el tipo de respuesta que se da en contra de un parásito en particular. No se puede aplicar un resultado obtenido de un modelo como el de *Leishmania* a todas las enfermedades parasitarias. Debido a la enorme variabilidad de mecanismos que existen de inducir enfermedad y de colonización de sus huéspedes, entre los diferentes parásitos, y a la diversidad que tiene el sistema inmunológico para responder a cada uno de ellos. Es necesario conocer la inmunobiología de cada enfermedad, conocer los mecanismos que utilizan los parásitos para evadir los diferentes sistemas de ataque que desarrolla el huésped, definir los mecanismos de la respuesta inmune son los efectivos en contra de cada parásito (incluso en cada fase de su ciclo de vida) y entonces desarrollar estrategias inmunoprolácticas con más posibilidades de éxito.

Otro de los mecanismos que utilizan los parásitos para evadir la respuesta inmune de su huésped, es la generación de células supresoras (CD8+) que alteran la relación normal de CD4:CD8, como es el caso para *Trypanosoma cruzi* (Cuna and Rodriguez, 1995) y *Plasmodium* (Mshana et al., 1990), o bien favorecen la aparición de poblaciones de células extrañas con características inmunológicas totalmente anormales (Estes et al., 1993). Para abordar este punto, se analizaron por FACS las diferentes subpoblaciones celulares de bazo en distintos tiempos de

infección con el cisticerco de *T. crassiceps*. Los resultados obtenidos indican claramente que la relación CD4:CD8 no está alterada durante los diferentes tiempos de infección analizados, lo que indica que las alteraciones inmunológicas observadas no son debidas a un cambio en el fenotipo de las células involucradas en la respuesta inmune, sino a una disfunción de las mismas.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indican que el cisticerco de *Taenia crassiceps* puede utilizar varias estrategias para colonizar a su huésped, tanto inmunológicas como endócrinas. Dentro de las inmunológicas, se ha determinado un decremento en la respuesta inmune tipo Th1 que es restrictiva para el establecimiento del parásito, que de manera secuencial da lugar a un predominio de la respuesta facilitadora para el mismo (Th2). Es probable que los macrófagos tengan un papel determinante, como lo sugieren las alteraciones encontradas tanto en la producción de sus citocinas como en sus moléculas de membrana. En cuanto a los mecanismos endócrinos se ha observado cómo la infección crónica genera un incremento en los niveles de estrógenos en ambos sexos; también se ha determinado la participación de las prostaglandinas en la instalación de una respuesta facilitadora para el parásito. Es posible afirmar que el cisticerco de *T. crassiceps* puede manipular diferentes sistemas del huésped para lograr su colonización. Estos resultados indican la existencia de una intrincada red de factores biológicos que deben considerarse para el desarrollo de estrategias inmunoprolácticas en contra de esta parasitosis.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir lo siguiente:

- 1) En la infección crónica con el cisticerco de *Taenia crassiceps*, existe una respuesta inmune secuencial que va del tipo Th1 inicial hacia una Th2.
- 2) La respuesta inmune tipo Th1 está involucrada en la restricción del crecimiento parasitario, mientras que la Th2 favorece la instalación del mismo
- 3) Factores del propio huésped como las hormonas sexuales y las prostaglandinas tienen una obvia participación en los mecanismos que generan la polarización de la respuesta inmune a Th2 durante la infección crónica.
- 4) La participación de los macrófagos es fundamental en la regulación de la respuesta inmune, como fuente de IL-12, IL-6 y de prostaglandinas, y de posibles alteraciones en la presentación de antígeno.
- 5) Los cambios inmunológicos y hormonales observados durante la infección crónica por *T. crassiceps* pueden estar asociados al desplazamiento de una respuesta inmune potencialmente restrictiva (Th1) hacia una respuesta facilitadora (Th2). Si el parásito es capaz de modular este fenómeno, queda aún por definirse.

APENDICE I

SHIFT FROM AN EARLY PROTECTIVE TH1-TYPE IMMUNE RESPONSE TO A LATE PERMISSIVE TH2-TYPE RESPONSE IN MURINE CYSTICERCOSIS (*TAENIA CRASSICEPS*)

Luis I. Terrazas*, Rafael Bojalil†, Tzipe Govezensky, and Carlos Larralde

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510 D.F., México

ABSTRACT: In early stages of experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*, there is a clear but transient Th1-type immune response (characterized by high levels of interleukin [IL]-2, interferon- γ , concanavalin A, and antigen specific response, delayed-type hypersensitivity, and immunoglobulin [Ig]G2a antibodies) that associates with a low rate of parasite reproduction. As time of infection progresses an energetic and more permanent Th2-type response follows (characterized by high levels of IL-4, IL-6, IL-10, IgG2b, and IgG1 antibodies) that in turn associates with an increment in the rate of parasite reproduction. The sequential activation of Th1-type and Th2-type responses in murine cysticercosis would appear to favor progressively parasite reproduction, explaining the long time residence and the massive parasite intensity reached in chronic infections.

T helper cells (Th) play an important role in the regulation of immune and inflammatory responses through their ability to secrete different cytokines (Mosmann and Coffman, 1989). In many murine infections, Th1 and Th2 cell subsets exert an influence on different components of the host's response to pathogens by their expression of differential cytokine profiles (Mosmann and Coffman, 1989). The evolution of several parasitic infections has been associated with the regulation of the Th1 and Th2 responses. In most instances, Th1 responses appear to restrict intracellular parasites such as *Leishmania* (Reiner et al., 1994), *Trypanosoma* (Silva et al., 1992), and *Plasmodium* (Stevenson and Tam, 1993) and even extracellular parasites such as *Schistosoma mansoni* (Yamashita and Boros, 1990; Pearce et al., 1991), whereas Th2 responses seem more permissive or irrelevant in these same infections. However, the reverse is held for some intestinal parasites, as has been shown in *Trichuris muris* (Else and Grensis, 1991), *Trichinella spiralis* (Grensis et al., 1991; Pond et al., 1989), and *Necator americanus* (Pritchard, 1995).

Experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis has shown to be a useful model of metacestode infection especially in the study of immunological, genetic, and gender-associated factors of resistance and susceptibility. Previous experiments indicate that T cells are involved in parasite-restrictive immune responses to murine *T. crassiceps* cysticercosis (Bojalil et al., 1993), whereas the bulk of antiparasite antibodies do not clearly relate to immunoprotection or may even enhance parasite growth (Hermánek and Prokopic, 1989; Sciutto, 1989). More recently, it has been reported that mice infected with *T. crassiceps* exhibit a low response to concanavalin A (Con-A) and high levels of interleukin (IL)-4 in advanced infection (Villa and Kuhn, 1996). Other biological factors also strongly modulate the outcome of infection by *T. crassiceps*, such as major histocompatibility (MHC)-associated genetic background (Sciutto et al., 1991) and hormonal environment, 17- β -estradiol being permissive, whereas androgens are restrictive (Terrazas et al., 1994; Larralde et al., 1995), which presumably exert their actions by affecting T-cell responses. However, a detailed relationship between type of immune response and progression of this infection is not thoroughly described and does not quite

explain the mechanism underlying the establishment and massive increase in parasite intensity in a host that is not seriously compromised by the infection. Nor is there solid information on whether there are gender-associated immune differences to explain the greater susceptibility of females in early infections.

In this study, we relate parasite growth with changes in type of immune response in male and female mice, as measured by splenocyte synthesis of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and interferon (IFN)- γ in response to both Con-A and specific antigen, together with delayed-type hypersensitivity (DTH) response and isotypes of IgG antibody response at different stages of *T. crassiceps* infection.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Inbred BALB/c mice of both sexes, originally purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) in 1982, were used in this study; they have been maintained in controlled conditions at our animal facilities for more than 20 generations.

Parasites

Metacestodes of *T. crassiceps* (ORF) used in this study were harvested from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2-4 mo of infection. The cysticerci were washed 4 times in phosphate-buffered saline (PBS) (0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and selected for infection of mice or immediately centrifuged at 45,700 g for 1 hr at 4 C to obtain their vesicular fluid as source of antigen. The supernatant fraction, consisting mainly of vesicular fluid, was collected and its protein concentration measured by Lowry's method (Lowry et al., 1951) and frozen at -70 C until used. This supernatant fraction served as antigen for serum antibody detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which has been thoroughly described elsewhere (Larralde et al., 1990).

Infections

Experimental infections were achieved by intraperitoneal injection of each mouse with 10 small (ca. 2 mm diameter) nonbudding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 ml PBS obtained as described above. Resulting individual intensities of infection were measured at different times after infection, when mice were killed by cervical dislocation, their peritoneal cavity opened, and the number of cysticerci found inside were counted.

Measurement of DTH to vesicular fluid antigens

Vesicular fluid aliquots containing 100 μ g of protein in 30 μ l of PBS were injected intradermally into right hind footpads of parasitized and control mice using a 27-gauge needle. Footpad swelling was measured with a Mitutoyo micrometer (VWR Scientific, Cerritos, California) before and after 24 hr of antigen injection, and results were expressed as

Received 6 May 1996; revised 3 July 1997; accepted 3 July 1997.

* Present address: Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04510 D.F., México.

† Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez," Juan Badiano 1, 14080 México D.F., México.

mm increase in thickness. Swelling in control animals was subtracted from that in test animals to measure specific swelling at each time point.

Cell preparations and culture conditions

Mice were bled by cardiac puncture and subsequently killed by cervical dislocation. Spleens were removed in sterile conditions from infected and control mice, and splenic cells were obtained after mincing and filtering; they were washed and resuspended in culture medium made of RPMI-1640 (GIBCO BRL, Grand Island, New York) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 units of penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, 25 mM HEPES buffer, 1% nonessential amino acids (all from GIBCO BRL). Splenocytes were resuspended to 5×10^6 cells/ml in this medium. One hundred microliters of the cell suspensions were then placed into 96-well flat-bottom culture plates (Costar, Cambridge, Massachusetts) and stimulated with 100 μ l of Con-A (Sigma, St. Louis Missouri) mitogen solution (2 μ g/ml); plates were incubated at 37 C and 5% CO₂ during 72 hr. Eighteen hours prior to culture termination, 0.5 μ Ci of tritiated thymidine (methyl-³H TDR, sp. act. 247.9 GBq/mmol, NEN, Boston, Massachusetts) was added to each well. After further incubation for 18 hr, splenocytes were harvested onto glass filter papers and processed for liquid scintillation counting. The same cells were processed for antigen-induced proliferation; antigen was added in 20 μ l of RPMI-1640, to give a final concentration of 50 μ g/ml (optimal concentration) and cultures were incubated for 6 days and processed as mentioned above.

Evaluation of cytokine production in vitro

Single cell suspensions of splenocytes prepared as described above were diluted in 10% FBS-supplemented RPMI-1640 to give 5×10^6 cells/ml. Volumes of 1 ml of final cell suspensions were placed in each well of a 24-well plate (Costar) and incubated with 2 μ g/ml of Con-A for 24 hr at 37 C and 5% CO₂. After centrifugation, the supernatants were collected, aliquoted, and stored at -20 C until used. An aliquot of the same cell suspension was stimulated with 50 μ g/ml of specific antigen during 72 hr, and supernatants were processed as mentioned above. Basal levels (nonstimulated) of all cultures were measured. The cytokines IFN- γ , IL-4, IL-6, and IL-10 were measured by sandwich ELISA using methods according to manufacturers (PharMingen, San Diego, California). The kits of cytokine-specific monoclonal antibodies and recombinant cytokines were all obtained from PharMingen. IL-2 was measured by bioassay using CTLL-2 cells as described elsewhere (Gillis et al., 1978), using blocking monoclonal antibodies anti-IL-2 and anti-IL-4 (PharMingen), using recombinant murine IL-2 (rmIL-2) (PharMingen) as standard curve.

Role of antigens from *T. crassiceps* on cytokine detection assays

Constant quantities of recombinant murine IL-2 (1,000 pg/ml), IL-4 (2,000 pg/ml), and IFN- γ (2,000 pg/ml) were preincubated for 2 hr at 37 C in the presence of different concentrations (50, 25, 12.5, 6.25 μ g/ml) of vesicular fluid proteins from *T. crassiceps*, to test for direct interference of antigen with cytokine detection. ELISA measurements for these cytokines were performed as described above.

Spleen cell phenotype analysis

Flow cytometric analysis of spleen cell phenotype was performed in a FACScan (Becton Dickinson, San José, California) in normal and infected mice at different times after infection as previously described (Gately et al., 1994). Monoclonal antibodies used for staining splenocytes were anti-CD3, anti-hamster-fluorescein IgG isothiocyanate (FITC), anti-CD4-phycoerythrin (PE), anti-CD8-FITC (all from PharMingen). Hamster IgG-FITC, rat IgG-FITC, and rat IgG-PE were used as isotype controls.

Antibody subclass detection

Sera obtained from normal and infected mice were diluted 1:100 and analyzed for specific anticysticercercis antibodies by ELISA. IgG isotypes were detected using monoclonal antibodies to IgG2a, IgG2b, and IgG1, diluted 1:1,000 (Zymed, San Diego, California). Reactions were revealed with ABTS solution (Zymed).

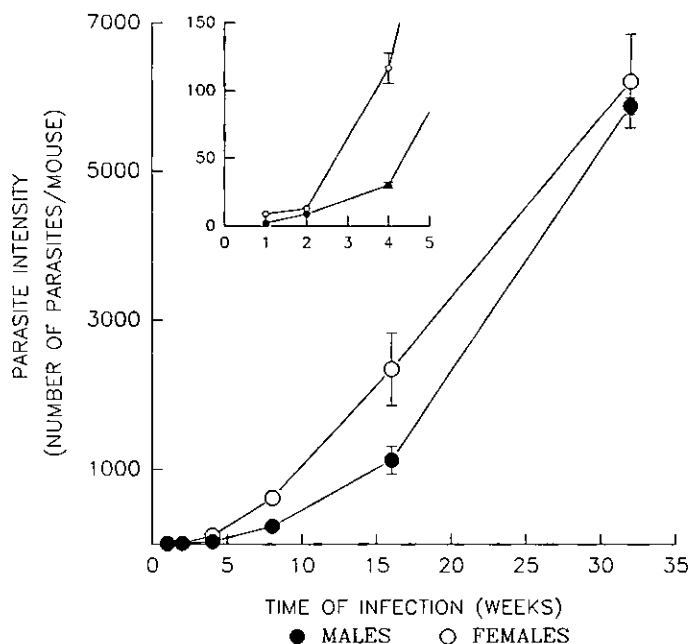


FIGURE 1. Evolution of parasite intensities after intraperitoneal (i.p.) infection of mice with *Taenia crassiceps* cysticerci. Mice were infected i.p. with 10 cysticerci at 6 wk of age, and the individual parasite intensities were measured at different times after infection. Data clearly point to a sluggish parasite growth in the first 2 wk of infection, followed by a more actively reproducing stage that starts sooner and faster in females than in males. At late stages, both genders reach thousands of parasites per host. Values shown are the mean \pm SD of 10 mice per group.

Statistical analysis

The statistical significance of the effects of the experimental variables was determined by nonparametric Mann-Whitney *U*-Wilcoxon Rank test and by *t*-test in the factorial designs, as appropriate.

RESULTS

Parasite intensities

The kinetics of parasite growth during the 32 wk of infection is shown in Figure 1. In the first 2 wk after infection, there is minimal parasite growth in both female and male mice. Thereafter, a significant and constant increment in parasite intensity ensues, more rapidly in females than in males. As time of infection progresses, parasite intensities tend to equalize between the 2 genders, so that males are as massively parasitized as females 32 wk after infection, when thousands of parasites (parasite mass equaling that of the host) are found in each mouse.

Lymphocyte proliferation

Proliferative responses of splenocytes to Con-A and antigen were determined at different weeks after infection. During the first week of infection, similar lymphocyte proliferation in response to Con-A was observed in both healthy and parasitized mice ($P > 0.5$), whereas in the second week parasitized mice significantly exceeded control values ($P < 0.05$; Fig. 2A). However, beginning 4 wk after infection, there followed a significant depression in the response to Con-A of parasitized mice ($P < 0.01$), which remained very low (60–80% below control values) up to at least 32 wk after infection (Fig. 2A; $P < 0.01$). The

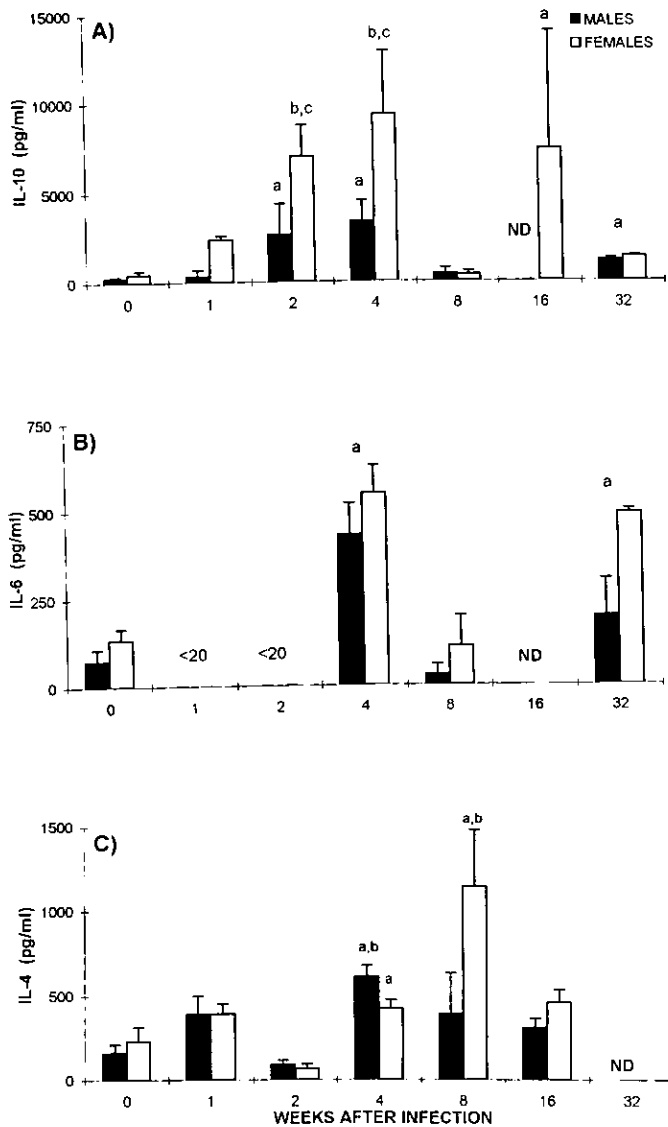


FIGURE 3. Th2-type cytokine production in splenocytes' response to Con-A in mice infected with *Taenia crassiceps*. IL-10 production was detected at close to normal values in early infections (1 wk) and found to increase and decrease in an oscillatory manner as infection progressed (A). IL-6 production was first decreased (1 and 2 wk) and then increased to varying levels at latter time (B). The levels of IL-4 production were found clearly above normal values only at 4 and 8 wk of infection (C). Values shown are the mean \pm SD of 5 animals per group. a = $P < 0.05$ with respect to normal values (0 wk); b = $P < 0.05$ between genders at the same time of infection; c = $P < 0.01$ with respect to normal values. ND = not determined.

values thereafter, reaching highest and significant levels at 4 wk after infection in males and at 8 wk after infection in females ($P < 0.05$, Fig. 3C).

No cytokines could be detected in supernatants obtained from either basal or antigen-stimulated cell cultures.

Spleen cell phenotypes

It has been shown in some parasitic diseases that infection alters the subpopulations of T cells (Estes et al., 1993; Cuna and Rodriguez, 1995). In our case, flow cytometric analysis of

TABLE I. Splenocyte phenotypes from normal and parasitized mice.

| Group | T cells (CD3 ⁺) (%) | T-cell subset | |
|-----------------------------|---------------------------------|------------------|------------------|
| | | CD4 ⁺ | CD8 ⁺ |
| 0 wk of infection (control) | | | |
| Female | 36.49 \pm 8.43 | 30.7 \pm 2.97 | 8.01 \pm 2.7 |
| Male | 33.26 \pm 1.24 | 25.1 \pm 1.04 | 8.59 \pm 0.4 |
| 1 wk of infection | | | |
| Female | 43.91 \pm 1.82 | 27.8 \pm 2.59 | 8.59 \pm 0.5 |
| Male | 37.58 \pm 1.75 | 20.7 \pm 1.08 | 6.52 \pm 0.7 |
| 8 wk of infection | | | |
| Female | 43.86 \pm 4.97 | 24.77 \pm 0.89 | 9.25 \pm 1.3 |
| Male | 33.86 \pm 10.8 | 26.05 \pm 4.85 | 6.11 \pm 0.08 |

splenocytes from normal and infected mice revealed some changes in expression of CD3, CD4, and CD8 surface markers (Table I). Infected female mice had slightly higher values of cells carrying CD3, CD4, and CD8 markers than males, at all times of infection, differences varying from 10 to 30% in CD8 at 8 wk of infection but were not statistically significant. In females, CD3⁺ and CD8⁺ cells increase and CD4⁺ cells decrease with time of infection (approximately 20%), but again not significantly, whereas in males their numbers remain essentially similar at all times of infection.

DTH responses

Both male and female infected mice showed a mild but statistically significant increased antigen-specific DTH response relative to controls, a response that reached a maximum at the second week of infection when it approximated 10 \times the values of day 0 (Fig. 4; $P < 0.05$) and tended to decrease thereafter. In general, male mice showed higher DTH responses than females.

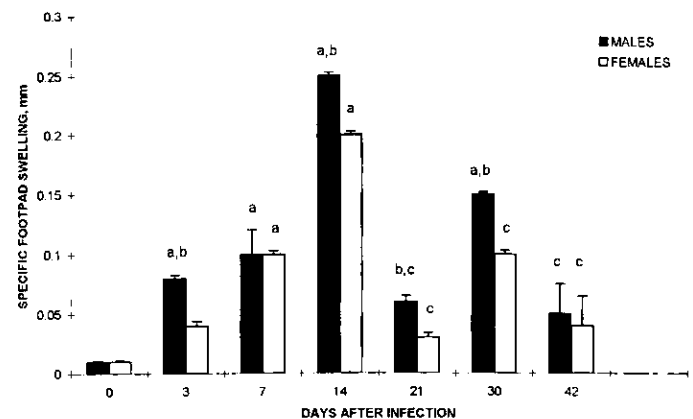


FIGURE 4. DTH response to antigens of vesicular fluid from *Taenia crassiceps* cysticerci. All mice were infected with 10 cysticerci i.p. In the specified day they were challenged with 100 μ g of antigen in the footpad, and 24 hr later the swelling of footpads was measured with a dial gauge micrometer. Data show an increase of DTH reactions in early infections and a tendency to decrease in later periods. Values shown are the mean \pm SE of 5 animals per group. a = $P < 0.05$ with respect to normal values (0 wk); b = $P < 0.05$ between genders at the same time of infection; c = $P < 0.005$ with respect to highest response.

kopic, 1989; Sciutto, 1989). Additional support derives from the fact that neonatal thymectomy of mice greatly increases susceptibility to *T. crassiceps* infection and T-cell replacement restores it to normal levels (Bojalil et al., 1993), whereas antibodies do not (Sciutto, 1989). And, more recently, it has been shown that this infection can induce T-cell anergy in response to mitogens (Villa and Kuhn, 1996), which would appear as a most strategic disarmament of the host's most effective anti-parasite weapon.

