



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MECANISMOS DE POLARIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE: DESCRIPCION INMUNOLOGICA DEL EFECTO DE LA DOSIS ANTIGENICA EN MODELO MURINO CON CISTICERCOSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

HECTOR FRANCISCO VALDERRAMA CARVAJAL

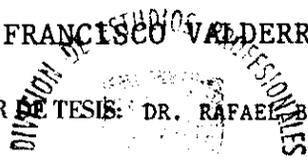
DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL BOJALIL PARRA

1999

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



TESIS CON FALTA DE CARTA



2138



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO**  
**Jefa de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

**MECANISMOS DE POLARIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE:  
DESCRIPCION INMUNOLOGICA DEL EFECTO DE LA DOSIS  
ANTIGENICA EN MODELO MURINO CON CISTICERCOSIS**

realizado por **HECTOR FRANCISCO VALDERRAMA CARVAJAL**

con número de cuenta **9450328-3** , pasante de la carrera de **BIOLOGIA**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

DR. RAFAEL BOJALIL PARRA

*Rafael Bojalil Parra.*

Propietario

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDEZ

*Luis Ignacio Terrazas Valdez*

Propietario

Q.F.B. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA

*Miriam Rodríguez Sosa*

Suplente

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

*Rocio Salceda Sacanelles*

Suplente

M. en C. ADRIANA MUÑOZ HERNANDEZ

*Adriana Muñoz Hernández*

FACULTAD DE CIENCIAS

U N A M.

*Edna M. Suárez Díaz*  
**Consejo Departamental de BIOLOGIA**  
**DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ**  
**COORDINADORA DE BIOLOGIA**



**DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez bajo la dirección del Dr. Rafael Bojalil Parra y la asesoría del Dr. Luis Ignacio Terrazas Váldez y la Q.F.B. Miriam Rodríguez Sosa. Ha sido financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto : 0535PM)

## AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a mi director de Tesis Dr. Rafael Bojalil Parra, por haberme brindado su confianza y oportunidad de realizar mi Tesis en su laboratorio.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Váldez, por su amistad y por haber supervisado mi trabajo y toda su orientación en la realización de esta tesis. A la M. en C. Miriam Rodríguez Sosa, por su paciencia, consejos y ayuda durante mi estancia en este laboratorio y por ser una excelente compañera de trabajo así como una excelente maestra y amiga. Gracias.

A la Dra. Rocio Salceda Sacanelles por su valiosa opinión en este trabajo, así como durante mi carrera. A la M. en C. Adriana Muñoz por todos sus comentarios y recomendaciones.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", en especial a las químicas Socorro, Marú, Herlina y Sylvia, Valentín, por sus comentarios y por todo el apoyo recibido durante mi estancia en este lugar.

Al Dr. Tomas Barrientos por todo lo que ha hecho por mi y por mi familia ya que ha sido para mi un ejemplo a seguir.

Y a todas aquellas personas que estuvieron conmigo incondicionalmente desde los inicios de mis estudios hasta la culminación de estos. Mil gracias

## DEDICATORIAS

Con todo mi cariño, amor, admiración y agradecimiento a mis padres, por todo el apoyo que me han brindado durante mi formación personal y profesional, no tengo palabras para expresar lo mucho que los amo y agradecerles, gracias a ustedes pude culminar esta etapa tan importante de mi vida que me abre camino para seguir adelante con mi trabajo y estudios. GRACIAS.

A mi abuelita por todos tus consejos, cuidados y por estar siempre pendiente de mi vida, muchas gracias.

A la memoria de mi abuelito Alejandro Carvajal Hernández y de mi tía Carmen Ortiz González, por todos sus consejos y momentos vividos con ustedes gracias donde quiera que estén.

A mis hermanos que amo y todo por lo que hemos pasado Ricardo por tu compañía y los buenos momentos; Aurora por tus consejos y tu manera de ser conmigo y Clemente por siempre apoyar y saber que cuento contigo.

A mis tíos y primos Ricardo, Guillermo Héctor, Mary, Flor, Claris, Marú, Judith, Cary, Ramón, Lucy, Vero, Alex Gaby, Salus y Luzma.

A Laura, por todo lo que me ayudaste en mi formación y los momentos más difíciles de mi vida.

A María Elena Torres por tu apoyo y compañía durante este tiempo.

A mis amigos Rogelio Madrueño, Cynthia Galicia, Ariana Arriaga, Erika Zaba, Juajo Ulloa, Verónica Espinosa, Felipe Larrinúa, Sebastian y Rodrigo Martínez, Perla, Luis Montiel, Ale Fernández, Rubén Sánchez, Sandra García, Michael Granados, Manuel Quiroz, Daniel Olivares, Rafael Cervera, Israle, Romi, Tere, Gaby, Zayda y Karla Carranza, Eugenio

Bartilotti, Armando Moreno y Carlos Nieto, gracias por todas las experiencias y consejos que he pasado y compartido con ustedes, muchas gracias.