Here, we show that there is a correlation between the profile of cytokines produced by splenocytes and the progress of infection by *T. crassiceps*. Early in infection (1 and 2 wk after infection), when few or no parasites can be recovered from the peritoneal cavity of the infected mice, they exhibit a strong Th1-type immune response; their splenocytes proliferate as much as controls in response to Con-A and also proliferate strongly when stimulated with specific antigen. The levels of IL-2 are normal and those of IFN- γ high; the DTH response to specific antigens is high and the strong antibody response is dominated by the isotype IgG2a that is regulated by Th1 cells through IFN- γ production (Snapper and Paul, 1987). However, by week 4 after infection and thereafter, both the proliferative response to Con-A and to antigen are significantly inhibited, the production of IL-2 and IFN- γ declines, and the DTH response is depressed. Concomitantly, the levels of IL-4, IL-6, IL-10, IgG2b, and IgG1 anticysticercosis antibodies, all Th2-promoted functions, are found to increase in chronically parasitized mice. Thus, our results support the anergy notion that there is a shift from an initial parasite-restrictive Th1-type-based immune response to a later permissive Th2-type-based response that allows the establishment and growth of *T. crassiceps* metacystodes in the murine host.

The immunological changes described reflect the general impact of the disease on the immune system, as is measured in the spleen cells, and may not closely relate to the state of affairs in the compartment where the parasite is located. They relate to the state in which the host's immune cells enter the compartment to meet with the parasites. It is then clear they enter in quite an altered state as the infection progresses, one favoring irrelevant Th2 responses instead of the effective Th1 response. To elucidate what is going on in the immune cells within the peritoneal cavity is of course a fascinating question but requires very incisive experimental designs that are the object of other studies.

The use of spleen cells in these experiments follows the design employed to study many other infections (Sher et al., 1992; Goyal et al., 1994). Con-A was used in order to maximize the release of cytokines from the responding T-cell subsets present at each moment of the infection. Although several cell types (macrophages, basophils, natural killer cells) can secrete some of the cytokines measured here, only T cells respond to Con-A stimulation. Furthermore, the fact that in nonstimulated cultures no cytokine production was detected is an indication that T cells are the source of those found after Con-A stimulation. It is unknown whether CD4⁺ or CD8⁺ T cells are the major source of these cytokines in murine cysticercosis, and more specific experiments are needed to clarify this point.

A very puzzling result of our experiments is that antigen-driven cytokine production by the splenocytes was not detected, even at times when they proliferated in response to antigen

stimulation. One may speculate this is consistent with the T-cell anergy proposed by Villa and Kuhn (1996), but in the live animal there is strong specific antibody production and DTH responses, both demanding efficient Th cell function, and this weakens the anergy notion at the general level. One would have to imagine that the immune system's components specific for *T. crassiceps* are working at levels of maximal response, i.e., saturation of antigen and cytokine receptors, that cannot be further stimulated by the specific antigen. Or, alternatively, that the antigen employed, being quite a complex mixture of proteins (Laralde et al., 1990) and possibly other parasite components (Baumeister et al., 1992), may interfere with the detection and full function of the cytokines released in vitro in response to antigen. We have in fact tested this possibility and Figure 6 shows how increasing concentrations of *T. crassiceps* antigens progressively interferes (up to 71%) with the in vitro ELISA detection of different cytokines (IL-2, IL-4, and IFN- γ). Should antigen interference also be directed to cytokine function, then the lack of cytokine response to vesicular fluid antigens could actually point to an effective close-range parasite strategy to interfere with the immune cells' network operation necessary to deal with the parasite, as it has been shown to do for complement-dependent reactions (Laclette et al., 1992) and immunological protection (Sciutto et al., 1995).

The outcome of many parasitic infections is associated with Th1 or Th2 responses (Cox and Liew, 1992; Sher and Coffman, 1992). This is especially clear in some murine infections such as those caused by *L. major* (Scott, 1989; Locksley et al., 1991; Morris et al., 1992; Nabors et al., 1995; Noben-Trauth et al., 1996) and *S. mansoni* (Pearce et al., 1991; Sher and Coffman, 1992; Ribeiro et al., 1993), where Th1 responses have been associated with resistance, and Th2 responses with susceptibility, and for the nematode *T. spiralis* in which the reverse pattern is observed (Grencis et al., 1991; Goyal et al., 1994). It would appear that *T. crassiceps* murine cysticercosis follows the immune pattern of *L. major* and *S. mansoni* infections. Our findings are in accordance with previous ones reported for other infections (Romagnani, 1994) that show that a Th2-type immune response predominates in chronic diseases and are consistent with results recently reported by Villa and Kuhn (1996) in *T. crassiceps* infection where chronically parasitized mice show a Th2-like response to Con-A (low levels of IL-2 and high levels of IL-4).

Differential activation of Th1- and Th2-type responses plays a crucial role in the resistance or susceptibility of hosts to a variety of infectious diseases. The mechanisms driving the shift from an initial Th1 response to a subsequent polarization toward a Th2 response found in diverse parasitic diseases are little known (Scott, 1989; Pearce et al., 1991; Swain, 1995), but an active participation of both parasite and host factors could be responsible, as has been previously suggested (Goyal et al., 1994; Laralde et al., 1995; Swain, 1995). In our study, we found high levels of IL-10 and IL-6 produced by splenocytes from chronically infected mice, which could limit the expansion of Th1 cells, as has been suggested recently in relation to the infection by *Mycobacterium* species (VanHeyningen et al., 1997). Also, it is known that IL-10 suppresses the growth of Th1 cells inhibiting production of both IL-2 and IFN- γ and synergize with IL-4 to inhibit macrophage function (Fiorentino

- macrophages and stimulates a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *Journal of Experimental Medicine* **179**: 447–456.
- RIBEIRO, J. A. M., R. P. ALMEIDA, O. BACELLAR, M. I. ARAUJO, C. DE-MUERE, J. C. BINA, A. J. DESSEIN, AND E. M. CARVALHO. 1993. Correlation between cell-mediated immunity and degree of infection in subjects living in an endemic area of schistosomiasis. *European Journal of Immunology* **23**: 152–158.
- ROBERTS, C. W., A. SATOSKAR, AND J. ALEXANDER. 1996. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. *Parasitology Today* **12**: 382–388.
- ROMAGNANI, S. 1994. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual Review of Immunology* **12**: 227–257.
- 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 *Taenia solium*. Ph.D. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 225 p.
- , G. FRAGOSO, M. BACA, V. DE LA CRUZ, L. LEMUS, AND E. LAMOYI. 1995. Depressed T cell-proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infection and Immunity* **63**: 2277–2281.
- , M. L. DÍAZ, F. VALDEZ, C. LOMELÍ, T. GOVEZENSKY, R. M. MONTÓYA, AND C. LARRALDE. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* **77**: 243–246.
- SCOTT, P. 1989. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* **68**: 369–372.
- SHER, A., AND R. L. COFFMAN. 1992. Regulation and immunity to parasites by T cells and T-cell derived cytokines. *Annual Review of Immunology* **10**: 385–400.
- , R. T. GAZZINELLI, I. P. OSWALD, M. CLERICI, M. KULLBERG, E. J. PEARCE, J. A. BERZOFKY, T. R. MOSMANN, S. L. JAMES, H. C. MORSE III, AND G. M. SHEARER. 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunological Reviews* **127**: 183–204.
- SILVA, J. S., P. J. MORRISSEY, K. H. GRABSTEIN, K. H. MOHLER, D. ANDERSON, AND S. G. REED. 1992. Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine* **175**: 169–174.
- SNAPPER, C. M., AND W. E. PAUL. 1987. Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**: 944–947.
- STEVENSON, M. M., AND M. F. TAM. 1993. Differential induction of T helper cell subsets during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. *Clinical and Experimental Immunology* **92**: 77–83.
- SWAIN, S. L. 1995. T-cell subsets. Who does the polarizing? *Current Biology* **5**: 849–851.
- TERRAZAS, L. I., R. BOJALIL, T. GOVEZENSKY, AND C. LARRALDE. 1994. A role for 17- β estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* **80**: 553–558.
- VANHEYNINGEN, T. K., H. L. COLLINS, AND G. D. RUSSEL. 1997. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *Journal of Immunology* **158**: 330–337.
- VILLA, O. F., AND R. E. KUHN. 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* **112**: 561–570.
- WALKER, W., C. W. ROBERTS, D. J. P. FERGUSON, H. JEBBARI, AND J. ALEXANDER. 1997. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. *Infection and Immunity* **65**: 1119–1121.
- YAMASHITA, T., AND L. D. BOROS. 1990. Changing patterns of lymphocyte proliferation, IL-2 production and utilization, and IL-2 receptor expression in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **145**: 724–731.

L. I. Terrazas, M. Cruz, M. Rodríguez-Sosa, R. Bojalil, F. García-Tamayo, C. Larralde

**Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by
Taenia crassiceps.**

L.I. Terrazas, M. Cruz, F. García-Tamayo

Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México
(U.N.A.M.), México, D.F. 04510.

M. Rodríguez-Sosa, R. Bojalil

Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F.
14080. Department of Health Attention, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

C. Larralde

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. México, D.F.
04510.

Corresponding author: Luis Ignacio Terrazas. Department of Biology, Edificio B Laboratory 202,
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México
D.F. 04510, MÉXICO. Tel (525) 622-30-98; Fax (525) 616-20-10.

Abstract

Resistance and susceptibility to different parasitic diseases have been associated with the predominance of Th1 or Th2-type immune responses. In experimental murine cysticercosis Th1 response seems to be involved in resistance whilst Th2 activity associates with heavy parasite intensities. To test this notion the roles of Th1 and Th2-type cytokines in infected mice were studied after treatment with anti-cytokines monoclonal antibodies or with recombinant murine cytokines during early stages of infection. Mice receiving anti-IL-10 carried lesser parasite intensities than control mice and developed a strong Th1-type response, whereas mice receiving anti-IFN- γ showed a dramatic increase in susceptibility. Treatment with recombinant cytokines confirmed these results, mice receiving IFN- γ and IL-2 showed low parasite numbers, whereas IL-10 induced a significant increase in parasite loads. Thus, the Th1-type immune response plays a fundamental role in protection against *T. crassiceps* cysticercosis, whilst Th2, at least through IL-10, favors parasite establishment.

Introduction

In response to pathogens naive CD4⁺ T cells differentiate into effector Th1 and/or Th2 cells. Th1 cells produce IL-2, IFN- γ and TNF- β , and are involved in cell-mediated immune reactions. Th2 cells secrete mainly IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13, and mediate B cell activation, antibody production, and the regulation of Th1 responses (Mosmann and Coffman 1989). In many instances a Th1-type immune response helps to eliminate intracellular microorganisms, whereas a Th2-type response specialize in the control of extracellular pathogens (Cox and Liew 1992; Reiner and Locksley 1993). Development of an inappropriate immune response can be ineffective and even pathogenic to the host (Romagnani 1997).

Experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis has been used as a laboratory model in which to study the participation of immunological, genetical and gender associated factors of resistance and susceptibility. Notwithstanding the limitations of secondary experimental infection with respect to natural infection with eggs from tapeworm, this model has been useful for demonstrating important biological factors involved in the outcome of infection by *T. crassiceps* such as MHC associated differences in susceptibility, which are principally mediated through the expression of the nonclassic class I MHC Qa-2 antigen (Fragoso et al. 1998) and, related to the hormonal environment where 17- β -estradiol is permissive whereas androgens appear restrictive of parasite growth (Terrazas et al. 1994; Larralde et al. 1995).

The mechanisms involved in parasite-restrictive immunity to murine *T. crassiceps* cysticercosis are currently known to be associated with T cell responses. Initial characterization revealed that neonatal thymectomy of mice greatly increases susceptibility to *T. crassiceps* infection and T cell replacement restores it to normal levels (Bojalil et al. 1993), whilst the bulk of anti-parasite antibodies does not clearly relate with protection and might may even enhance

parasite growth (Hermánek and Prokopic 1989; Kunz et al. 1991). Recent evidence indicates that experimentally infected mice develop an early Th1-type immune response, concomitantly with a limited parasite growth. Later, the immune response is progressively polarized towards a Th2-type response, at times when a significant increase of the number of parasites is noted. At this late infection there is a reduced cellular immune response to *T. crassiceps* soluble antigens accompanied with an elevated production of IL-10, IL-6, IL-4, and also of IgG1 and IgG2b anti-cysticerci antibodies (Terrazas et al. 1998). These findings have been taken to indicate that Th1-type response associates with resistance and that Th2-type response is irrelevant or favors parasite growth. Pointing in the same direction, it has been recently reported that the granulomas surrounding dying *T. crassiceps* cysticerci present higher levels of IFN- γ and IL-2 than of IL-4 and IL-10 (Robinson et al. 1997). The precise contribution of different T-helper (Th) or T-cytotoxic cell subsets and the role of specific cytokines produced by these cells in anti-cysticercosis immunity is not yet explored and the idea of a Th1 to Th2 shift as of significance for the outcome of infection needs to be further tested.

In order to explore the role played by several cytokines in the development of *T. crassiceps* infection, experiments were performed to assess modifications on parasite burdens of *T. crassiceps* induced by early supplementation with recombinant murine (rm) cytokines of Th1 or Th2-type. Modifications on parasite burdens were also explored using an initial and transient treatment with monoclonal antibodies against the same cytokines.

Materials and methods

Mice

Female Inbred BALB/c mice, originally purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) in 1982, were used in this study; they have been maintained and reproduced in our animal facilities for more than 20 generations.

Parasites

Metacestodes of *T. crassiceps* (ORF) used in this study were harvested from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2-4 months of infection. The cysticerci were washed 4 times in phosphate-buffered saline (PBS) (0.15M NaCl, 0.01M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and selected for infection of mice or immediately centrifuged at 45,700 g for 1 hr at 4 °C to obtain their vesicular fluid as source of antigen. The supernatant fraction, consisting mainly of vesicular fluid was collected and its protein concentration measured by Lowry's method (Lowry et al. 1951) and frozen at -70 °C until used. This supernatant fraction served as antigen for serum antibody detection by enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) or for antigen-induced proliferation.

Treatments

At the moment of infection, 5 mice per group were inoculated i.p. with A) 50 µg/mouse of anti-IFN-γ monoclonal antibody (Genzyme, Cambridge Ma.), B) 50 µg/mouse of anti-IL-10 or C) 50 µg/mouse of anti-IL-4 (Genzyme), only once. These monoclonal antibodies have a half-life of 2 weeks according to manufacturers. Rat IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used as IgG control antibody

Other groups of mice (5 per group) were treated i.p. at the moment of infection and daily during the first week of infection with recombinant murine cytokines: A) IFN-γ + IL-2 (50 ng and 5

U/mouse, respectively), B) IL-10 (50 ng/mouse), or C) IL-4 (50 ng/mouse) in PBS-BSA 3%.

All cytokines were purchased from Pharmingen, San Francisco, CAL, USA. Control mice in this experiment received only PBS-BSA 3%.

Infections

Experimental infections were achieved by intraperitoneal injection of each mouse with 10 small (ca. 2 mm diameter) non-budding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 ml PBS obtained as described above. Resulting individual intensities of infection (number of parasites in each mouse) were measured at four weeks after infection, when mice were killed and their peritoneal cavity opened, and the number of cysticerci found inside were counted.

Cell preparations and culture conditions

Mice were bled by cardiac puncture and subsequently killed by cervical dislocation. Spleens were removed in sterile conditions from infected and control mice, and splenic cells were obtained by mincing and filtering, washed and resuspended in culture medium made of RPMI 1640 (GIBCO BRL, Grand Island, New York) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO BRL), 100 units of penicillin/streptomycin, 2mM glutamine, 25 mM HEPES buffer, 1% non essential aminoacids (GIBCO BRL). Splenocytes were adjusted to 5×10^6 cells/ml in this medium. One-hundred μ l of the cell suspensions were then placed into 96-well flat bottom culture plates (Costar, Cambridge, Massachusetts) and stimulated with concanavalin-A ($2\mu\text{g/ml}$) (Sigma, St. Louis Missouri); plates were incubated at 37 C and 5% CO₂ during 72 hr. Eighteen hr prior to culture termination, 0.5 μCi of tritiated thymidine (methyl-3H TDR, sp. act. 247.9 GBq/mmol, NEN, Boston, Massachusetts) was added to each well. After further incubation for 18 hr, splenocytes were harvested onto glass filter papers and processed for liquid scintillation counting. Cells from the same animals were processed by antigen-induced proliferation, antigen was added

in 20 μ l of RPMI-1640, to give a final concentration of 50 μ g/ml (optimal concentration) and cultures were incubated by 6 days and processed as mentioned above.

Evaluation of cytokine production in vitro

Single cell suspensions of splenocytes prepared as described above were diluted in 10% FBS-supplemented RPMI-1640 to give 5×10^6 cells/ml. Volumes of 1 ml of final cells suspensions were placed in each well of a 24-well plate (Costar) and incubated with 2 μ g/ml of Con-A for 24 hr at 37 C and 5% CO₂. After centrifugation, the supernatants were collected, aliquoted, and stored at -20 C until used. An aliquot of the same cell suspensions was stimulated with 50 μ g/ml of specific antigen during 72 hr, and supernatants were processed as mentioned above. Basal levels (non-stimulated) of all cultures were measured.

The cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, and IL-10 were measured by sandwich ELISA using methods according to manufacturers instructions (PharMingen). The pairs of cytokine-specific monoclonal antibodies and recombinant cytokines were all obtained from PharMingen.

Antibody subclasses detection

Sera obtained from normal and infected mice were diluted 1:100 and analyzed for specific anti-cysticerci antibodies by ELISA. IgG isotypes were detected using monoclonal antibodies to IgG2a, IgG2b and IgG1, diluted 1:1000 (Zymed, San Diego, California). Reactions were revealed with ABTS-solution (Zymed).

Statistical analysis

The statistical significance of the effects of the experimental variables upon parasite intensities and immunological parameters were determined by nonparametric test Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank.

Results

Effect of anti-cytokines (IFN- γ , IL-10, IL-4) monoclonal antibodies on susceptibility and immune response to *T. crassiceps*. As shown in figure 1, parasite burden in mice treated with anti-IL-10 was significantly reduced ($P < 0.01$) compared with control (non-specific IgG-treated) mice. The treatment with anti-IL-4 did not induce any reduction in parasite load, whereas mice treated with anti-IFN- γ presented a significantly higher susceptibility (aprox. 90%, $P < 0.01$) to *T. crassiceps* infection than control mice.

The immune function was evaluated in splenocytes and in sera from all groups. The proliferative responses to Con-A and specific antigens were decreased in infected control (IgG-treated) mice, as has been reported previously (Villa and Khun 1996; Terrazas et al. 1998). However, treatment with anti-IL-10 generated a significant increase in the proliferative ability to both stimuli (Fig. 2), whereas mice receiving anti-IFN- γ presented the lowest responses to these stimuli. On the other hand, cytokines produced in response to Con-A did not have a clear correlation with the level of infection; for example, IL-4 was detected at the same concentrations in all the groups treated with anti-cytokine antibodies (data not shown). The IL-2 production was significantly reduced in all infected groups, being the group treated with anti-IFN- γ the most affected one (Fig. 3). The IFN- γ levels were not modified in both anti-IL-10 and anti-IFN- γ treated mice and were maintained at lower levels compared with normal. The IL-10 levels after 4 wk of infection were non-significantly reduced in anti-IL-10 treated mice, however, discrete but significant higher levels of this cytokine were found in anti-IFN- γ treated mice (Fig. 3).

The production of distinct isotypes of IgG antibodies have been related with Th-1 type or Th2-type responses, IgG2a has been associated with a Th1-type immune response (Snapper and Paul 1987), whereas IgG2b and IgG1 have been associated with a Th2-type response. Previous

results (Villa and Khun 1996; Terrazas et al 1998) indicate that IgG1 is the most prominent antibody found in advanced infections with *T. crassiceps*, here we confirm this finding (Table I). However, when mice were treated with anti-IL-10 (Table I) or anti-IL-4 (data not shown) we found a diminished production in this class of antibody. In contrast, when mice were treated with anti-IFN- γ the IgG1 production was maintained elevated, whereas the specific IgG2a production was down-regulated (Table I). The ratio IgG1:IgG2a has been recently proposed as a measurement of polarization of the immune response (Romagnani 1997), in our results it was in all cases inclined towards the Th2-type antibody, thus in control mice the ratio IgG1:IgG2a was 5.03, whereas in anti-IL-10 and anti-IFN- γ treated mice it was 1.88 and 6.37, respectively (Table I).

Effect of recombinant cytokines on susceptibility and immune response against *T. crassiceps* cysticercosis. Next we determined the influence of an early in vivo treatment with some type-1 or type-2 cytokines on susceptible BALB/c mice when infected with *T. crassiceps*. The parasite burden was dramatically affected by the early treatment with rm IFN- γ +IL-2, which generated a significant reduction (85%) in the number of parasites found in the peritoneum (Fig. 4, $P < 0.01$). In contrast, the early treatment with rm IL-10, generated a significant increment in parasite intensity (66%, $P < 0.01$). On the other hand, the treatment with rm IL-4 did not modify the susceptibility to *T. crassiceps*.

The ability to respond to Con-A was significantly increased in the splenocytes from mice receiving rmIFN- γ +IL-2 treatment, whereas mice treated with rmIL-10 showed a non significant modification in this response (Fig.5).

Splenocytes from PBS-BSA-treated infected mice (control) and IL-10 treated mice produced significantly smaller amounts of IL-2 than healthy mice ($P < 0.05$, Figure 6); those treated with rmIFN- γ +IL-2 modify slightly their IL-2 levels losing significance with respect to normal

mice. The IL-4 production was not modified by any treatment (data not shown). In contrast, IFN- γ production was significantly increased in rmIFN- γ +IL-2 treated mice (Fig. 6).

The specific-antibody response was also modified with the different treatments. IgG2a was significantly elevated in mice treated with rmIFN- γ + rmIL-2 compared with the control parasitized mice. In contrast, the IgG1 and IgG2b levels were significantly down-regulated with this treatment ($P < 0.02$, Table I). The early injection of rm IL-4 (data not shown) or IL-10 maintained the production of IgG1 and IgG2b, without affecting significantly the production of IgG2a. The ratio IgG1:IgG2a favored to IgG1 in control and IL-10 treated mice, in contrast the treatment with rmIFN- γ +IL-2 shifted this ratio from 7.85 in control mice to 0.47 (Table I).

Discussion

The establishment in mice of the *T. crassiceps* cysticerci is accompanied by a complex interaction between the parasite products and the host's immune response that determines the final outcome of the confrontation. The immunological mechanisms involved in resistance and susceptibility in murine cysticercosis have been emerging recently. T cell-associated immune responses appear to mediate protection against the metacestode stage of the parasite (Bojalil et al. 1993), whereas humoral immunity participation in the control of this infection is now in doubt (Hermánek and Prokopic 1989). Furthermore, in the kinetics of the immune response against murine *T. crassiceps* cysticercosis a polarization towards a Th2-type immune response as infection progresses has been described. The shift appears to facilitate the definitive establishment and multiplication of the parasite (Villa and Khun 1996; Terrazas et al. 1998). These previous studies led us to hypothesize that Th1-type immune response was involved in resistance to *T. crassiceps* and that a Th2-type response facilitates the infection.

Because exogenous cytokines when administered at the beginning of an infection or antigenic stimuli can change the development of the immune response (Constant and Bottomly 1997) and modulate the outcome of several parasitic infections (Chensue et al. 1994; Afonso et al. 1994; Rotman et al. 1997) we set out to examine the roles of Th1 and Th2-type cytokines in early stages of murine infection with *T. crassiceps* as ways of testing our hypothesis on the roles of Th1 and Th2 upon cysticercosis infection. We first measured the parasite load in response to an early in vivo treatment with monoclonal anti-IL-10, anti-IL-4 or anti-IFN- γ antibodies, as well as in response to administration of the same recombinant cytokines. We found a significant reduction in the parasite burden of *T. crassiceps* cysticerci after an early treatment with anti-IL-10 and similar striking results when IFN- γ plus IL-2 were administered. That a Th1-type immune response was

stimulated by these treatments is indicated by the improvement in the splenocytes' proliferative response to specific antigens and Con-A, a greater production of IFN- γ and IL-2, higher levels of IgG2a, decreased levels of IgG1 and IgG2b anti-cysticerci antibodies and a reduction in the ratio of IgG1/IgG2a, all Th1 promoted functions (Snapper and Paul 1987; Mosmann and Coffman 1989). In contrast, the treatment with anti-IFN- γ or with rmIL-10 induced a significant increase in susceptibility to this parasite, generating high levels of IL-10, down-regulating the IFN- γ activity and the proliferative response to specific antigens and Con-A by splenocytes, whilst high levels of IgG1 and IgG2b anti-cysticerci antibodies were detected in serum, all Th2 promoted functions.

The role of IL-4 in this infection was not found of relevance, as treatment with both anti-IL-4 and rm IL-4 did not modify the parasite intensity. Thus, our results support the idea that endogenous IFN- γ and IL-2 at early stages of infection by *T. crassiceps* are crucial cytokines in controlling cysticercosis infection, whereas IL-10 appears to favor parasite establishment. IFN- γ and IL-2 could control the early steps of the parasite's establishment by activating effector cells, thereby allowing mice to inhibit parasite multiplication. By the contrary, appearance of IL-10 would down-regulate the activation of Th1 cells mediated by IFN- γ and IL-2. We do not know whether this dynamic process is mounted or not in the natural infection by peroral uptake of *T. crassiceps* eggs, or if this immune response affects the postoncospherical development since our experimental model only reflect the cysticerci stage.

The evolution of several parasitic infections in murine models, and to some extent in humans, has been associated with the development of Th1- or Th2-type immune responses. In most instances, Th1 responses appear to restrict intracellular parasites (Sher and Coffman 1992), and Th2 responses seem to be more efficient against some intestinal parasites, as has been shown for *Trichuris muris* (Else and Grencis 1991), *Necator americanus* (Pritchard 1995), and

Strongyloides stercoralis (Rotman et al. 1997). This has prompted the notion that Th2-type immune responses evolved to protect not only against helminths but also against extracellular parasites as a whole (Reiner and Locksley 1993; Pearce and Reiner 1995). Although Th2-type responses undoubtedly protect against some extracellular parasites (Finkelman et al. 1997), there is increasing evidence that this is not the case for all of them (Lawrence et al. 1995; Allen and Maizels 1997). Our data demonstrate this for *T. crassiceps* cysticercosis, and support other previous results (Villa and Khun 1996; Robinson et al. 1997; Terrazas et al. 1998). Thus, the generation of a Th1-type immune response appears necessary to protect against experimental murine cysticercosis infection, an extracellular parasitic disease.

A previously reported example in which a Th1-type response is also restrictive against an extracellular parasite is infection by *Schistosoma mansoni*, where immunoprotection requires IFN- γ -activated cells (Wynn et al. 1994). In this case the inhibition of protective immunity is related to Th2 derived cytokines, where IL-4 and IL-10 play a major role inhibiting the expansion/activation and effector functions of IL-2 and IFN- γ -producing Th1 cells (Kopf et al. 1993; Chensue et al. 1994). In a similar fashion this Th2 mediated Th1 down-regulation seems to be operative in *T. crassiceps* cysticercosis.

In conclusion, our results support the view that Th1-type immune response is restrictive of parasite growth in *T. crassiceps* cysticercosis and the shifting to a Th2-type response ablates immunoprotection and promotes parasite establishment. These findings indicate the importance of using appropriate immunization strategies in order to induce the correct T-helper cell set (Th1) when developing vaccines against cysticercosis.

Acknowledgements This work was partially supported by grants 0535P-M9506 from CONACYT and IN210397 from PAPIIT-UNAM.

References

- Afonso LCC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P (1994) The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263:235-237.
- Allen JE and Maizels RM (1997) Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today* 18:387-392.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C (1993) Thymus-related cellular immune mechanisms in sex associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 79:384-389.
- Chensue SW, Warmington KS, Ruth J, Lincoln OM, Kunkel SL (1994) Cross-regulatory role of interferon gamma, IL-4 e IL-10 in schistosoma egg granuloma formation: in vivo regulation of TH activity and inflammation. *Clin Exp Immunol* 93: 395-400.
- Constant SL, Bottomly K (1997) Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Ann Rev Immunol* 15:297-322.
- Cox FEG, Liew FY (1992) T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunol Today* 13:445-448.
- Else KJ, Grensis PK (1991) Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential cytokine production during a acute or chronic infection. *Immunol* 72:508-513.
- Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC, Urban JF (1997) Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from studies with rodent models. *Ann Rev Immunol* 15:505-533.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciutto E (1998) Increased resistance

- to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 66:760-764.
- Hermánek J, Prokopic J (1989) Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. *Folia Parasitologica* 36:331-340.
- Kopf M, Le Gros G, Bauchmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G (1993) Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362:245-249.
- Kunz J, Baumeister S, Dennis R, Kuytz B, Wiegandt H and Geyer E (1991) Immunological recognition of larval *Taenia crassiceps* glycolipids by sera from parasite-infected mice. *Parasitol Res* 77:443-447.
- Irralalde C, Morales J, Terrazas LI, Govezensky T, Romano M (1995) Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:575-581.
- Lawrence RA, Allen JE, Gregory WF, Kopf M, Maizels RM (1995) Infection of IL-4- deficient mice with parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response. *J Immunol* 154:5995-6001.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Mosmann TR, Coffman RL (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann Rev Immunol* 7:145-173.
- Pearce EJ, Reiner SL (1995) Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Cur Op Immunol* 7:497-504.
- Pritchard DI (1995) The survival strategies of hookworms. *Parasitol Today* 11:255-259.

- Reiner SL, Locksley RM (1993) The worm and the protozoa: Stereotyped responses or distinct antigens? *Parasitol Today* 9:258-260.
- Reiner SL, Locksley RM (1995) The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* 13:151-177.
- Robinson P, Atmar LR, Lewis DE, Clinton White Jr. A (1997) Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 66:2925-2931.
- Romagnani S (1997) *The Th1/Th2 paradigm in disease*. Chapman and Hall, Canada.
- Rotman HL, Schnyder-Candrian S, Scott P, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D (1997) IL-12 eliminates the Th-2 dependent protective immune response of mice to larval *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol* 19:29-39.
- Sher A, Coffinan RL (1992) Regulation and immunity to parasites by T cells and T-cell derived cytokines. *Ann Rev Immunol* 10:385-400.
- Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KH, Anderson D, Reed SG (1992) Interleukin 10 and interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 175:169-174.
- Snapper CM, Paul WE (1987) Interferon- γ and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236: 944-947.
- Stevenson MM, Tam F (1993) Differential induction of helper T cell subsets during blood stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant end susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 92:77-83.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1994) A role for 17- β estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 80:553-558.

- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early restrictive Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84:74-81.
- Villa OF, Kuhn RE (1996) Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitol* 112:561-570.
- Wynn TA, Eltoun I, Oswald IP, Cheever AW, 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. *J Exp Med* 179: 1551-1561.

Legends

Figure 1.- Effect of anti IL-4, anti IL-10 and anti IFN- γ monoclonal antibodies (Ab) on susceptibility to *T. crassiceps* cysticerci. Cytokines were neutralized by antibody treatment at the time of infection. Mean \pm SE of cysticerci recovery. n = 5 mice per group. *P<0.02, compared with control (IgG-treated) mice.

Figure 2.- Effect of monoclonal antibodies treatment on cellular proliferative response in mice infected with *T. crassiceps*. Proliferative splenocytes' response to both specific antigen (A) and Con-A (B) is high in anti-IL-10 treated mice with respect to control (*P<0.05). Values shown are the mean \pm SE of 5 mice per group.

Figure 3.- Cytokine production by splenocytes from anti-IL-10 or anti-IFN- γ treated and untreated mice in response to Con-A. Values were found by ELISA four weeks after infection with *T. crassiceps*. n= 5 mice per group, values shown are the mean \pm SE. *P<0.05 with respect to normal group (non-parasitized mice); **P<0.05 compared with control group (IgG-treated and parasitized mice).

Figure 4.- Effect of administering rmlL-4, rmlL-10 and rmlIFN- γ +IL-2 on susceptibility to *T. crassiceps* cysticercosis. Groups of animals were injected i.p. daily for one week after infection. Mean \pm SE of cysticerci recovery four weeks after infection. n= 5 mice per group. *P<0.05, **P<0.005 compared with control mice (PBS-BSA-treated).

Figure 5.- Effect of recombinant murine cytokines on the proliferative response to Con-A of splenocytes from mice infected with *T. crassiceps*. Treatment with rmlIFN- γ +IL-2 improves significantly this response. n= 5 mice per group, values shown are the mean \pm SE. *P<0.05 compared with control group.

Figure 6.- Splenocytes' production of IL-2 and IFN- γ in response to Con-A, effect of treatment with recombinant murine cytokines four weeks after infection with *T. crassiceps*. Treatment with IFN- γ +IL-2 increase the IFN- γ production. Mean \pm SE, *P<0.05 compared to normal mice; **P<0.05 with respect to control mice.

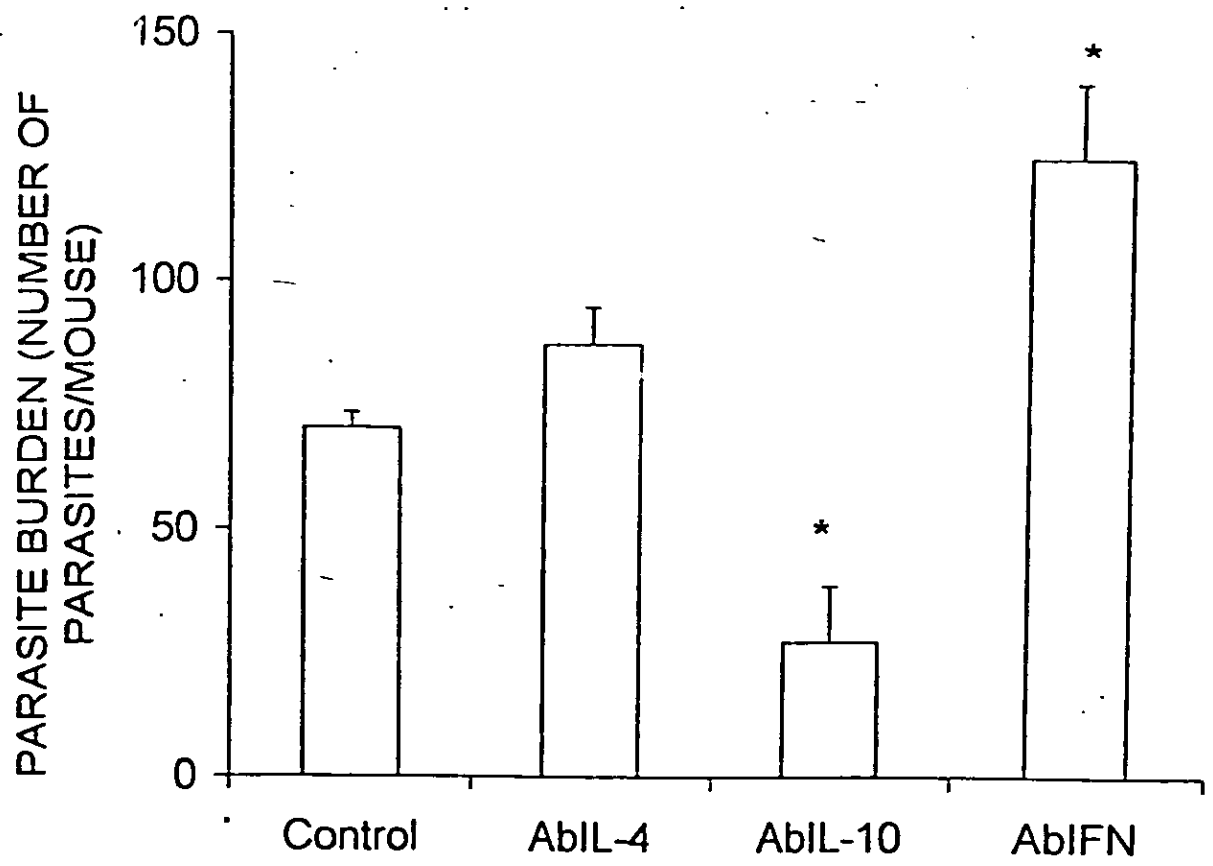
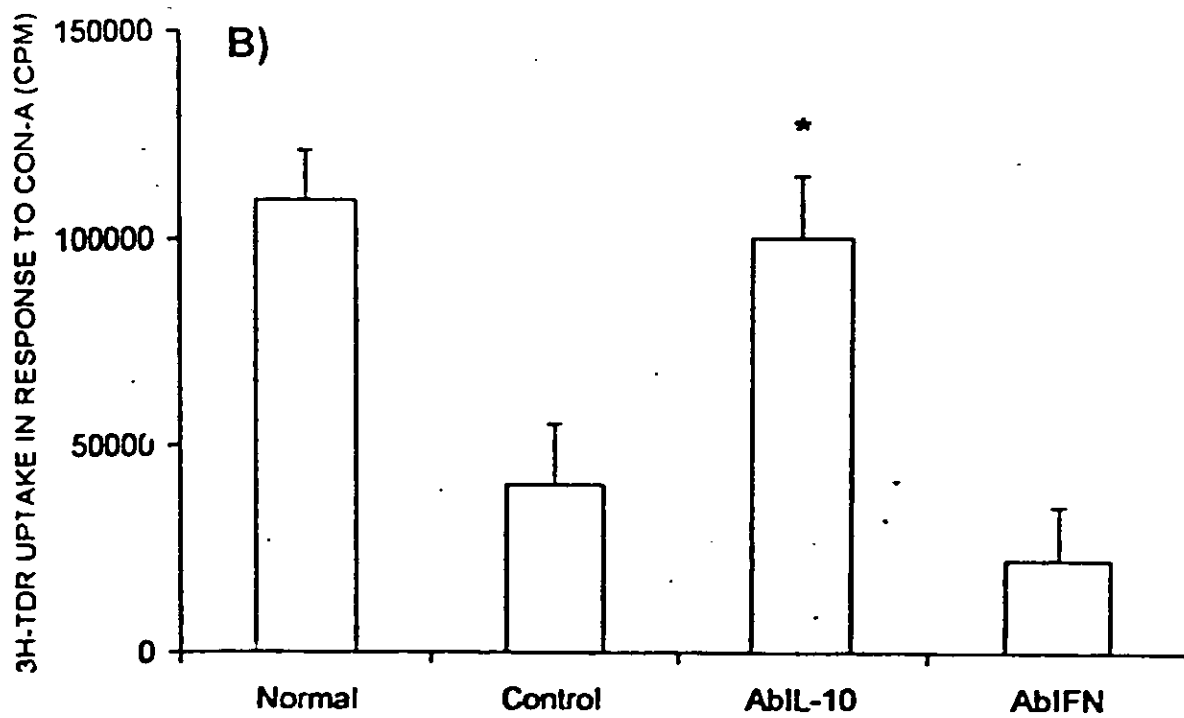
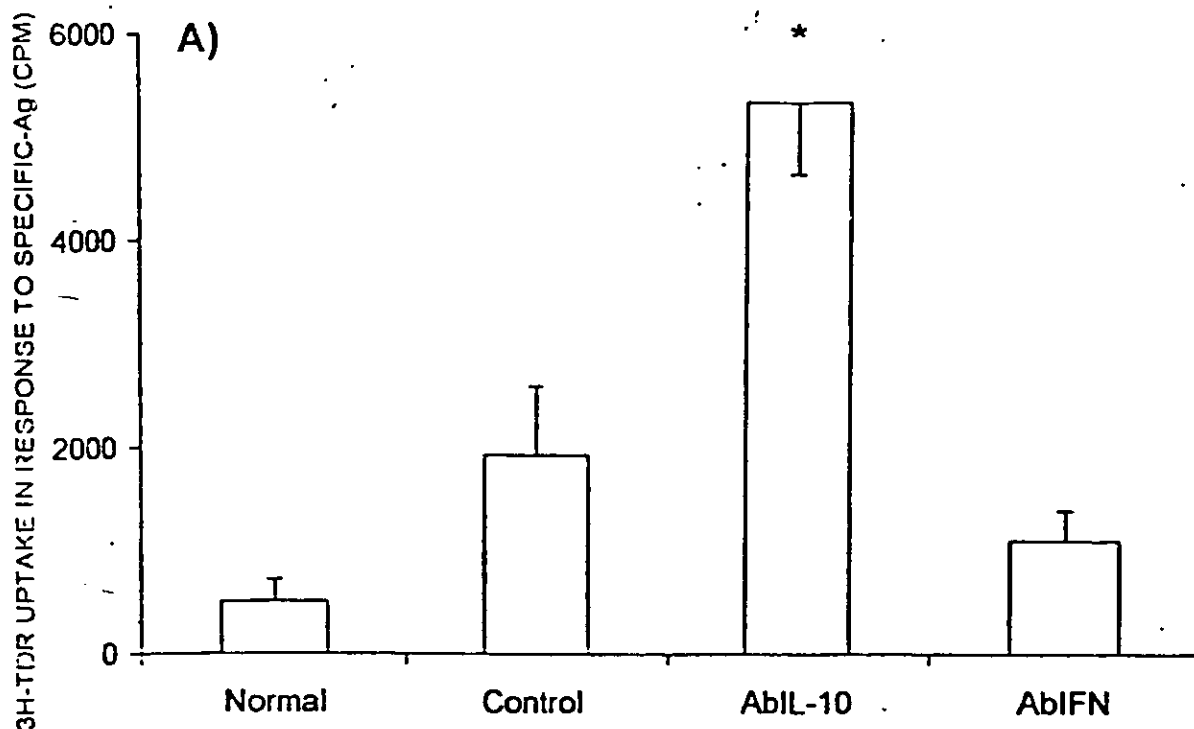