A mis amigos de la prepa: Angélica Lesso, Claudia Nelson, Jorge Acevedo y muy especialmente a una super amiga Viviana Motta gracias.

A mis de la facultad Verónica Solares, Pilar Camacho, Rodrigo Calderón (especialmente para ustedes, querido grupo complemento para siempre), Daniela Pedroza, Maika Rosada, Leonor Solis, Edith Macos , Sylvia Sura, Omar Arellano, Ursula Gonzáles, Demon, Toño, Ericka Marce, Samantha de la Gala, Anna, Vietmin, Sole, Norman Mercado, Miguel Rivas, Marquitos, Rashidi Springall, Yvonne, Victor y a todos aquellos cuates que comparti momentos tan especiales y muy chidos, durante toda la carrera.

A todo el personal de las Empresas Macco, Villa Clemente, Sanimovil, Sanifiesta 2000 y COMECI por todo lo que se ha logrado juntos y en especial a Guille y Karina por su apoyo recibido y al Lic. Raúl Bustos por todos consejos y orientaciones como amigo mil gracias.

\*Una dedicatoria muy especial a Alberto Chui, gracias por todo.

CONTENIDO	No. de Página.
1. ABREVIATURAS .....	7
2. RESUMEN .....	9
3. INTRODUCCIÓN .....	10
3.1 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL SISTEMA INMUNE .....	10
3.2 SISTEMA Y RESPUESTA INMUNE .....	13
3.3 MECANISMOS DE POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE .....	20
3.3.1 Naturaleza del antígeno .....	20
3.3.2 Vía de entrada del antígeno .....	22
3.3.3 Cronicidad del estímulo .....	24
3.3.4 Tipo de células presentadoras .....	24
3.3.5 Moléculas coestimuladoras .....	25
3.3.6 Citocinas .....	27
3.3.7 Dosis administrada de antígeno .....	28
4. ANTECEDENTES .....	31
5. HIPOTESIS .....	34
6. OBJETIVOS .....	35
7. MATERIAL Y METODO .....	36
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	43
Carga parasitaria.	
Respuesta proliferativa de linfocitos de bazo a Con A y Ag de <i>T. crassiceps</i> .	
Medición de citocinas en suero.	
Medición de citocinas en sobrenadantes de cultivos de linfocitos en respuesta a Con A.	
Producción de anticuerpos.	
9. DISCUSION .....	69
10. CONCLUSIONES .....	79
11. BIBLIOGRAFÍA .....	80

## I. ABREVIATURAS

[H <sup>3</sup> ] TdR	Timidina tritiada.
Ag	Antígeno.
APC	Células presentadoras de antígeno.
CD	Grupo de diferenciación.
Células NK	Células Asesinas Naturales.
CO <sub>2</sub>	Bióxido de carbono.
Con-A	Concanavalina A.
CPM	Cuentas por minuto.
DTH	Reacción de hipersensibilidad retardada.
EAE	Encefalomiелitis experimental murina.
IFN-γ	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina.
IL	Interleucina.
ip	Intraperitoneal
LAK	Células asesinas activadas por citocinas.
LT	Linfotoxina.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
MPB	Proteína básica de mielina.
NaCl	Cloruro de sodio.
NH <sub>4</sub> Cl	Cloruro de amonio.
NO	Oxido Nítrico.
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
PBS-BSA	Sol. Amort de fosfatos con albúmina.
PBS-T	Sol. Amortiguadora de fosfatos Tween
pH	Potencial de hidrógeno.
RI	Respuesta Inmune
rpm	Revoluciones por minuto

SN

TCR

Th

TNF- $\alpha$

Sobrenadante

Receptor de células T.

Células T cooperadora.

Factor de necrosis tumoral - alfa.