FIGURA 1

FIGURA 2



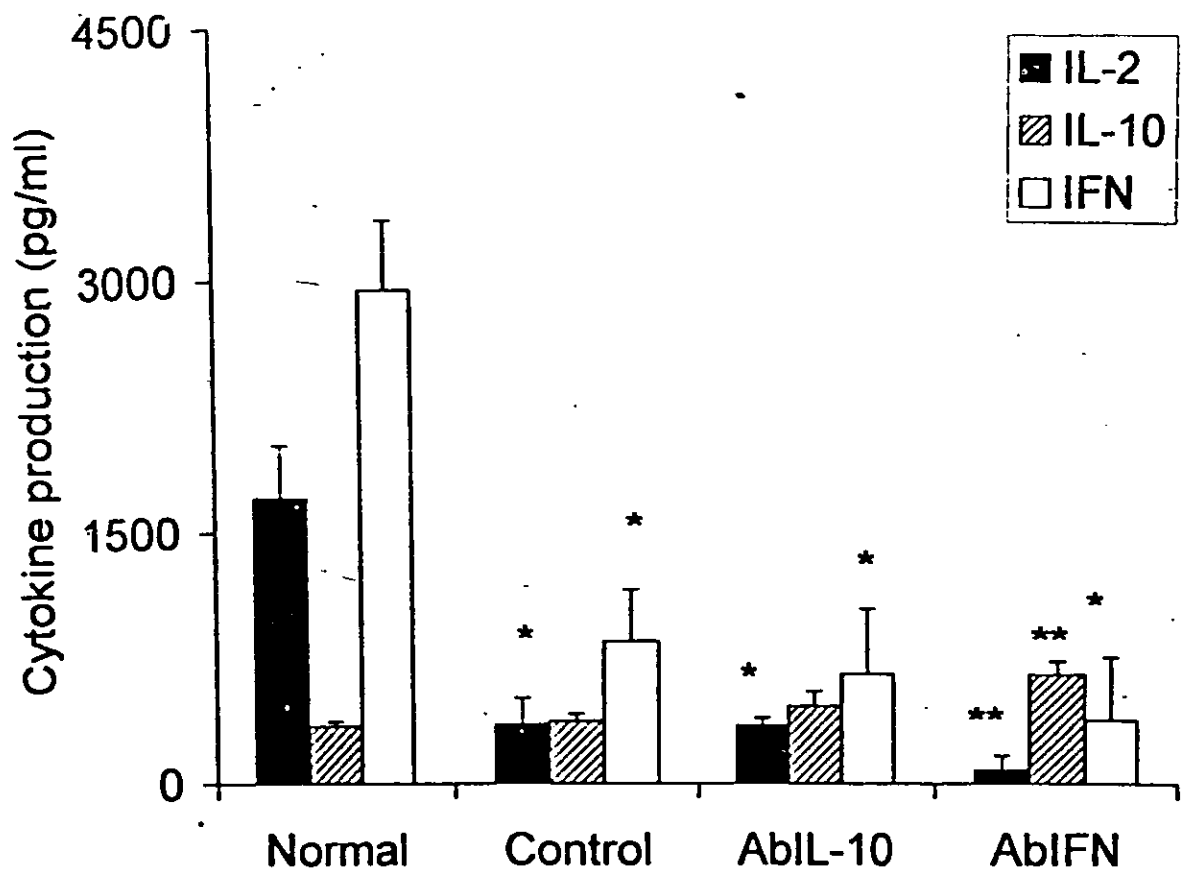


FIGURA 3

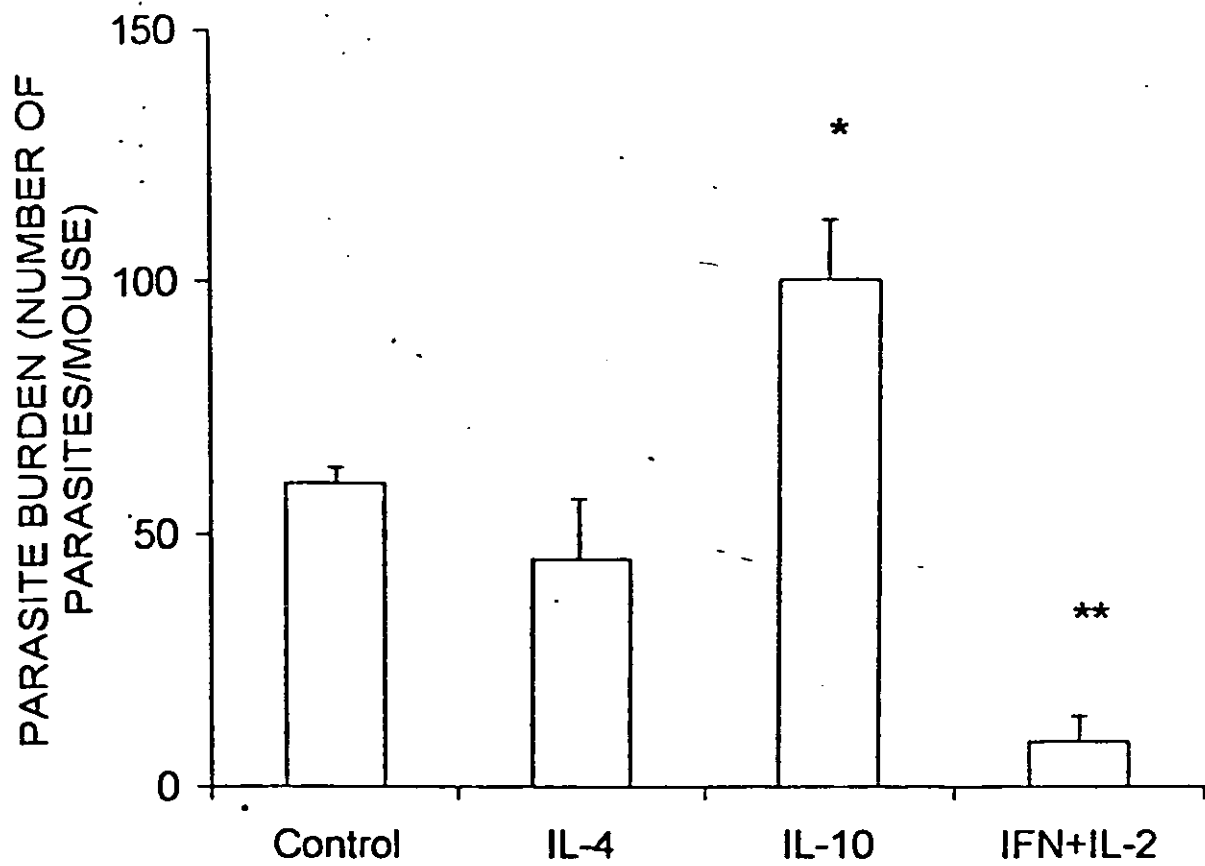


FIGURA 4

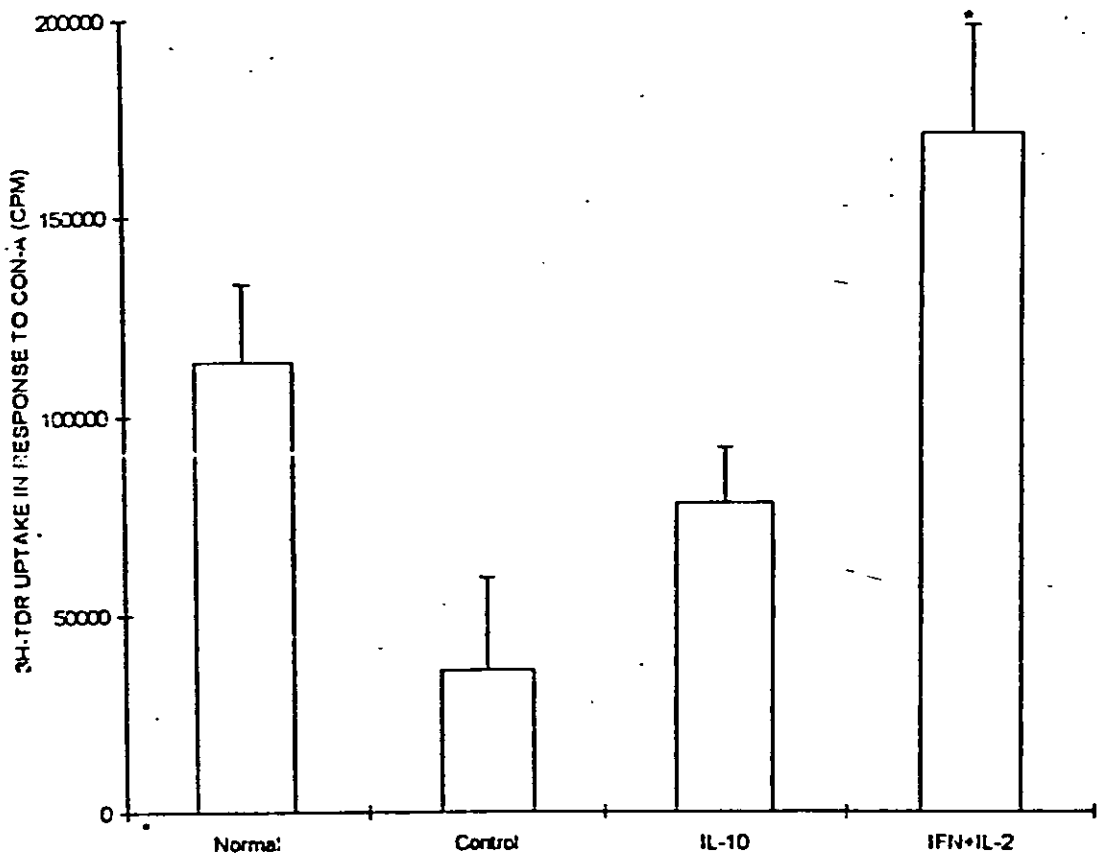


FIGURA 5

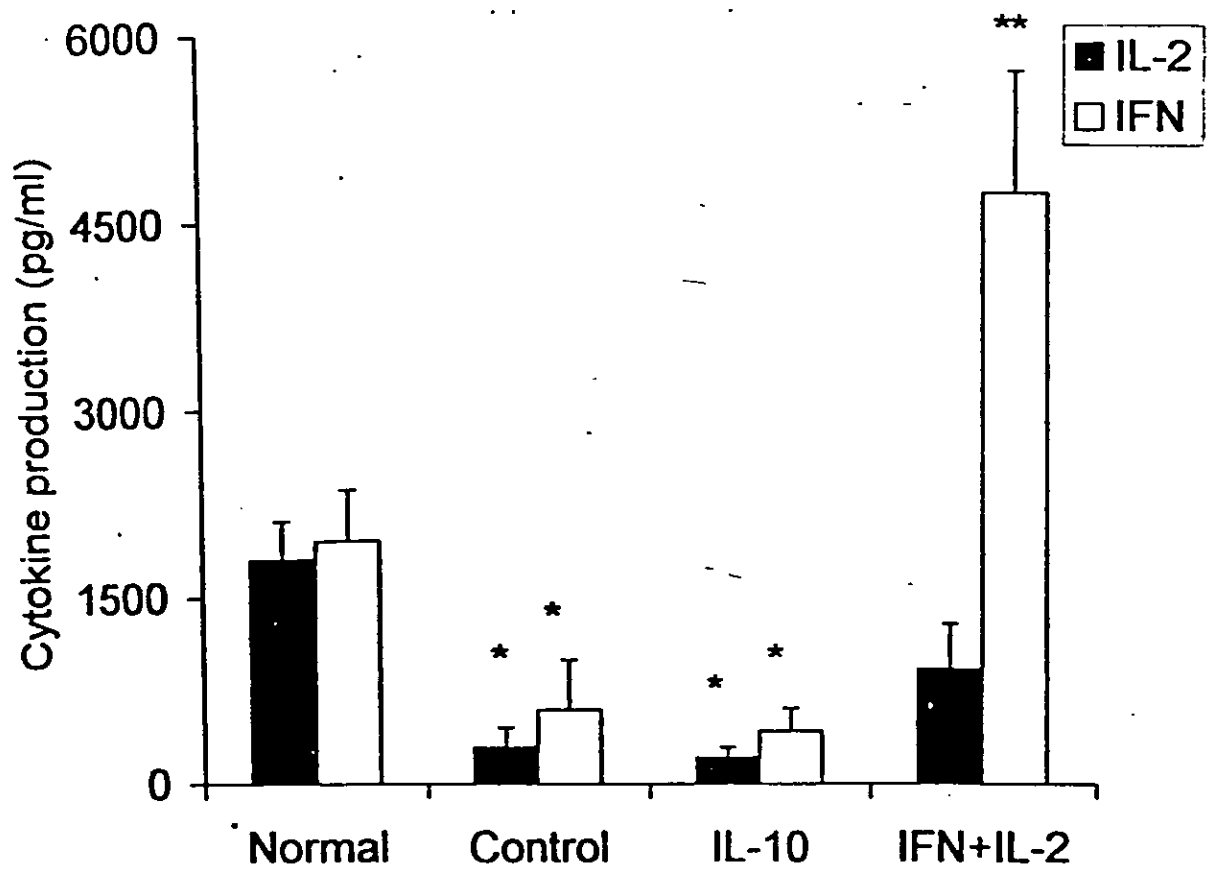


FIGURA 6

TABLE 1. Effects of anti-cytokine monoclonal antibodies and recombinant cytokines treatments upon specific IgG1, IgG2b, IgG2a antibody production and IgG1:IgG2a ratio in mice experimentally infected by *Taenia crassiceps*.

| Treatment | IgG1 | IgG2b | IgG2a | IgG1:IgG2a ratio |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|------------------|
| Control (IgG-treated) | 0.803 ± 0.16 | ND | 0.155 ± 0.02 | 5.03 |
| α-IL-10 | 0.466 ± 0.19 | ND | 0.225 ± 0.05 | 1.88 |
| α-IFN-γ | 0.725 ± 0.06 | ND | 0.122 ± 0.03 | 6.37 |
| Control (PIJS-BSA) | 0.903 ± 0.23 | 0.821 ± 0.21 | 0.115 ± 0.01 | 7.85 |
| rm IL-10 | 0.445 ± 0.13 | 0.599 ± 0.09 | 0.164 ± 0.03 | 2.52 |
| rm IFN-γ+IL-2 | 0.172 ± 0.02* | 0.245 ± 0.04* | 0.365 ± 0.06* | 0.47 |

Data represent mean of optical density reading in ELISA lector (405 nm) ± SE. * p<0.02 compared with control mice.

ND= not determined. n= 5 mice per group.

TAENIA CRASSICEPS: ROLE OF PROSTAGLANDIN E2 IN SUSCEPTIBILITY TO MURINE CYSTICERCOSIS

L. I. TERRAZAS¹, R. BOJALIL^{2,4}, T. GOVEZENSKY³ AND C. LARRALDE³

1.-Department of Biology, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Ciudad Universitaria, México D.F. 04510

2.-Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano No. 1. Col. Sección XVI, Tlalpan, México, D.F. 14080

3.- Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F. 04510

4.- Department of Health Attention, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Running Head: Effect of PGE2 on host susceptibility in cysticercosis

Corresponding author:

Luis Ignacio Terrazas. Dept. of Biology, Laboratory 202, Edificio B, Facultad de Química, UNAM. México, D.F. 04510 México. Phone: (525) 622 3098; Fax (525) 616 2010

ABSTRACT

Several biological factors are involved in susceptibility and resistance to murine cysticercosis. Here we evaluated the role played by prostaglandin E2 in this parasitic disease. Mice were treated in vivo with prostaglandin E2 or with indomethacin (an inhibitor of prostaglandin E2 synthesis) before infection. Parasite growth was significantly enhanced by PGE2 treatment associated with a low Con-A response and IL-2 production. High levels of IL-6 and IL-10 were detected in splenocytes supernatants cultures from parasitized mice. Whereas mice receiving indomethacin treatment showed an inhibition in parasite growth, that associates with an energetic Con-A response and higher levels of IL-2, parallel to a decrease in IL-6 and IL-10 production. In vitro studies indicate that the major source of PGE2 production could be the macrophages.

INDEX DESCRIPTORS AND ABBREVIATIONS.- *Taenia crassiceps*, cysticercosis, cestoda, cytokines, prostaglandin E2 and susceptibility. Prostaglandin E2 (PGE2), interleukin (IL).

INTRODUCTION

Experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis has been used as a laboratory model in which to study the participation of immunological, genetical and gender associated factors of resistance and susceptibility. This model has been useful for demonstrating important biological factors involved in the outcome of infection by *T. crassiceps* such as differences in susceptibility, mediated through the expression of the nonclassic class I MHC Qa-2 antigen (Fragoso et al. 1998), and related to the hormonal environment where 17- β -estradiol is permissive whereas androgens appear restrictive of parasite growth (Terrazas et al. 1994; Larralde et al. 1995).

The mechanisms involved in parasite-restrictive immunity to murine *T. crassiceps* cysticercosis are currently known to be associated with T cell responses. Recent evidence indicates that experimentally infected mice develop an early Th1-type immune response, concomitantly with a limited parasite growth. Later, the immune response is progressively polarized towards a Th2-type response, at times when a significant increase of the number of parasites is noted (Terrazas et al. 1998a). These findings have been taken to indicate that Th1-type response associates with resistance and that Th2-type response is irrelevant or favors parasite growth (Robinson et al. 1997; Terrazas et al. 1998b). However, the precise contribution of different factors involved in the Th1 to Th2 shift in cysticercosis immunity has not yet been explored.

It is well known that a number of diverse parasitic species such as *Toxoplasma* (Susuki and Kobayashi 1981), *Plasmodium* (Mshana et al. 1990; McLean and Boulandi 1990), *Trypanosoma* (Silva et al. 1992), *Schistosoma* (Yamashita and Boros 1990; Wilson 1993) and *Leishmania* (Proudfoot et al. 1995) exert an immunomodulatory activity causing potentially host-protective effector responses to be down-regulated. These anomalies are related to disturbances in the production and utilization of IL-2, to activation of CD8⁺ suppressor T cells and to the generation of indomethacin sensitive suppressor mechanisms. Recently a number of regulatory factors were

described as having the capacity to block macrophage functions. These molecules also termed "macrophages-deactivating factors" include prostaglandins of the E series, TGF- β , IL-4 and IL-10 (Strassmann et al. 1994). In cysticercosis by *T. crassiceps* and *T. solium*, the mechanisms employed to evade host immunity are still poorly understood (Flisser et al. 1991; Lacleste et al. 1992), but in murine cysticercosis IL-10, but not IL-4, has been found with a decreased resistance to infection (Terrazas et al. 1998b). The roles of TGF- β and PGE2 have not been studied for this infection.

PGE2 is the major product of arachidonic metabolism by antigen presenting cells such as macrophages (Edwards et al. 1986). In the immune system it is well documented that PGE2 acts as an immunomodulator promoting down-regulation of T-cell functions such as IL-2 and IFN- γ production (Hilkens et al. 1995), inhibiting the production of IL-12 and TNF- α by activated macrophages (Strassmann et al. 1994) and suppressing natural killer activity (Goto et al. 1983) it also promotes Th2-type responses (Parker et al. 1995).

In the present work, we have evaluated the in vivo effects of both PGE2 and indomethacin (an inhibitor of PGE2) on resistance to murine cysticercosis and on some immunological parameters.

MATERIALS AND METHODS

Mice. Inbred BALB/c female mice, originally from Jackson Laboratories (Bar, Harbor Maine) in 1982, were used in this study; they have been maintained in controlled conditions at our animal facilities for more than 20 generations.

Parasites. Metacystodes of *T. crassiceps* (ORF strain) were used in this study. They were harvested from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2-4 mo of infection. The cysticerci were processed as described elsewhere (Terrazas et al. 1994).

Infections. Experimental infections were achieved by intraperitoneal injection of each mouse with 10 small (ca. 2 mm diameter) non-budding cysticerci of *T. crassiceps* suspended in 0.3 ml PBS. Resulting individual intensities of infection were measured at 4 wk after infection.

Cell preparations and culture conditions. Mice were killed by cervical dislocation. Spleens were removed from infected and control mice, cells were obtained, washed and resuspended in culture medium made of RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 10,000 units of penicillin/streptomycin, 2mM glutamine, 25 mM HEPES buffer, 1% non essential aminoacids (ICN). Splenocytes were resuspended to 5×10^6 cells/ml in this medium. One hundred microliters of the cell suspensions were then placed into 96-well flat bottom culture plates (Costar, Cambridge, Ma.) and stimulated with 100 μ l of concanavalin-A (Sigma, St Louis Missouri) mitogen solution (2 μ g/ml) and plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ during 72 hr. Eighteen hours prior to termination each well received 0.5 μ Ci of tritiated thymidine (methyl-³H TDR, sp. act. 247.9 GBq/mmol. NEN, Boston, Ma.). After further incubations for 18 hr, cells were harvested onto glass filter papers and processed for liquid scintillation counting.

Effect of Indomethacin and Prostaglandin E₂ (PGE₂) *in vivo*. Mice received indomethacin, PGE₂ or placebo *in vivo* two days prior-infection. They were delivered in the form of subcutaneous 3-weeks controlled dose-dependent release rate pellets (Innovative Research of

America, Toledo, Oh). Doses of indomethacin was 0.5 mg/pellet, and PGE2 100 µg/pellet.

Twenty-one days after the implantation of the pellets all mice received a second pellet of the same dose according at treatment to maintain levels of indomethacin or PGE2 for another week. All animals of these experiments were killed at 4 weeks after infection, spleen cells were cultured and parasite load was determinate as mentioned above.

In vitro effect of indomethacin and adherent cells on proliferative response. Splenocytes from mice with 8 weeks of infection were obtained and treated as mentioned above, besides 20 µl of indomethacin (2µg/ml) were added in each well. On the other hand, adherent cells were depleted by adhering spleen cells onto polystyrene Petri culture dishes precoated with heat-inactive FBS for 2 hr at 37 °C and 5 % CO₂. Non-adherent cells were carefully collected, washed and adjusted at 5 x 10⁶ cells/ml. This cells were treated in the same manner as mentioned above, and each well received 20 µl of indomethacin (2µg/ml) and were incubated and harvested as mentioned above.

Cytokines determination. IL-2 activity was assayed with the use of CTLL-2 cells. Ten thousands cells were cultured in the presence of serially diluted supernatants and a neutralizing amount of anti-IL-4 (2µg/ml; 11.B11, Pharmingen, San Diego Ca.). During the last 8 h of the culture period of the 48 h, cells were pulsed with 0.5 mCi [³H]thymidine. Recombinant murine IL-2 (Pharmingen, San Deigo, Ca.) was used as a standard to calibration curves.

IFN-γ, IL-6 and IL-10 were determinate by ELISA, using paired monoclonal antibodies, each standard curve was performed with their respective murine recombinant cytokine. All MoAbs and recombinant cytokines were purchased from Pharmingen (San Diego, Ca.).

Statistical Analysis. The statistical significance of the effects of the experimental variables upon parasite intensities and immunological parameters were determined by nonparametric test Mann-Whitney U-Wilcoxon Rank.

RESULTS

In order to analyze the early influence of PGE₂ on susceptibility to *T. crassiceps* infection, mice were subcutaneously implanted two days before infection with a pellet containing 0.5 mg of indomethacin (an inhibitor of PG) or with a pellet containing PGE₂ (100 µg). Control mice received a placebo pellet. The effects on both parasite intensity and immune response were evaluated 4 wk later. Figure 1 demonstrates that parasite intensity in mice treated with indomethacin was significantly reduced (65 %; P<0.05) compared with control (placebo-treated) mice. In contrast, those animals receiving PGE₂ showed a significant higher susceptibility to *T. crassiceps* cysticerci compared to control animals (100%; P<0.05).

The immune response was evaluated in splenocytes from several groups. The proliferative response to Con-A was decreased in infected control (placebo-treated) mice, as has been previously reported (Villa and Khun 1996; Terrazas et. al. 1998a). In vivo treatment with PGE₂ inhibited to a greater extent the proliferative response to Con-A (P<0.05, Figure 2). However, the *in vivo* indomethacin treatment modified significantly this response towards normal values (P<0.05 with respect to control mice, Fig. 2).

The IL-2 production by splenocytes was detected by a bio-assay with CTLL-2 cells. The results shown in figure 3a are indicative that the infection by *T. crassiceps* inhibited the IL-2 production. However, IL-2 production was significantly enhanced by indomethacin treatment (Fig. 3a, P<0.05), whereas in mice receiving PGE₂ the IL-2 production was totally ablated.

The production of IL-10, IL-6 and IFN-γ were determined by ELISA. Levels of IL-10 and IL-6 produced by splenocytes were significantly greater in parasitized mice (P<0.05, figure 3c and 3d) than those obtained from healthy mice. In contrast, mice treated with indomethacin *in vivo* showed a significant reduction in IL-10 and IL-6 production (P<0.05). On the other hand, levels

of IFN- γ were not significantly affected by any treatment nevertheless they were maintained low by *T. crassiceps* infection (Fig. 3b).

To determine, indirectly, the possible source of PGE₂, studies *in vitro* were performed. Cultures of splenocytes from parasitized or healthy mice were carried out with indomethacin (2 μ g/ml) in the presence or absence of macrophages. The results obtained from these studies are shown in figure 4. Our data show that the *in vitro* inhibition of the ciclooxigenase pathway (precursor of PGE₂) by indomethacin increases significantly the response to Con-A in splenocytes from parasitized mice (Fig. 4a). Here the macrophages have an important role in the low response to Con-A observed, since when macrophages from chronically parasitized mice were withdrawn from the cultures a higher proliferative response to Con-A was detected (Fig. 4b) and no differences were observed between cultures of splenocytes from parasitized mice without macrophages and those from normal mice. Indomethacin by itself *in vitro* did not modifies the response of splenocytes to Con-A from healthy mice (Figure 4a and 4b).

DISCUSSION

Susceptibility in murine cysticercosis by *T. crassiceps* appears associated to a poor production of some cytokines, such as IL-2 and IFN- γ , and the high production of others, such as IL-6 and IL-10 (Terrazas et al. 1998a). The Th1-type cytokines point to be vital for the development of an adequate immune response at the moment of infection with the cysticerci, including recruitment, activation and proliferation of immune cells.

PGE2 is a potent inhibitor of T cell-dependent responses, such as Th1-type responses (Betz et al. 1991; Hilkens et al. 1995), IL-2 and IL-12 production (Ferreri et al. 1993; Van der Pouw Kraan et al. 1995), and has an important role in modulating the susceptibility to several intracellular parasitic diseases (Susuki and Kobayashi 1981; Tamioka and Saito 1992). In the present work, we demonstrate that treatment with PGE2 markedly increases the susceptibility to *T. crassiceps* cysticercosis, concomitantly with a substantial inhibition in both Con-A response and IL-2 production in freshly isolated splenic lymphocytes from PGE2-treated mice. That PGE2 influences the outcome of this infection was shown by the *in vivo* treatment with indomethacin (an inhibitor of the cyclooxygenase pathway and PGE2), which inhibited parasite growth; this higher resistance was associated with a strong response to Con-A and with higher IL-2 levels. This is consistent with previous reports that demonstrated that PGE2 is involved in immune regulation by inhibiting the Th1-type responses (Hilkens et al. 1995; 1996).

Based in these data we suggest that after *i.p.* infection with *T. crassiceps* cysticerci there is an increase in PGE2 production that participates down-regulating the protective immune response against this parasite, since PGE2 is known to favor Th2-type cytokine secretion (Parker et al. 1995) and inhibit the production of IL-2 and IFN- γ (Hilkens et al. 1995), two cytokines related with protection in murine cysticercosis (Terrazas et al. 1998b).

The effects of indomethacin *in vitro*, also support the hypothesis that PGE2 may play a role on both the susceptibility and the immune response to murine cysticercosis, since, when spleen cells from chronically parasitized mice were cultured in the presence of indomethacin, the resulting Con-A response was significantly improved, indicating that T cell proliferative inhibition in infected mice is indomethacin-sensitive. In addition, when macrophages were withdrawn from cultures the effect of indomethacin was ablated, suggesting that macrophages are the most likely source of PGE2 present in the splenocytes cultures.

The mechanisms that influences the PGE2 production in murine cysticercosis by *T. crassiceps* are unknown, but the chronicity of the infection could be participating, since the continuous exposition to specific antigens can modulate a greater PGE2 production, as has been observed in schistosomiasis (Wilson 1993). However, this is the first time that *in vivo* treatment with PGE2 has been directly associated with the susceptibility to an extracellular parasite. Molecules (glycolipids) that favor PGE2 production have been reported in *Mycobacterium* (Edwards et al. 1986; Barrow et al. 1993), *Leishmania* and *Schistosoma* (Velupillai and Harn, 1994). In the *T. crassiceps* cysticerci similar molecules have been observed, but their potential role to induce PGE2 production has not been-studied (Kunz et al. 1991; Baumeister et al. 1992). Here we demonstrate for the first time that PGE2 has an important role in susceptibility to murine cysticercosis and that its major source could be the macrophages. It is unknown whether these cells can produce PGE2 in response to specific glycolipids or another molecules from cysticerci, and more specific experiments are needed to clarify this point.

On the other hand, it is known that PGE2 also plays a major role in the production of Th2-type cytokines (Strassmann et al. 1994; Parker et al. 1995; Portanova et al. 1996), which have been associated with a greater susceptibility to murine cysticercosis (Terrazas et al. 1998b). Here, we observed that IL-6 and IL-10 were down-regulated during indomethacin treatment

parallel to a reduction in the parasite intensities. These results agree with recent works indicating that IL-10 and IL-6 plays a major role in the susceptibility to *T. crassiceps* cysticercosis (Terrazas et al. 1998a; 1998b) and that PGE2 can up-regulate the IL-6 and IL-10 production (Strassmann et al. 1994; Portanova et al. 1996).

In conclusion, our data indicate that PGE2 production must be considered as an important biological factor related to susceptibility in murine cysticercosis, that could act synergistically with other cytokines such as IL-6 and IL-10 for the inactivation of protective Th1-type immune responses, as well as a mechanism of immune evasion additional to those previously suggested (Flisser et al. 1991; Lacllette et al. 1992).

REFERENECEES

- Barrow W.W., Carvalho J.P., Davis T. L., Wright E.R., Bachelet M. and Rastogi N. 1993. Immunomodulation of human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity* 61, 5286-5293.
- Baumeister, S., Dennis, R.D., Kunz, J., Weigandt, H. and Geyer, E. 1992. Comparative serological reactivity of *Taenia crassiceps*, *Taenia solium* and *Taenia saginata* metacestode neutral glycolipids to serum from *Taenia crassiceps*-infected mice. *Molecular and Biochemical Parasitology* 53, 53-62.
- Betz, M., and Fox, B.S. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *Journal of Immunology* 146, 108-115.
- Edwards C.K., Hedegaard H.B., Zlotnik A., Gangadharam P.R., Johnston R.B. and Pabst M.J. 1986. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: Association with macrophage release of Prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon- γ . *Journal of Immunology* 136, 1820-1827.
- Ferreri, N., Rudiger, H. and Askenase, P. 1993. Inhibition of IL-2-dependent proliferation by a Prostaglandin-dependent suppressor factor. *Journal of Immunology* 150, 2102-2111.
- Flisser, A., Palncarte, A. and Correa, D. 1991. *Taenia solium* cysticercosis: a review. *Research and Review in Parasitology* 51, 17-23.
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Hernández, M. and Sciutto, E. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66, 760-764.
- Hilkens, C.M., Vermeulen, H., Joost van Neerven, R.J., Snijdwint, F.G.M., Wierenga, E.A. and

- Kapsenberg, M.L. 1995. Differential modulation of T helper type (Th1) and T helper 2 (Th2) cytokine secretion by prostaglandin E2 critically depends on interleukin-2. *European Journal of Immunology* 25, 59-63.
- Hilkens, C.M., Snijders, A., Vermeulen, H., van der Meide, P.H., Wierenga, E.A. and Kapsenberg, M.L. 1996. Accessory cell-derived IL-12 and prostaglandin E2 determine the IFN- γ level of activated human CD4+ T cells. *Journal of Immunology* 156, 17222-17227.
- Kunz, J., Baumeister, S., Dennis, R., Kuytz, B., Wiegandt, H. and Geyer, E. 1991. Immunological recognition of larval *Taenia crassiceps* glycolipids by sera from parasite-infected mice. *Parasitology Research* 77, 443-447.
- Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, C., Cohen, D., Bing, D. and Nicholson-Weller, A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology* 148, 926-928.
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, L.I., Govezensky, T. and Romano, M. 1995. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Journal of Steroid Biochemical and Molecular Biology* 52, 575-581.
- Parker, C., Huber, M. and Godt, S. 1995. Modulation of IL-4 production in murine spleen cells by prostaglandins. *Cellular Immunology* 160, 278-285.
- Portanova, J.P., Zhang, Y., Anderson, G.D., Hauser, S.D., Masferrer, J.L. Seibert, K., Gregory S.A., and Isackson, P.C. 1996. Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 184, 883-891.
- Proudfoot L., O'Donell C.A. and Liew F.Y. 1995. Glycoinositolphospholipids inhibit nitric oxide

- synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology* **25**, 745-750.
- Riese, C., Böck, G., Klocker, H., Bartsh, G. and Thurner, M. 1997. Prostaglandin E2 and Tumor necrosis factor cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 1603-1608.
- Robinson, P., Atmar, L.R., Lewis, D.E. and Clinton White Jr, A. 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infection and Immunity* **66**, 2925-2931.
- Snijdwint, F.G.M., Kalinski, P., Wierenga, E., Bos, J.D. and Kapsenberg, M.L. 1993. Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *Journal of Immunology* **150**, 5321-5329.
- Strassmann, G., Patil Koota, V., Finkelman, F., Fong, M. and Kambayashi, T. 1994. Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 2365-2370.
- Susuki, Y. and Kobayashi, A. 1981. Suppression of unprimed T and B cells in antibody responses by irradiation resistant and plastic adherent suppressor cells in *Toxoplasma gondii* infected mice. *Infection and Immunity* **34**, 36-42.
- Tamioka, H. and Saito, H. 1992. Characterization of immunosuppressive functions of murine peritoneal macrophages induced with various agents. *Journal of Leukocyte Biology* **51**, 24-31
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T. and Larralde, C. 1994. A role for 17- β estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*) *Journal of Parasitology* **80**, 553-558.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T. and Larralde, C. 1998a. Shift from an early restrictive

Th1 type response to a late permissive Th2 type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* **84**, 74-81.

Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodríguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F. and Larralde, C. 1998b. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, Submitted.

Van der Pouw Kraan, T.C., Boeijs, L.C., Smeenk, R.J., Wijdenes, J. and Arden, L.A. 1995. Prostaglandin E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *Journal of Experimental Medicine* **181**, 775-779.

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 down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* **112**, 561-570.

Watanabe, S., Yssel, H., Harada, Y. and Arai, K. 1994. Effects of prostaglandin E2 on Th0-type human T cell clones: modulation of functions of nuclear proteins involved in cytokine production. *International Immunology* **6**, 523-532.

Wilson, R.A. 1993. Immunity and immunoregulation in helminth infections. *Current Opinion in Immunology* **5**, 538-547.

Yamashita, T. and Boros, L.D. 1990. Changing patterns of lymphocyte proliferation, IL-2 production and utilization, and IL-2 receptor expression in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology* **145**, 724-731.

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Effect of indomethacin and PGE2 on susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. Two days before infection mice were implanted with a pellet containing indomethacin (0.5 mg) or PGE2 (100 μ g), parasite intensities were evaluated 4 wk later. Results are shown as mean \pm SD and are representative of three independent experiments. n= 10 mice per group; *P<0.05.

Figure 2.- Indomethacin in vivo treatment improved the response to Con-A in splenocytes from parasitized mice. Proliferative response to Con-A was evaluated 4 wk after infection. mice receiving indomethacin showed a higher (*P<0.05) response than control (placebo treated) mice. Values shown are the mean \pm SD of 5 mice per group.

Figure 3.- Cytokine production by splenocytes from parasitized and indomethacin treated mice. Splenocytes were stimulated with Con-A and several cytokines were measured in 48 h culture supernatants. a) IL-2 production was evaluated by a bioassay with CTLL-2 cell line. Levels of IFN- γ (b), IL-6 (c) and IL-10 (d) were all evaluated by ELISA. n= 5 mice per group, values shown are the mean \pm SE. *P<0.05 with respect to control group (placebo-treated mice); ** P<0.05 compared with normal mice.

Figure 4.- Effect of indomethacin and macrophages onto in vitro splenocyte's proliferation in response to Con-A. a) Splenocytes cultures from mice with 8 wk after infection were treated with 2 μ g/ml of indomethacin. b) From the same cellular samples macrophages were withdrawn of cultures and non-adherent cells were stimulated in similar form. n= 5 mice per group. *P<0.05, compared with control mice (Placebo-treated).

FIGURA 1

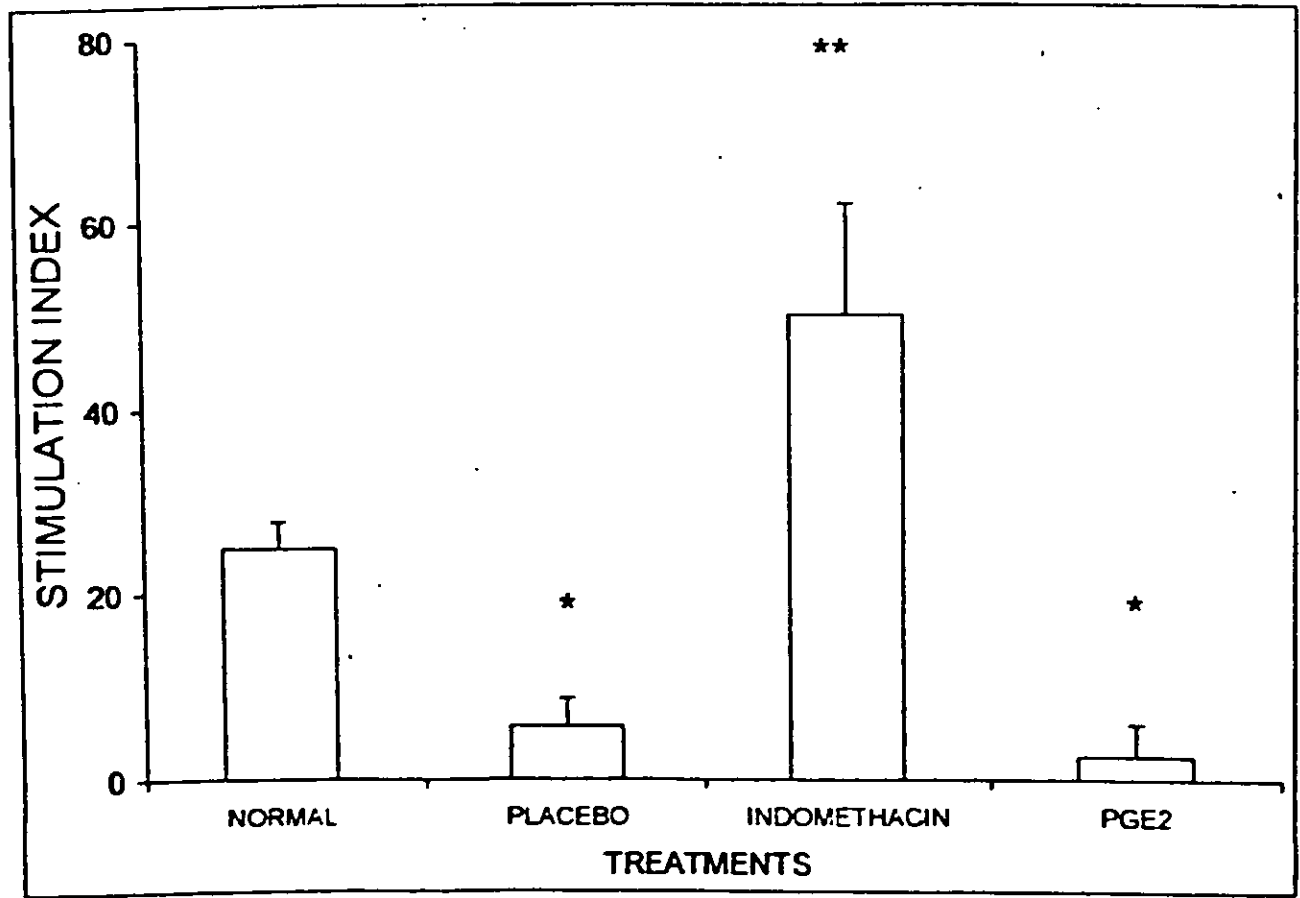
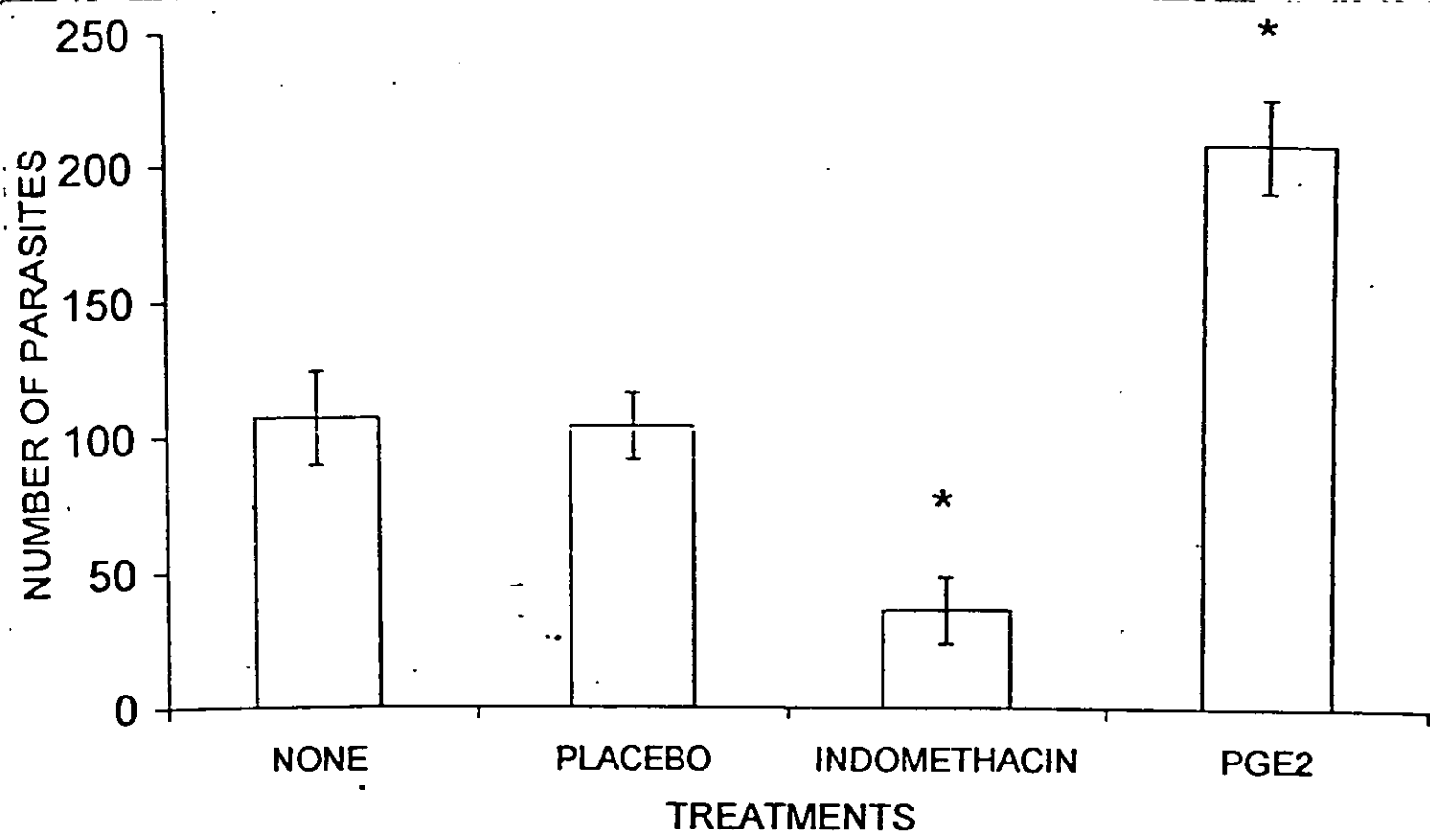


FIGURA 2

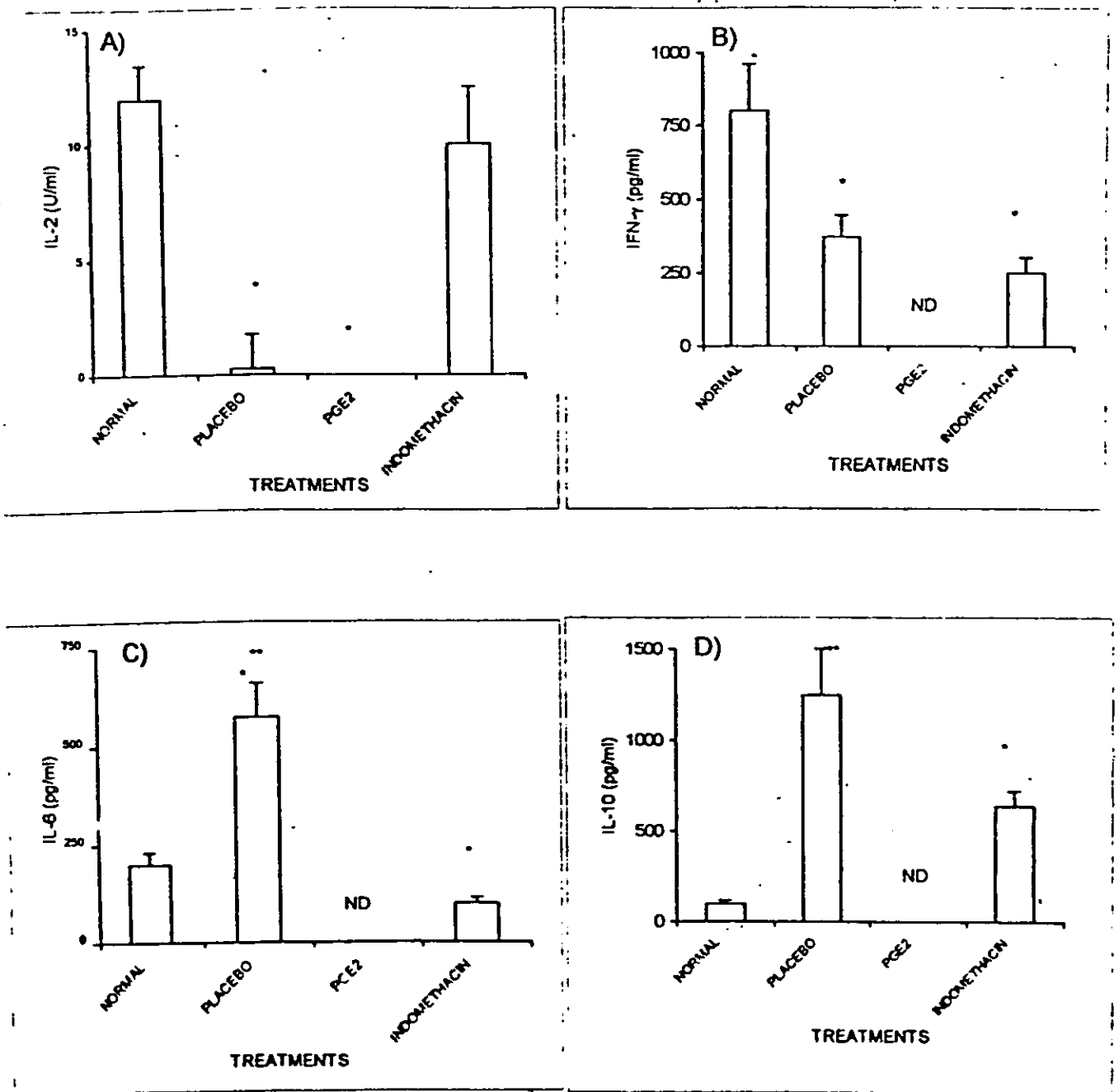
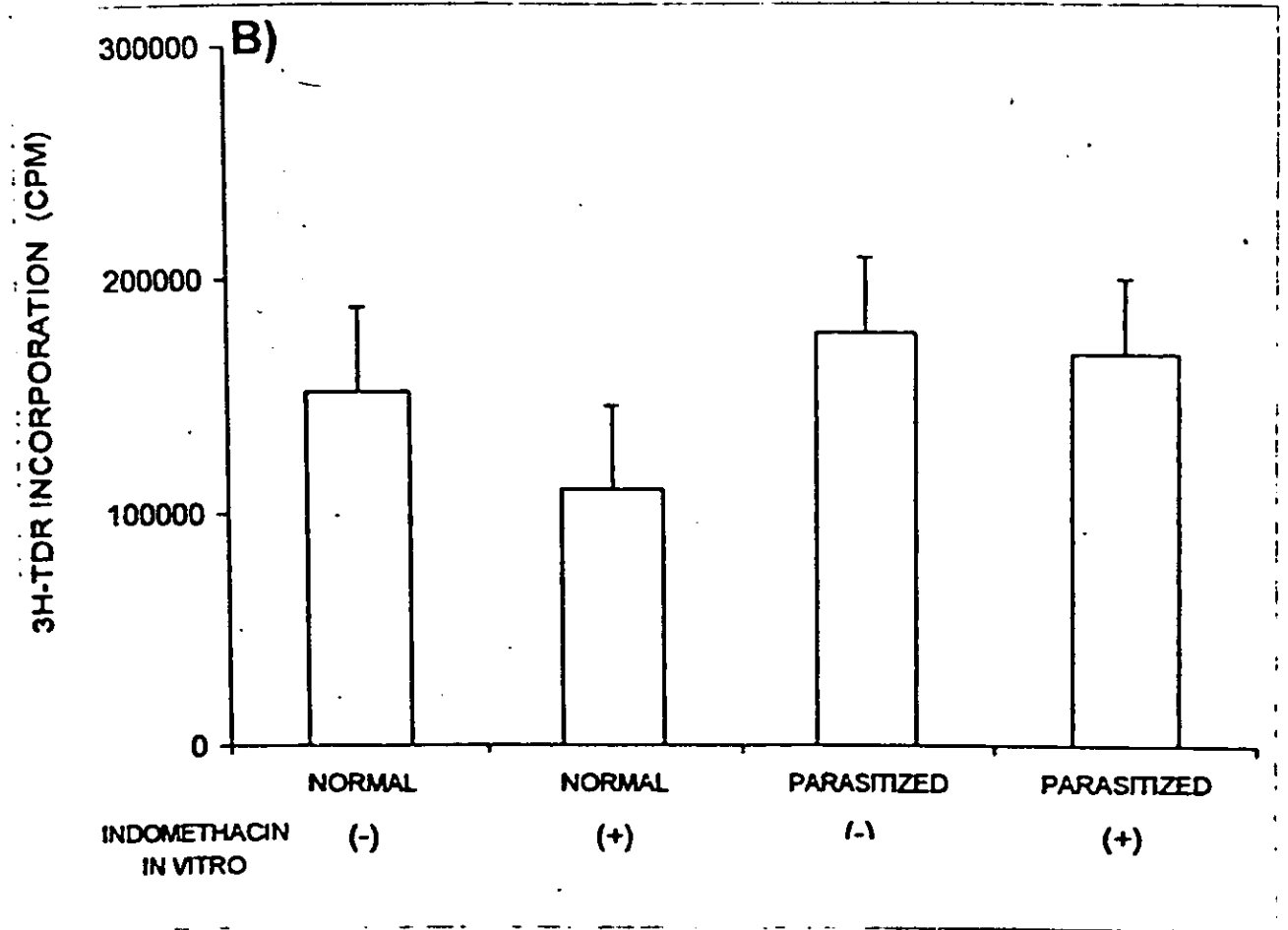
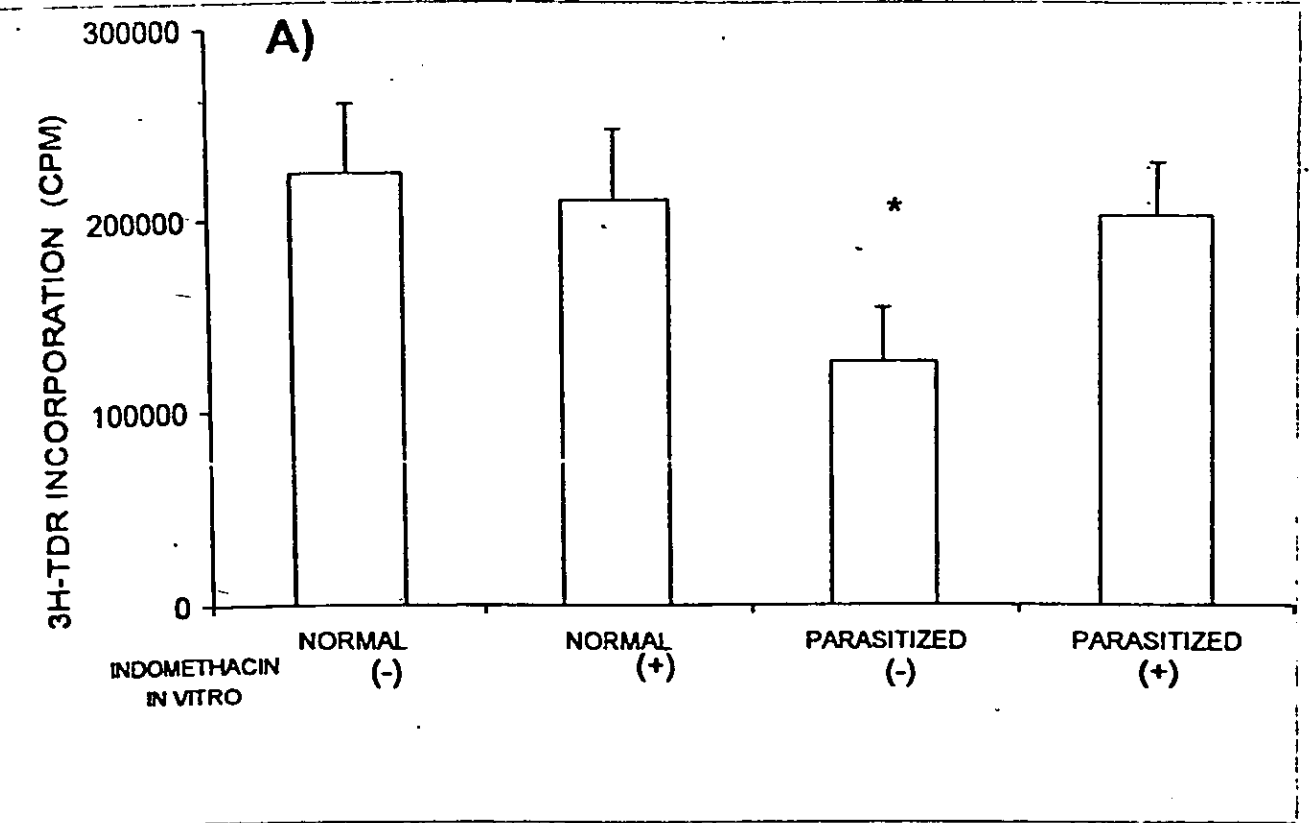


FIGURA 3

FIGURA 4



APENDICE II

A ROLE FOR 17- β -ESTRADIOL IN IMMUNOENDOCRINE REGULATION OF MURINE CYSTICERCOSIS (*TAENIA CRASSICEPS*)

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

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

ABSTRACT: In experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*, parasite reproduction is favored by thymectomy or by orchidectomy, and restricted by ovariectomy. Hormonal reconstitution experiments showed that 17- β -estradiol increases parasite numbers whereas 5- α -dihydrotestosterone was ineffective. Parasite numbers decreased with increments in cellular immunity but were insensitive to antibody levels. A possible immunoendocrinological interaction involving estrogen as a depressor of cellular immunity is envisaged in the control of cysticercosis.

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962; Culbreth et al., 1972) is well known as a source of cross-reacting antigens useful in immunodiagnosis of human cestode diseases (Gottstein et al., 1986; Schantz et al., 1988; Larralde et al., 1990), as well as a practical model for testing candidate vaccines against porcine *Taenia solium* cysticercosis (Sciutto et al., 1990). It is also a manageable experimental system in which to explore the role of biological factors involved in host susceptibility. Thus, the relevance of sex and of the H-2 genes in mice susceptibility to *T. crassiceps* cysticercosis have been documented (Chernin, 1975; Sciutto et al., 1991) as has the value of cellular and humoral immune mechanisms in immunological resistance (Hermánek and Prokopic, 1989; Sciutto, 1989; Bojalil et al., 1993). Further, the striking differences in susceptibility between female and male mice possibly involve the joint action of the immune system and the gonads (as opposed to direct hormonal action) (Huerta et al., 1992).

Here we probe the possible immunoendocrinological interactions regulating parasite reproduction in the host by way of relating neonatal thymectomy, prepuberal gonadectomy, and hormonal reconstitution by 17- β -estradiol (estrogen) and 5- α -dihydrotestosterone in infected male and female mice, with whole parasite counts, antibody response, and delayed-type hypersensitivity (DTH) response to the parasite's antigens. Results point to estrogen as a major protagonist in promoting cysticercus growth and

suggest it is mediated by interfering with the thymus-dependent cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth.

MATERIALS AND METHODS

The fast-growing ORF strain of *T. crassiceps* isolated by Freeman (1962) was used in all experiments. Since 1986 the parasites have been maintained in female BALB/c mice by sequential intraperitoneal inoculation of metacystodes (Freeman, 1962). Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 mo before.

BALB/c inbred mice of both sexes were used at different ages (newborn [48 hr] and 8 wk of age) according to each experimental protocol. They were all bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations (Green, 1981), starting with original stock from Jackson Laboratories in 1982; they were fed Purina Diet 5015 ad libitum.

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

Gonadectomies were performed surgically under anesthesia with ether on 5-wk-old thymectomized and nonthymectomized mice of both sexes. They were then allowed a 3-wk recovery period before inoculation with parasites.

Ten small (approximately 2 mm diameter), non-budding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml phosphate-buffered saline (PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into each mouse using a 0.25-gauge needle. Mice were killed 30 days after infection and all the cysts found inside the peritoneal cavity were counted.

In all mice, DTH was measured 28 days after infection by footpad injection of 100 μ g of vesicular fluid proteins in 30 μ l of sterile saline solution per mouse. Footpad swelling was measured 24 hr later with a dial-

TABLE I. Effects of thymus and gonads upon parasite intensity (no. of parasites/mouse), delayed-type hypersensitivity, and antibody level in experimental murine cysticercosis by *Taenia crassiceps*.

| Treatment | Parasite intensity | | Delayed-type hypersensitivity | | Antibody level | |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|-------------------------------|-----------|----------------|-------------|
| | Females | Males | Females | Males | Females | Males |
| Control | 204 ± 92* (n = 8) | 43 ± 21 (n = 10) | 4.5 ± 2.2† | 8.8 ± 2.2 | 0.65 ± 0.19‡ | 0.72 ± 0.08 |
| Gonadectomized | 119 ± 80 (n = 10) | 125 ± 81 (n = 10) | 7.3 ± 2.3 | 6.5 ± 2.3 | 0.63 ± 0.11 | 0.65 ± 0.10 |
| Thymectomized | 351 ± 99 (n = 12) | 194 ± 163 (n = 8) | 3.9 ± 1.7 | 1.1 ± 1.1 | 0.73 ± 0.19 | 0.75 ± 0.16 |
| Thymectomized and gonadectomized | 201 ± 157 (n = 8) | 183 ± 71 (n = 7) | 4.0 ± 2.4 | 3.0 ± 1.9 | 0.58 ± 0.16 | 0.73 ± 0.14 |

* Mean parasite intensity ± standard deviation.

† Mean % increase of foot-pad volume relative to contralateral control foot ± standard deviation.

‡ Mean optical density reading in ELISA assays for serum anticysticercus antibodies ± standard deviation.

thickness gauge (Mitotoyo, Japan); the original (before inoculation) footpad thickness was used as an internal control.

Vesicular fluid from *T. crassiceps* larvae was employed as the source of antigens for detection of anti-cysticercus antibody in the sera of mice by enzyme-linked immunoassay (ELISA), as described elsewhere (Larralde et al., 1989).

Gonadectomized mice of both sexes were hormonally reconstituted with their own major sex hormone or with the sex hormone of the opposite sex. The hormones used were estrogen (17- β -estradiol) and the androgen 5- α -dihydrotestosterone. They were delivered in the form of subcutaneous 3-wk controlled dose-dependent release rate pellets (Innovative Research of America, Toledo, Ohio). Doses of estrogen were 0.1 mg/pellet or 0.01 mg/pellet, whereas the only dose used of the androgen 5- α -dihydrotestosterone was a 0.5-mg/pellet. All mice had the pellet implanted 3 days before infection. This was done to assure an adequate hormonal environment in the hosts at the time when cysticerci were inoculated. Twenty-one days after the implantation of the hormone pellets, all mice received a second pellet of the same dose to maintain hormonal levels for another week. The biological hormonal function of pellets was confirmed by observation of the size of the uterus in gonadectomized females and the size of seminal vesicles in orchidectomized males.

Statistical analysis of parasite intensities with respect to treatment variables was performed by multifactorial analysis of variance (MANOVA) using $(n + 1)^{1/4}$ as a response variable, where n is the number of parasites in each individual mouse (Anonymous, 1985). The addition of unity to n was to eliminate occasional 0 values and the rooting to normalize distributions of parasite intensities. The DTH response and antibody levels were analyzed by a MANOVA using the original data (footpad thickness and optical density values, respectively) without transformation.

RESULTS

The notable differences in parasite intensities (no. of parasites/mouse) between control female and male mice are immediately appreciated in

Table I; 4.7 times greater ($P = 0.01$) parasite intensities were found in normal females (204 ± 92) than in normal males (43 ± 21). The DTH was significantly higher in males than in females ($P = 0.02$), whereas antibody response appeared to be equal in both sexes ($P > 0.5$).

Gonadectomy significantly reduced the parasite intensities of females by 41% relative to controls ($P < 0.01$), whereas it increased that of males in 190% ($P < 0.01$), bringing down the female/male intensity quotient from 4.7 to 0.9 (Table I). Gonadectomy in females increased the DTH by 62% ($P < 0.05$) and decreased it 26% in males although not significantly ($P = 0.9$). Whole antibody serum levels were not significantly affected ($P > 0.5$) by gonadectomy in either female or male mice (Table I).

Thymectomy increased parasite intensities in females by 72% relative to controls ($P < 0.01$) and up to 351% ($P < 0.01$) that of males (Table I), reducing the female/male intensity quotient from 4.7 to 1.8 ($P > 0.05$). The DTH was significantly reduced by thymectomy in males 87% ($P < 0.01$) but only in 13% in females ($P = 0.09$), whereas the antibody response was not significantly modified in either sex.

In females that were both thymectomized and gonadectomized, the reducing effect of gonadectomy upon parasite intensity together with the increasing effect of thymectomy, countered each other to reach a net effect of only 1% reduction relative to control values ($P > 0.05$) (Table I). In males, however, the effects of gonadectomy and of thymectomy upon parasite intensity caused a net increase of 325% relative to controls ($P < 0.01$). As a consequence, the female/male intensity quotient in this group was reduced from 4.7

TABLE II. Effects of hormonal reconstitution upon parasite intensity (no. of parasites/mouse), delayed-type hypersensitivity, and antibody level in gonadectomized mice experimentally infected by *Taenia crassiceps*.

| Treatment | Parasite intensity | | Delayed-type hypersensitivity | | Antibody level | |
|--|-----------------------|----------------------|-------------------------------|-------------|----------------|-------------|
| | Females | Males | Females | Males | Females | Males |
| Control | 268 ± 85* (n = 10) | 16 ± 22 (n = 10) | 4.0 ± 2.2† | 8.5 ± 2.6 | 0.86 ± 0.31‡ | 0.82 ± 0.32 |
| Gonadectomized | 119 ± 79 (n = 10) | 72 ± 51 (n = 10) | 4.4 ± 2.6 | 7.1 ± 3.4 | 0.83 ± 0.31 | 0.99 ± 0.24 |
| 17- β -estradiol (0.01 mg) | 382 ± 269 (n = 6) | 268 ± 236 (n = 7) | 4.8 ± 2.5 | 4.84 ± 1.57 | 0.95 ± 0.18 | 0.80 ± 0.32 |
| 17- β -estradiol (0.1 mg) | 466 ± 209 (n = 5) | 319 ± 173 (n = 9) | 1.78 ± 2.2 | 2.1 ± 2.2 | 1.17 ± 0.20 | 0.82 ± 0.21 |
| 5- α -dihydrotestosterone (0.5 mg) | 152 ± 101 (n = 10) | 67 ± 35 (n = 10) | 2.71 ± 2.2 | 6.75 ± 2.0 | 0.93 ± 0.26 | 0.95 ± 0.24 |

* Mean parasite intensity \pm standard deviation.

† Mean % increase of foot-pad volume relative to contralateral \pm standard deviation.

‡ Mean optical density reading in ELISA assays for serum anticysticercus antibodies \pm standard deviation.

to 1.1. The DTH was significantly decreased 62% by gonadectomy and thymectomy in males ($P < 0.02$), whereas antibody response was not significantly modified in either sex (Table I).

Table II shows the results obtained in a different set of experiments designed to evaluate the effects of hormonal reconstitution upon the parasite intensity of gonadectomized mice. Here, again, the sex-associated differences in parasite intensities of normal control mice, now favoring females over males by a factor of 16, was observed. Likewise, the changes in parasite intensities brought about by gonadectomy alone was replicated as in Table I.

Hormonal reconstitution experiments met with the problem of large variation in parasite intensities within groups of reconstituted mice as compared to the other groups, i.e., the variation coefficient (mean/standard deviation) of control females was 3.1, whereas that in reconstituted females was equal to 1.4, 2.2, and 1.5. However, some solid inferences may be drawn from the data. Reconstitution with estrogen in both low and high doses brought about large and statistically significant ($P < 0.01$) increments in parasite intensities relative to gonadectomized mice, in both females (221 and 291%, $P < 0.01$) and males (272 and 343%, $P < 0.01$). In contrast, reconstitution with androgen seemed inconsequential for parasite intensities in both sexes ($P > 0.05$). The DTH was significantly decreased by reconstitution with 0.1 mg of estrogen as compared to control ($P < 0.01$) in gonadectomized mice of both sexes (females 59%, males 75%). The lower dose (0.01 mg) of estrogen had similar effects upon the DTH but only in males; females

were essentially unaffected. Reconstitution with androgen did not have a significant effect on the DTH of gonadectomized mice in either females (38% decrement) or males (4% decrement), although DTH reduction in females bordered on significance ($P = 0.08$). Antibody levels were not significantly altered by hormonal reconstitution in either sex or treatment combination, although the 40% increment noted in females reconstituted with the high dose of estrogen also bordered on being significant ($P > 0.07$). Figure 1 shows a statistically significant negative correlation be-

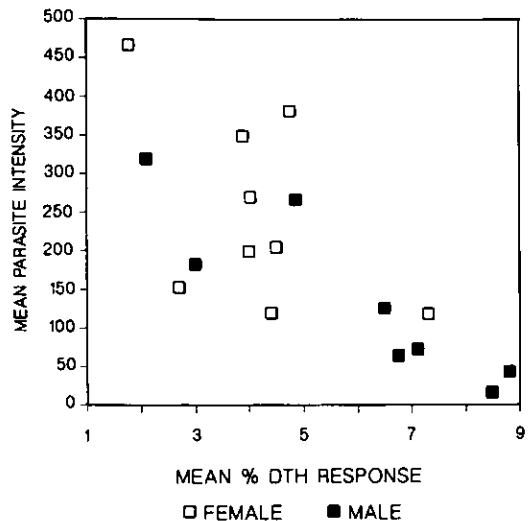


FIGURE 1. Negative linear correlation ($r^2 = 0.477$, $P < 0.01$) between mean parasite intensities (no. of parasites/mouse) and mean % delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in male and female mice from all experiments.

tween average DTH response and average parasite intensity when considering all experimental groups ($r^2 = 0.477$, $P < 0.01$).

DISCUSSION

Reproduction of *T. crassiceps* (ORF strain) cysticerci in the peritoneal cavity of mice was shown to be under strong regulation by gonadal and thymic factors. The testis would seem to hinder parasite reproduction and the ovary to promote it, as gonadectomy greatly increased parasite intensities in the male hosts and caused a moderate decrease in the female hosts. The thymus restricts parasite growth since thymectomy increased parasite intensities in both sexes, albeit more intensely so in males than in females. Cellular immunity (in as much as it is measured by the DTH to the parasite antigens) would appear to be principally responsible for inhibiting parasite growth as documented by the negative correlation between parasite intensities and the DTH responses. In contrast, antibody response increased with parasite intensity. The effects of gonadectomy and thymectomy upon parasite intensity were not additive in mice that were both thymectomized and gonadectomized. This could be interpreted as indicating a maximal possible effect set by the parasite's biological limitations on reproduction. The absence of an additive effect could also reflect an interaction between the immune and endocrine systems, as additive effects would be expected in independent control systems.

The endocrinological and immunological factors affecting cysticercus reproduction may of course proceed independently, but the endocrine interactions between host and parasite (in both directions) are progressively being recognized in many animal species, including mammals (Lin et al., 1990). In the case of *T. crassiceps*, there are hints of a possible immunoendocrinological interaction, vis-à-vis the inhibiting effect of orchidectomy upon DTH, the somewhat lesser DTH responses of control female mice with respect to males, and the disappearance of sex-related differences in parasite intensities following thymectomy as well as after gonadectomy. Also suggestive are the reduction of parasite intensities in the gonadectomized females, accompanied by a statistically significant increase (62%) in the DTH and the increased parasite intensity of gonadectomized males concomitant with a 26% decrease in the DTH. At this point, the notion

would be that either the ovary depresses cellular immunity, or the testis stimulates it, or both.

The hormonal reconstitution experiments of gonadectomized female and male mice point to estrogen as an important protagonist in this gonad-thymus-cysticercus scheme. Reconstitution with estrogen resulted in increased parasite intensities in both gonadectomized female and male mice and simultaneously decreased the DTH without affecting antibody levels. In contrast, reconstitution with androgen proved ineffective for parasite intensity, DTH, and antibody synthesis in all mice. Thus, one is led to the conclusion that the relative resistance of males to parasite growth derives more from their normally low levels of parasite-permissive estrogen than from parasite-restrictive 5- α -dihydrotestosterone, whereas the high levels of estrogen in normal females would favor the reproduction of the cysticerci.

Thus, *T. crassiceps* cysticercosis is added to the growing list of sex-associated parasitic disease, e.g., murine *Taenia taeniaeformis* egg infection (Williams et al., 1982), trichinosis in rats (Luebke et al., 1984), toxoplasmosis (Pung and Luster, 1986), leishmaniasis (Mock and Nacy, 1988), murine malaria (Benten et al., 1992), and schistosomiasis (Eloi-Santos et al., 1992). However, murine *T. crassiceps* cysticercosis is unusual in that here it is the female that is the most susceptible gender, and antibodies appear not to be restrictive of parasite growth. These contrasts illustrate the complexity in the parasite-host regulatory network, each parasite applying different strategies for survival in different or similar hosts, and argue against oversimplification in the associations between gender, immunity, and susceptibility to disease.

Literature abounds with cases where estrogens are related to immunological components or influence immune events (Cohen et al., 1983; Hu et al., 1988; Gulsham, 1990; Schuurs and Verheul, 1990; Grossman, 1991). By locating the sites where receptors for estrogens have been found in the immunoregulatory network (Cox and Liew, 1992; Sher and Coffman, 1992), many effective actions of estrogen can be envisaged that would favor the parasite. A combination of estrogen-mediated events consistent with our results in *T. crassiceps* should depress TH₁ cell function (interleukin-2, tumor necrosis factor, and interferon-gamma production), while stimulating TH₂ cell function (antibody and interleukins 10 and 6 production).



Sex Hormone Changes Induced by the Parasite Lead to Feminization of the Male Host in Murine *Taenia crassiceps* Cysticercosis

C. Larralde,¹ J. Morales,² I. Terrazas,¹ T. Govezensky¹ and M. C. Romano^{2*}

¹Departamento Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México, D.F. 04510, México and ²Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Laboratorio de Endocrinología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apdo. Postal 14-740 México, D.F. 07000, México

Female mice are more susceptible to *Taenia crassiceps* (TC) infection than males. However, after a month parasite load increases massively in both genders reaching thousands of parasites per host. The possibility of hormonal changes in the infected mice was envisaged. Sex hormones levels were assayed after different periods of infection, the parasites present in the peritoneal cavity were collected and gonads, uterus and seminal vesicles were weighed. In male mice, serum estradiol increased to levels 200 times their normal values whilst those of testosterone decreased 90% relative to controls. The weight of seminal vesicles was significantly diminished. Infected female mice also showed a slight increase in estrogen blood levels after 8 weeks of infection and the weight of the uterus was significantly increased relative to controls. Serum estradiol and testosterone were almost undetectable after gonadectomy. Cytokines such as IL-6 are capable of stimulating aromatase activity and we found that splenocytes from infected mice produced amounts of IL-6 higher than control as measured by ELISA. In conclusion *T. crassiceps* infection triggers a feminization process in the infected hosts. The gonads are required for the parasite to induce higher estrogen synthesis. IL-6 could be involved in the immunoendocrine mechanism used by the parasite to maintain a highly permissive environment for its rapid growth.

J. Steroid Biochem. Molec. Biol., Vol. 52, No. 6, pp. 575-580, 1995

INTRODUCTION

The sexual dimorphism that exists in the normal immune response and in many autoimmune diseases strongly suggests that a linkage between the immune and the reproductive endocrine system exists [1, 2].

Endocrinological, reciprocal interactions between host and parasite are receiving increased attention as influential in parasite success [3]. For instance *Taenia taeniformis* is known to alter reproduction in rats by somehow interfering with the normal functions of sex steroids [4]. The reproduction of *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* is modulated by ecdysteroids [5]. Sexual changes in body morphology as well as sex-

related behavioral changes have been observed in crabs when parasitized with *Rhizocefalan* [6] through mechanisms that are still obscure and could involve changes in the hormonal pattern of the host. Sex preferences in several parasite diseases are well known [7-14].

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* has been used to explore the role of biological factors involved in host susceptibility. Several factors, such as genetics (major histocompatibility complex) and immune status (vaccinations) affect parasite growth [15, 16]. Furthermore, susceptibility to *T. crassiceps* infection in mice is associated with sex: in early infections females carry larger parasite loads than males although, later on, males also become massively parasitized [15]. The sluggish massive colonization of male mice by *T. crassiceps* suggested a sex hormone change in the host induced by the parasite resulting later-on

*Correspondence to M. C. Romano
Received 3 Nov 1994, accepted 31 Jan. 1995

in an increased susceptibility to the infection. To test the hypothesis we measured the level of major sex hormones and the weights of their target organs in chronically parasitized male and female mice. Gonadectomies, and androgen reconstitution, were performed to identify the specific organs and hormones involved in the host-parasite interactions. IL-6 was also studied, as a possible candidate mediating hormonal changes [17] in infected mice [18].

MATERIALS AND METHODS

Mice

Male and female Balb c inbred mice were bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations, starting with original stock from Jackson Labs in 1982, and were fed Purina's Diet 5015 *ad libitum*.

Parasites and experimental infections

The fast-growing ORF strain of *T. crassiceps*, isolated by Freeman in 1962 [19], was used for mice infection in all experiments and was supplied by Dr B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) in 1986. Since then the parasites have been maintained in female Balb c mice by i.p. sequential inoculation of metacystodes in their peritoneal cavity [19]. Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 months before. Ten small (approx. 2 mm diameter) non-budding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml PBS (0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected i.p. into each 42-day-old mouse using a .25 gauge needle. Mice were sacrificed (etherization) in different periods after infection and all the cysts found inside the peritoneal cavity were counted. A complete parasite count was performed visually in each mouse after sacrifice by collecting all parasites present in the peritoneal cavity after thoroughly rinsing it with phosphate buffered saline (NaCl 0.15 M, Na₂PO₄ 0.2 M, NaHPO₄ 0.1 M). An autopsy followed, including gonads and uterus' or seminal vesicles' weight determinations. Organs were placed in 10% formalin for ulterior light-microscopy examination. In this form of disease the parasites do not migrate to another location in the host. Heavily parasitized mice show enlarged abdomens but the disease does not seem to alter other features nor normal body weights (discounting the weights of parasites, which may actually equal that of the host, approx. 25 g).

Treatment procedures

Gonadectomies were surgically performed under ether anesthesia on 4-week-old mice of both sexes. Mice were then allowed a 1 week recovery period before inoculation with parasites. In reconstitution experiments, androgen was administered 7 days after gonadectomy with either testosterone or 5 α -dihydrotestosterone 0.5 mg in 3 weeks release pellets,

Innovative Research of America, Toledo, OH). After another 7 days mice were inoculated with parasites as described above. The effects of the androgens upon parasite loads were measured 8 weeks after infection.

Hormone measurements

Blood for estradiol and testosterone determinations was collected *in vivo* by retrocular venous puncture performed in mice under ether anesthesia. After incubation for 18 h at 4°C the blood clot was centrifuged and serum was separated. Steroids were ether-extracted and solubilized in the phosphate buffer used for radioimmunoassay (RIA) [20, 21]. The concentrations of estradiol and testosterone were determined by RIA, each in duplicate. The antisera were all supplied by ICN Biomedical Inc. (Costa Mesa, CA). The estradiol antiserum cross-reacts 2.5% with oestrone and 1.3% with 17 α -estradiol, and the testosterone antiserum cross-reacts 18.8% with 5 α -dihydrotestosterone (DHT) and 3% with 5 α -androsterone-3 α -17 β -diol. Tritiated ligands 1,2,6,7[³H]testosterone and 1,2,4,8[³H]estradiol were supplied by New England Nuclear (Boston, MS). RIA data were analyzed by the logit/log regression analysis as described [20, 21].

Interleukin-6 assays

IL-6 measurement in stimulated lymphocytes [22] and in serum were performed by ELISA using a kit of Pharmingen (San Diego, CA). Lymphocytes were obtained from the spleens of 4 and 32 weeks parasitized animals and their respective controls. Cells were cultured in the presence or absence of concanavalin-A, and after incubation (37°C, 48 h) IL-6 was measured in the culture medium by ELISA, following the kits' instructions.

RESULTS

Parasite load

A few days after inoculation cysticerci begin active asexual reproduction by budding in one of the poles of their oblong cystic structure [Fig. 1(b)]. A few months later they count in the hundreds or thousands, reaching masses that may equal those of the host [Fig. 1(a)] illustrates the differences in abdomen size between a normal mouse and its parasitized litter-mate after 6 months of infection]. *T. crassiceps* cysticerci initially grow faster in females than in males but, in late infections, males are also burdened by huge parasite loads (Table 1). Health of the massively parasitized mice is not seriously affected in laboratory conditions nor are there macroscopic or microscopic signs of serious illness or malnutrition.

Testosterone and estradiol serum levels

Figure 2 shows the results obtained measuring serum levels of testosterone and estradiol in male and female mice during the course of cysticercus infection. The

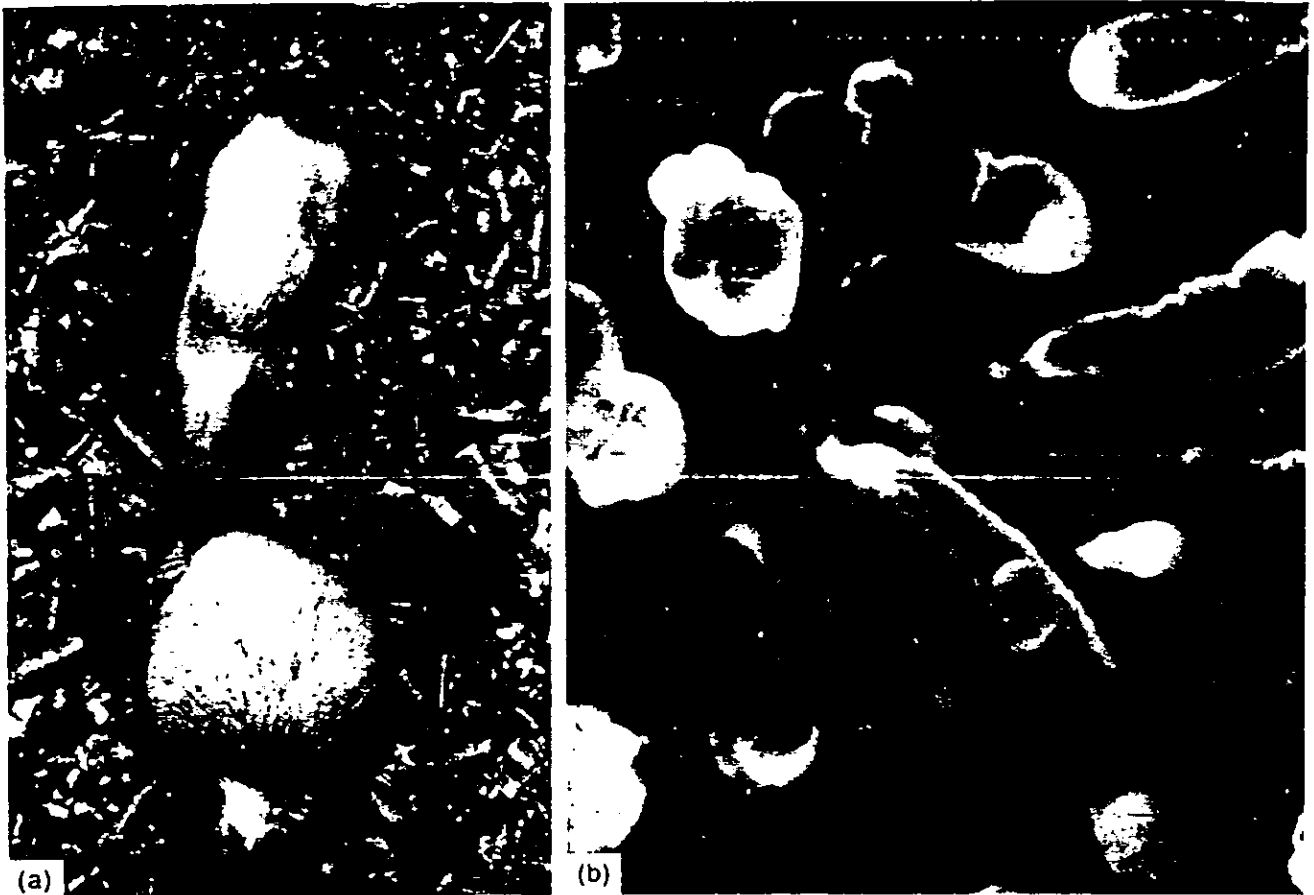


Fig. 1. Main features of experimental murine cysticercosis. (a) This figure illustrates the differences in abdomen size between a normal mouse and its parasitized litter-mate after 6 months of infection. (b) Asexual reproduction of parasites begins a couple of weeks after injection into the peritoneal cavity of mice.

growth of the parasite in the abdominal cavity of males is followed by an increment in blood estradiol that increases to levels 200 times their normal values whilst that of testosterone decreases 90% relative to control [Fig. 2]. Infected females also show increased blood levels of estradiol at 8 and 16 weeks after infection [Fig. 2].

Weights of uterus and seminal vesicles

The weight of the uterus in infected females is increased relative to controls after 4 weeks of infection and remains hypertrophied at 16 weeks of infection (Fig. 3, bottom). The weight of the seminal vesicles is

significantly reduced in parasitized males after 4 weeks of infection and differences continued being evident at 8 and 16 weeks post infection (Fig. 3, top).

Effects of gonadectomy

The origin of the increment in blood estradiol was examined by simultaneously studying parasite loads and levels of sex steroids 4 and 8 weeks after experimental infection in both control and gonadectomized male and female mice, a time of infection when major endocrinological alterations were clearly detectable in the previous experiments with intact mice. After gonadectomy serum estradiol and testosterone decreased

Table 1. Time-course of infection in male and female mice. Initially *T. Crassiceps cysticerci* grows faster in females than in males but, in late infections, males are also burdened by huge parasite loads

| | Infection time: days | | | | | | | | | |
|--------|----------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 5 | 8 | 15 | 20 | 30 | 60 | 150 |
| Female | 0.8 ± 0.4 n = 9 | 1.8 ± 1.0 n = 5 | 3.1 ± 0.5 n = 19 | 0.6 ± 0.3 n = 14 | 5.9 ± 0.5 n = 53 | 10.8 ± 1.0 n = 20 | 25.7 ± 4.5 n = 27 | 131.8 ± 5.1 n = 371 | 582.1 ± 40.4 n = 34 | 2642.9 ± 171.8 n = 18 |
| Male | 0.4 ± 0.2 n = 9 | 0.5 ± 0.2 n = 6 | 2.1 ± 0.5 n = 19 | 0.0 ± 0.0 n = 14 | 2.2 ± 0.3 n = 53 | 6.3 ± 0.8 n = 20 | 7.6 ± 1.4 n = 28 | 30.0 ± 1.9 n = 329 | 247.5 ± 49.9 n = 28 | 1144.3 ± 130.3 n = 19 |

Data represent mean ± SE of individual parasite loads of a total of 573 female and 525 male infected, and otherwise untreated mice, registered in the database, over a number of experiments performed at different times

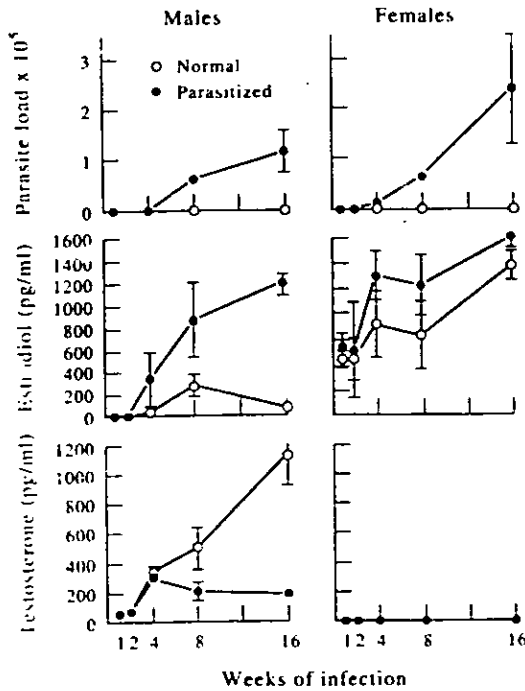


Fig. 2. Impact of cysticercosis in levels of sex-steroids. Modifications in individual parasite counts and in estradiol and testosterone serum concentrations of male and female mice after different weeks of intraperitoneal infection. Each symbol in the graph represents the mean \pm 1 SD of the response variable as obtained from at least 5 mice in each time of infection, and by duplicate in each mouse for sex steroid assessments. The experiment was performed a second time in the same conditions with essentially the same results.

to almost undetectable levels in both male and female mice (not shown). However, 8 weeks after infection, the parasite loads in gonadectomized males were greater than those of intact controls and smaller in gonadectomized female mice than those of controls (Table 2).

Effects of androgen reconstitution

To test the androgen's parasite restrictive activities, testosterone and DHT were administered to gonadectomized male and female mice as described. Both testosterone and DHT decreased parasite load, although the effect of androgens on males is less significant (Table 2). Testosterone decreased parasite load by 32% in females ($P < 0.01$) and by 32% in males ($P < 0.01$), while DHT decreases 34% parasite load in females ($P < 0.01$) and 27% in males ($P < 0.01$).

IL-6 assays

Table 3 and Fig. 4 show the results obtained in this set of experiments as performed in intact control and parasitized male and female mice. Serum levels of IL-6 are significantly increased in parasitized male and female mice and so is IL-6 production in the cultured medium of lymphocytes from parasitized mice 4 and 32 weeks after infection.

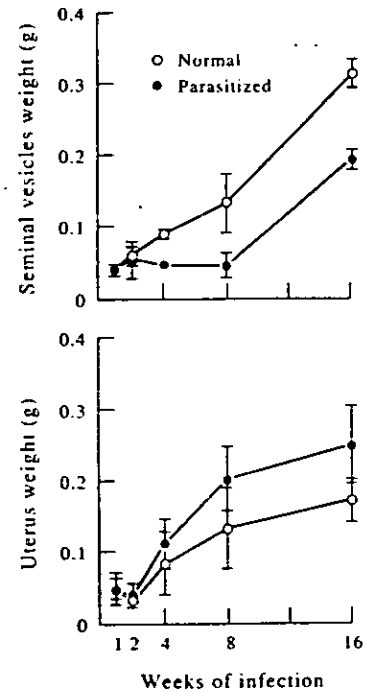


Fig. 3. Impact of cysticercosis in sex-steroids' target organs. Wet weights (average \pm 1 SD; $n = 5$ for each time) of sex steroids' main target organs of mice in the course of intraperitoneal infection with *T. crassiceps* cysticerci. The weight of seminal vesicles are reduced relative to control mice after 4 weeks of infection ($P < 0.01$), whereas the weight of uterus increased significantly in infected females after 8 weeks of infection ($P < 0.05$). Statistics were calculated by analysis of variance of the multifactorial design with gender, weeks of infection and infected or not, as treatment variables; and weight of organs as response variable, and replicates (mice) = 5 in each treatment combination. Data express the mean \pm 1 SD.

DISCUSSION

The measurement of sex steroids in infected male and female mice indicates that *T. crassiceps* triggers a feminization process in both genders. Feminization is most outstanding in male mice where blood estradiol increases to levels 200 times their normal values, roughly similar to those of normal females, whilst those of testosterone decrease 90% relative to control. The weight changes in target organs sex hormones (seminal vesicles and uterus) support that the hormone changes in the infected host are physiologically relevant.

Table 2. Parasite load 8 weeks after infection with *T. Crassiceps* in intact (P) and gonadectomized (Gx) male and female mice. Some animals were implanted with testosterone (T) or dehydrotestosterone (DHT) release pellets

| n | | Female | Male |
|----|-----------|---------------------|---------------------|
| 10 | P | 998.90 \pm 519.22 | 188.90 \pm 93.32 |
| 10 | GxP | 276.80 \pm 50.98 | 302.30 \pm 103.39 |
| 10 | GxP + T | 186.70 \pm 50.01 | 205.40 \pm 28.64 |
| 10 | GxP + DHT | 182.10 \pm 57.73 | 221.67 \pm 81.06 |

Data represent mean number of parasites mouse \pm SD.

Table 3. Serum IL-6 concentration in male and female mice after 4 and 8 weeks of infection

| | Female | Male |
|-------------|-----------------|---------------------|
| 4 weeks | | |
| Control | 25.01 ± 14.44 | 0.964 ± 0.556 |
| Parasitized | 110.70 ± 66.05 | 45.88 ± 20.52 |
| 8 weeks | | |
| Control | 119.10 ± 76.60 | 82 ± 5 ^a |
| Parasitized | 136.76 ± 90.406 | 165.13 ± 12.49 |

IL-6 (pg/ml) was determined by ELISA in each serum by triplicate.

Data represent: mean ± SD.

How does the cysticercus manage to feminize and demasculate its host? Perhaps the cysticercus favors its growth by producing its own estrogens (as *Spirometra mansonioides* produces a kind of growth hormone when infecting rodents [23] and many other parasites produce ecdysone [3]), or somehow stimulates the host's endocrine system towards abnormal oestrogen synthesis. Serum estradiol and testosterone decreases to almost undetectable levels in infected gonadectomized mice, thus indicating that the host's gonads are re-

quired for the parasite to induce high estradiol synthesis in both sexes. However, the absence of estrogens does not prevent the growth of parasites in both genders demonstrating that although estradiol favors *T. crassiceps* development [24–26] it is not indispensable for parasite growth. Other gonad-associated factors in the control of parasite growth and a more intricate strategy in the parasite's activity has to be considered. Perhaps the low androgen levels are the principal feature in this intriguing puzzle. Because the parasite-loads of males increased upon castration, even in the absence of estradiol, we suspected that androgens are inhibitory, a hypothesis that was confirmed when testosterone and DHT decreased parasite loads in gonadectomized male and female mice.

At this point we conclude that sexual differences in parasite loads in intact mice favor females because estradiol promotes and androgen restricts the growth of *T. crassiceps* cysticerci. We further deduce that the cysticerci eventually grow as massively in male as in female hosts because it induces an estrogenization and deandrogenization process in the male host by disabling the normal hormonal function of the testis.

A simple strategy of the cysticercus to achieve these high levels of estradiol and low levels of testosterone in the male host would involve stimulation of the aromatase pathway, the enzyme responsible for the conversion of testosterone to estradiol [27]. This possibility would also be consistent with the preference of the parasite towards females in the normal hosts, in which through an active aromatization process high levels of estradiol are naturally being produced.

Speculations about an enhanced aromatase activity requires revision of the factors involved in its modulation. For instance, IL-6 has been shown to stimulate aromatase activity in breast cancer cells [17] and to be deeply altered in a variety of infections [18]. Thus, we measured the production of this cytokine in parasitized mice. The results shown in this paper demonstrate an important increment in IL-6 concentration of blood and culture medium of lymphocytes from parasitized mice, that could be a factor involved in the feminization process that develops in infected mice.

The cunning hormonally based strategy employed by *T. crassiceps* to establish an unseemly mass of foreign tissue in an initially normal comparatively resistant male mouse may be of interest for consideration in other chronic and massive host-parasite confrontations. Host feminization by parasitic disease illustrates the plasticity of sexual phenotype in response to infections involving the immune system and, by endangering the reproductive capacity of the host, poses novel forms of affecting the evolution of both host and parasite other than the prey, predator approach.

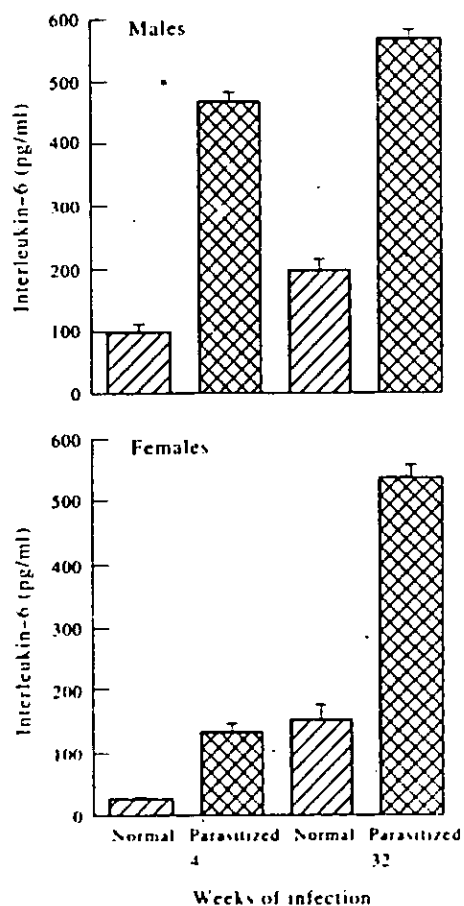


Fig. 4. Production of IL-6 by lymphocytes. IL-6 production was measured in the culture medium of spleen lymphocytes of male (top) and female (bottom) mice after being cultured for 48 h in the presence of concanavalin-A. Data represent mean ± 1 SD of an experiment made by triplicate at 4 and 32 weeks of infection.

Acknowledgements—This work is part of the PhD thesis of Jorge Morales M. who is a CONACYT fellow. This work was supported in part by Grant # 206393 of the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM, and by the Grant # 1276-N9204 of

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México. The authors wish to thank Dr. Ciro Lomeli for providing and taking care of the mice used in these experiments, and Luz María Buendía for expert and patient word processing. We are also grateful to Drs. Michael Parkhouse, Edmundo Lamoyi, Victor Gould, Librado Ortiz Ortiz and Raúl Mancilla for criticism and helpful suggestions.

REFERENCES

- Grossman C. J., Roselle G. A. and Mendenhall C. L. J.: Sex steroids regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 619-637.
- Homo-Delarche F., Fitzpatrick F., Christeff N., Nuñez E. A., Bach J. F. and Dardenne M.: Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 40 (1991) 619-637.
- Beckage N. E.: Host parasite hormonal relationships: a common theme? *Exp. Parasitol.* 72 (1991) 332-338.
- Lin Y. C., Kikihisha Y., Kono H. and Gu Y.: Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Exp. Parasitol.* 70 (1990) 344-352.
- Barker G. C., Mercer S. G., Rees H. H. and Howells R. E.: The effect of ecdysteroids on the microfilarial production of *Brugia pahangi* and the control of meiotic reinitiation in the oocytes of *Dirofilaria immitis*. *Parasitol. Res.* 77 (1991) 65-71.
- Phillips W. J. and Cannon L. R. G.: Ecological observations on the commercial sand crab, *Portunus pelagicus* (L.), and its parasite, *Sacculina Granifera Boschma*, 1973 (Cirripedia: Rhizocephala). 1 (1978) 137-149.
- Reddington J., Stewart G. L., Krammar G. W. and Kramar M. A.: The effects of host sex and hormones on *Trichinella spiralis* in the mouse. *Parasitology* 67 (1981) 548-555.
- Wunderlich F., Marinouski P., Benten W. P. M., Schmitt-Wrede W. P. M. and Mossman H.: Testosterone and other gonadal factor(s) restrict the efficacy of genes controlling resistance to *Plasmodium chabaudi* malaria. *Parasite Immun.* 13 (1991) 357-363.
- Pung O. and Luster M.: *Toxoplasma gondii*: decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Exp. Parasitol.* 61 (1986) 48-56.
- Eloi-Santos S., Olsen N. J., Correa-Olvera R. and Colley D. G.: *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology and susceptibility differences in male and female mice. *Exp. Parasitol.* 75 (1992) 168-175.
- Benten W., Wunderlich F. and Mossman H.: *Plasmodium chabaudi*: estradiol suppresses acquiring, but not once acquired immunity. *Exp. Parasitol.* 75 (1992) 168.
- Mock B. A. and Nacy C. A.: Hormonal modulation of sex difference in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infect. Immun.* 56 (1988) 3316.
- Hirokuni, Nakanishi, Horri Y., Teroshima K. and Fujita K.: Effect of testosterone on the susceptibility of C57 B1/6 mice to infection with *Brugia pahangi* with reference to inflammatory cell response. *Parasitology* 75 (1989) 455.
- Solomon G. B.: Host hormones and parasitic infection. *Int. Rev. Tropical Med.* 3 (1969) 101-158.
- Sciutto E., Fragoso G., Diaz M. L., Valdez F., Lomeli C., Govezensky T., Montoya R. M. and Larralde C.: Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H₂Z and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 77 (1991) 243-246.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Diaz M.L., Montoya R. M., Govezensky T., Lomeli C. and Larralde C.: Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Tanaisolium antigens* against experimental murine cysticercosis. *Parasite Immun.* 12 (1990) 687-696.
- Reed M. J., Topping L., Coldham N. G., Purohit A., Ghilchik M. W. and James V. H. T.: Control of aromatase activity in breast cancer cells: the role of cytokines and growth factors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44 (1993) 589-596.
- Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenkerger M., Lamers M., Tadamitsu K., Zinkernagel R., Bluetmann H. and Köhler G.: Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6 deficient mice. *Nature* 368 (1994) 339-342.
- Freeman R. S.: Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40 (1962) 969-990.
- Aguilera G. and Romano M.: Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cell *in vitro*. *J. Endocr.* 3 (1989) 367-373.
- Reyes-Esparza J. and Romano M.: An age-dependent thymic secretion modulates testicular function. *J. Steroid Biochem.* 34 (1989) 541-545.
- Gorospe C. W. and Kasson B. G.: Lymphokines from concanavalin-A stimulated lymphocytes regulate rat granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 123 (1988) 2462-2471.
- Phares C. K., Shaffer J. L. and Heidrick M. L.: Molecular aspects of host-parasite interaction. In *Immune Recognition and Evasion* (Edited by L. H. J. Van Der Ploeg, C. R. Cantor and H. J. Voegel). Academic Press, NY (1990) Chap. 13, pp. 149-161.
- Huerta L., Terrazas L. I., Sciutto E. and Larralde C.: Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J. Parasitol.* 78 (1992) 471-476.
- Bojalil R., Terrazas L. I., Govezensky T., Sciutto E. and Larralde C.: Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 78 (1993) 471-476.
- Terrazas L. I., Bojalil R., Govezensky T. and Larralde C.: A role for 17 β -estradiol in immunoenocrine regulation of cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 80 (1994) 563-568.
- Neill Halp P. F.: Testicular steroids synthesis: organization and regulation. In *The Physiology, or Reproduction* (Edited by E. Knobil and J. D. Neill) Raven Press, NY (1988) Vol. 1, pp. 975-998.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

x Abbas A.K., Murphy K. and Sher A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383:787-793.

Aboudkhil S., Bureau J.P., Garrelly L. and Vago P. (1991). Effects of castration, depo-testosterone and cyproterone acetate on lymphocyte T subsets in mouse thymus and spleen. *Scandinavian Journal of Immunology*, 34:647-653.

Afonso L.C., Scharon T.M., Vieira L., Wysocka M, Trinchieri G. and Scott P. (1994). The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*, 263:235-237.

Aijen J.E. and Maizels R.M. (1997). Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunology Today*, 18: 387-392.

Amiri P. et al. (1992). *Nature*, 356:604-607.
 Factor el titulo

Ballow M. and Nelson R. (1997). Immunopharmacology: Immunomodulation and Immunotherapy. *JAMA* 278:2008-2017.

Barve S.S., Cohen D.A., De Benedetti A., Rhoads R. and Kaplan A. (1994). Mechanism of differential regulation of IL-2 in murine Th1 and Th2 T cell subsets. *Journal of Immunology*, 152: 1171-1181.

Barrow W., Carvalho P., Davis T., Wright E., Bachelet M. and Rastogi N. (1993). Immunomodulation of Human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of *Mycobacterium avium*. *Infection and Immunity*, 61: 5286-5293.

Biron A.C. and Gazzinelli R.T. (1995). Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Current Opinion in Immunology*, 7: 485-496.

Boehm U., Klamp T., Groot M. and Howard J.C. (1997). Cellular responses to Interferon- γ . *Annual Review of Immunology*, 15:749-795.

Brestcher P.A. (1992). A strategy to improve the efficacy of vaccination against tuberculosis and leprosy. *Immunology Today*, 13:342-345.

Bojalil R, Terrazas L.I., Govezensky T., Sciutto E. and Larralde C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 79:384-389.

Bonnema J.D., Rivlin K, Ting A., Schoon R.A., Abraham R. and Leibson P. (1994). Cytokine enhanced NK cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology*, 152:2098-2104.

Brophy P.M. and Pritchard D.I. (1994). *Experimental Parasitology*, 79:89-96.

Capron M. and Capron A. (1994). Immunoglobulin E and Effector cells in Schistosomiasis. *Science*, 264:1876-1877.

Carter L. and Dutton R. (1996). Type 1 and Type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. 8:336-342.

Coffman R.L. and von der Weid T. (1997). Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *Journal of Experimental Medicine*. 185: 373-375.

Constant S.L. and Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative Approaches. *Annual Review of Immunology*. 15: 297-322.

Corradin S.B., Fasel N., Buchmuller-Rouiller, Ransjin A., Smith J. and Mauer J. (1993). Induction of NO production by IFN- γ and TNF- α is enhanced by IL-10. *European Journal of Immunology*. 23:2045-2048.

Corry D.B., Reiner S.L., Linsley P.S., and Locksley R.M. (1994). Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. *Journal of Immunology*. 153: 4142-4159.

Cox F.E.G. and Liew F.Y. (1992). T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunology Today*. 113:445-448.

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.

Cuna W., and Rodriguez C. (1995). Characterization of T cell clones from Chagasic Patients: Predominance of CD8 surface phenotype in clones from Patients with Pathology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 90:503-506.

Chensue S.W., Warmington K.S., Ruth J., Lincoln O.M., Kunkel S.L. (1994). Cross-regulatory role of interferon gamma, IL-4 and IL-10 in schistosoma egg granuloma formation: in vivo regulation of TH activity and inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*. 98: 395-400.

Dennis R., Maumeister S., Geyer R., Pater-Katalinic J., Hartmann R., Egge H., Geyer E. and Wiegandt H. (1992). Glycosphingolipids in cestodes. *European Journal of Biochemistry*. 201:1053-1062.

Dennis R., Baumeister S., Irmer G., Gasser R. and Geyer E. (1993). Chromatographic and antigenic properties of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst-derived glycolipids. *Parasite Immunology*. 15:669-681.

?
Dubois P.M. et al. (1994). *European Journal of Immunology*. 24:348-354.

Estes M.D., Prasad S.D., Turaga P.S., Sievers K.M. and Teale J.M. (1993). Characterization of an unusual cell type (CD4+CD3-) expanded by helminth infection and related to the parasite stress response. *Journal of Immunology*. 150:1846-2856.

Farber D.L. (1998). Differential TCR signaling and the generation of memory T cells. *Journal of Immunology*. 160: 535-539.

Finkelmann F.D., Shea-Donohue T., Goldhill J., Sullivan C., Morris S., Madden K.B., Gause W.C. and Urban J.F. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: Lessons from Studies with Rodent Models. *Annual Review of Immunology*. 15: 505-533.

Fiorentino, D.F., Zlotnik A., Mosmann T.R., Howard M. and O'Garra A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*. 147:3815-3822.

Flesh I.E.A. and Kaufmann S.H.E. (1994). Role of macrophages and $\alpha\beta$ T lymphocytes in early IL-10 production during *Listeria monocytogenes* infection. *International Immunology*. 6:463-468.

Frosch S., Kuntzlin D. and Fleischer B. (1997). Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity. *Infection and Immunity*. 65: 971-977.

Gajewsky T.F., Lancki D.W., Stack R. and Fitch F. (1994). Anergy of TH0 helper T lymphocytes induces downregulation of TH1 characteristics and a transition to a TH2-like phenotype. *Journal of Experimental Medicine*. 179:481-491.

Gause W. C., Mitro V., Via C., Linsley P., Urban J. F., and Greenwald J. (1997). Do effector and memory cells also need B7 ligand costimulatory signals? *Journal of Immunology*. 159: 1055-1058.

Goyal P.K., Hermanek J. and Wakelin D. (1994). Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity. *Parasite Immunology*. 16:111-117.

Greenwald R.J., Lu P., Halvorson M.J., Zhou X., Chen S., Madden K.B., Perrin P.J., Morris S.C., Finkelman F.D., Peach R., Linsley P.S., Urban J. F. and Gause W.C. (1997). Effects of blocking B7-1 and B7-2 interactions during a type 2 in vivo immune response. *Journal of Immunology*. 158: 4088-4096.

Grzych J.M., Pierce E.J., Cheever A., Caulada Z.A., Caspar P., Hiemy S., Lewis F., and Sher A. (1991). Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, 146:1322-1327.

Hooper D.C., Molowitz E.H., Bos N.A., Ploplis V.A. and Cebra J.J. (1995). Spleen cells from antigen-minimized mice are superior to spleen cells from germ-free and conventional mice in the stimulation of primary in vitro proliferative responses to nominal antigens. *European Journal of Immunology*. 25:212-217.

James S.I. and Nacy C. (1993). Effector functions of activated macrophages against parasites. *Current Opinion in Immunology*. 5:518-523.

- June C.H., Bluestone J.A. Nadler L.M. and Thompson C.B. (1994). The B7 and CD28 receptors families. *Immunology Today*. 15: 321-331.
- Kasahara Y, Miyawaki T., Kato K., Kanegane H., Ychie A., Yokoi T. and Taniguchi N. (1990). Role of Interleukin-6 for differential responsiveness of naive and memory CD4+ T cells in CD2-mediated Activation. *Journal of Experimental Medicine*. 173:1419-1424.
- Kazuyuki T. and Tosato G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *Journal of Immunology*. 148:1143-1148.
- Keane-Myers A., Gause W.C., Finkelman F.D., Xhou X. And Wills-Karp M. (1998). Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation. *Journal of Immunology*. 160: 1036-1046.
- Kuchroo V.K., Das P., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.C., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi M. and Glimcher L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: applications to autoimmune disease therapy. *Cell*. 80: 707-715.
- Kunz J., Baumeister S., Dennis R., Kuytz B., Wiegandt H. and E. Geyer (1991). Immunological recognition of larval *Taenia crassiceps* glycolipids by sera from parasite-infected mice. *Parasitology Research*. 77:443-447.
- Laskay T., Rollinghoff M., and Solbach W. (1993). Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *European Journal of Immunology*. 23:2237-2241.
- Lawrence R.A., Allen J., Gregory W., Kopf M. and Maizels R. (1995). Infection of IL-4 deficient mice with the parasite nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response. *Journal of Immunology*. 154:5995-6001.
- Lenschow D.J., Walunas T.L. and J.A. Bluestone. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual Review of Immunology*, 14: 233-258.
- Lukacs N. W. and Boros D.L. (1993). Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 68:57-63.
- MacMicking J., Qiao-wen X., and Nathhan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*. 15: 323-350.
- Marrack P. and Kappler J. (1994). Subversion of the immune system by pathogens. *Cell*. 76:323-332.
- McKnight A.J., Zimmer G.J., Fogelman I., Wolf F.S. and Abbas A.K. (1994). Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo. *Journal of Immunology*. 152: 2172-2179.

Maggi E., Parronchi P., Manetti R., Simonelli C., Piccini M.P., Rugiu F., De Carli M., Ricci M. and Romagnani S. (1992). Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of Immunology*. 148:2142-2147.

Mezey E. and Palkovitz M. (1992). *Science*. 258:1662-1665.

Miller L.H., Good M.F. and Milon G. (1994). Malaria Pathogenesis. *Science*. 264:1878-1883.

Modlin R. L. and Nuttman T. (1993). Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Current Opinion in Immunology*. 5: 511-517.

Molinari J.L., R. Soto, P. Tato, D. Rodríguez, A. Retana, J. Sepúlveda, and A. Palet.. (1993). Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 49: 502-512.

Morris S.C., Madden K.B., Adamovicz J.J. Gause W.C., Hubbard B.R., Gately M.K. and Finkelman F.D. (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 Coffman R.L. (1987). Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today*. 8:223-227.

Mosmann T.R., and R.L. Coffman. (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different function properties. *Annual Review of Immunology*. 7:145-173.

Noben-Trauth N., P. Kopf, and I. Muller. (1996). Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4 deficient mice. *Science*. 271: 987-990.

O'garra A., Chang R., Go Ning., Hastings R., Houghton G., and Howard M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B-cell derived IL-10. *European Journal of Immunology*. 22:711-717.

Pearce E.J., Caspar P., Grzych J.M., Lewis F.A. and She A. (1991). Down regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine*. 173: 159-163.

Pearce E.J. and Reiner S.L. (1995). Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Current Opinion in Immunology*. 7: 497-504

Petray P., Rottenberg M., Grinstein S. and Orn A. (1994). Release of nitric oxide during the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*. 16:193-199.

Pritchard D.I. (1995). The survival strategies of hookworms. *Parasitology Today*. 11:255-259.

Reiner S.L. (1994). Parasites and T helper cell development: some insights. *Parasitology Today*. 10: 485-488.

Rincón M., Anguota J., Nakumara T., Fikrig E. and Flavell R.A. (1997). Interleukin-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 185: 461-469.

Roach T.I.A., Barton C.H., Chatterjee D., Liew F.Y. and Blackwell J.M. (1995). Opposing effects of IFN- γ on iNOS and IL-10 expression in LPS and mycobacterial lipoarabinomannan-stimulated macrophages. *Immunology*. 85:106-113.

Romani L., Mencacci A., Grohmann U., Mocci S., Mosci P., Puccetti P. and Bistoni F. (1992). Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type1-associated immunity in murine candidiasis. *Journal of Experimental Medicine*. 176:19-25.

Romani L., Puccetti P., Mencacci A., Cenci E., Spaccapelo R., Tonnetti L., Grohmann and Bistoni F. (1994). Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *Journal of Immunology*. 152: 3514-3521.

Romagnani S. (1994). Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annual Review of Immunology*. 12:227-257.

Romagnani S. (1997). The Th1/Th2 paradigm in disease. Ed. Chapman and Hall, Canadá, 241pp.

Sciutto E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, R.M. Montoya, M.L. Diaz, T. Govezensky, C. Lomeli and C. Larralde. 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 12: 687-696.

Sciutto E., Aluja A., Fragoso G., Rodarte L.F., Hernández M., Villalobos M.N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., Govezensky T., Diaz S. and Larralde C. (1995) immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology*. 60: 53-67.

Sedlik C., Dériaud E. and Leclerc C. (1997). Lack of Th1 or Th2 polarization of CD4+ T cell response induced by particulate antigen targeted to phagocytic cells. *International Immunology*. 9: 91-103.

Sher A. (1992). Parasitizing the cytokine system. *Nature*. 356:565-566.

Sher A., Coffman R.L., Hieny S., Cheever A.W. (1990). Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 and anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of Immunology*. 145: 3911-3916.

Swain S.L. (1995). CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview. *Journal of Leukocyte Biology*. 57: 795-798.

Terry R.J. (1994). Human Immunity to Schistosomes: Concomitant Immunity? *Parasitology Today* 10:377-378

Trinchieri G. and Scott P. (1994). The role of IL-12 in the immune response, disease and therapy. *Immunology Today*. 15:460-463.

Trinchieri G. (1997). Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). *Current Opinion in Immunology*. 9: 17-23.

Truyens C., Angelo-Barrios A., Torrico F., Van Damme J., Heremans H., and Carlier Y. (1994). Interleukin-6 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: Effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infection and Immunity*. 62: 692-696.

Urban J.F. Jr., K.B. Madden, A. Svetic, A. Cheever, P.P. Trotta, W.C. Gause, I.M. Katona, and F.D. Finkelman. 1992. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.* 127:205-220.

Urban J.F. Jr., C.R. Maliszewski, K.B. Madden, I.M. Katona, and F.D. Finkelman. 1995. Interleukin-4 treatment can cure established gastrointestinal nematode infections in immunocompetent and immunodeficient mice. *Journal of Immunology*. 154: 4675-4684.

Valdez F., M. Hernández, T. Govezensky, G. Fragoso and E. Sciutto. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of Parasitology*. 80:931-936.

Wilson R.A. (1993). Immunity and immunoregulation in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*. 5: 538-547.

Wynn T.A., Eltoun I., Oswald I.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. *Journal of Experimental Medicine*. 179: 1551-1556.

Wynn T.A., Jankovic D., Hieny S., Zioncheck K., Jardieu P., Cheever A.W. and Sher A. (1995). IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2 dependent pathology in the absence of endogenous IFN- γ . *Journal of Immunology*. 154: 3999-4010.