## 2. RESUMEN.

Entre los diferentes factores biológicos que están involucrados en la polarización de la respuesta inmune están la naturaleza, la vía de entrada del antígeno, así como, la cronicidad del estímulo antigénico, el tipo de células presentadoras, las moléculas coestimuladoras y sobre todo el microambiente de citocinas. En el caso particular de la dosis antigénica se ha reportado que el uso de bajas dosis promueven una respuesta tipo Th1, mientras que el uso de altas dosis, una Th2, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la administración de una misma cantidad de antígeno dosificado diferencialmente sobre la polarización de la respuesta inmune, buscando que el uso de bajas dosis de antígeno promovieran y perpetuaran una respuesta tipo Th1 más prolongada, proveyendo una mayor resistencia al parásito en el modelo de cisticercosis murina causado por *Taenia crassiceps*, en la cual existe una clara polarización de la respuesta inmune. En fases tempranas de la infección, hay respuesta tipo Th1, con niveles altos de IL-2 e IFN- $\gamma$ , acompañada por una buena respuesta a la concanavalina A y anticuerpos de la subclase IgG2a, todo esto asociado con un bajo crecimiento parasitario. Conforme avanza la infección, existe una transición a una respuesta tipo Th2 la cual presenta niveles altos de IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, baja respuesta a la concanavalina A y niveles significativos de anticuerpos IgG1 e IgG2b, asociada con un incremento considerable en el crecimiento parasitario evaluando si los diferentes tratamientos protegían o hacían más susceptibles a los ratones a esta infección. Los resultados del grupo control coincidieron con reportes anteriores (Terrazas et al., 1998). Por otra parte, los grupos con dosis +/- y -/+ fueron los que presentaron el menor número de parásitos, esto asociado con una proliferación que disminuyó conforme avanzó la infección, pero fue mayor que en los grupos control, CTE y U, niveles bajos de IL-4 y altos de IFN- $\gamma$  en suero, y en los sobrenadantes, niveles considerables de IFN- $\gamma$  e IL-2 y bajos de IL-4 e IL-10 con la presencia de un perfil mixto de anticuerpos IgG1 e IgG2a, donde la primera subclase presentó los niveles más bajos con respecto a los grupos con dosis CTE, U y control, mientras que los niveles IgG2a fueron los más elevados en estos grupos, perfilando una respuesta tipo Th1 protectora, la cual se mantuvo presente hasta la octava semana de infección, pero esta no fue del todo resuelta. Por el contrario, los grupos con dosis CTE y U, presentaron resultados similares a los del grupo control siendo los que mayor carga parasitaria presentaron, (el grupo CTE fue ligeramente menor con respecto al control), acompañado con una disminución considerable en la respuesta proliferativa, niveles similares de IFN- $\gamma$  e IL-4 en sueros, en sobrenadantes niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  altos en etapas tempranas y disminuyendo conforme avanzó la infección, IL-4 e IL-10 estuvieron desde etapas tempranas manteniéndose hasta la octava, niveles considerables de IgG1 mayores a los de IgG2a mostrando evidentemente una respuesta tipo Th2 la cual estuvo presente mucho más tempranamente favoreciendo así una mejor instalación y crecimiento parasitario. Con base a lo anterior, se abre la posibilidad de poder proponer nuevas estrategias de tratamiento usando la dosis antígeno de manera diferencial, para controlar el desarrollo de esta parasitosis como el de otras, por ejemplo en el caso de la cisticercosis porcina

### 3. INTRODUCCIÓN.

#### 3.1 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL SISTEMA INMUNE

---

Uno de los mayores atributos con los que cuentan los seres vivos es el proceso de autorregulación que les permite enfrentar condiciones adversas del medio ambiente gracias a su capacidad de amortiguamiento. Dicha capacidad se encuentra controlada a través de sus diferentes mecanismos homeostáticos, permitiendo así, que las especies sean capaces de radiar, explorar y colonizar nuevos hábitats. Todas las condiciones a las cuales se someten los organismos deben ser reconocidas, aceptadas, y procesadas. La respuesta a estas condiciones se dan a nivel metabólico, hormonal e inmunológico (Stebbing y Healt, 1984). Los animales cuentan con un sistema de defensa el cual se caracteriza por tener la capacidad de **reconocer, procesar y eliminar** estructuras extrañas o no propias por diferentes procesos; uno de ellos es la fagocitosis, esta consiste en la ingestión de partículas grandes o de microorganismos enteros mediante la formación de vesículas grandes intracelulares, además de formar vías protectoras tanto humorales o citotóxicas, dirigidos contra estructuras antigénicas propias y/o no propias

El proceso de **reconocimiento** es el principal mecanismo en el cual se basan todos los sistemas de defensa. El reconocimiento en principio implica un tipo de comunicación de un individuo con su ambiente. Cada organismo determina los mecanismos con los cuales puede realizar un procesamiento de la información que recibe para generar una respuesta en la célula. A nivel molecular este mecanismo se basa en interacciones “no covalentes “ entre dos moléculas donde la primera contiene información que es complementaria para la otra, la

cual presenta la capacidad de reconocer y recibir la información. A la primera se le denomina señal y a la segunda receptor. Este tipo de interacciones permite que el organismo cuente con los mecanismos básicos con los cuales pueda distinguir entre lo propio y lo no propio (Sima y Vetvicka, 1990).

El **procesamiento**, puede entenderse como el transporte de la señal recibida en el receptor hacia el interior celular y su posterior traducción en un mensaje molecular, el cual va a llevar este mensaje de manera específica y posteriormente su subsecuente análisis a partir de la señal recibida. Este análisis determina los eventos precisos de la respuesta, la cual es la parte final de la maquinaria de defensa. En este procesamiento de la respuesta, la fagocitosis, tiene un papel crucial. Por otra parte, la cooperación establecida entre las poblaciones celulares especializadas implica, conocer las necesidades de las partes efectoras de defensa, es decir, la respuesta (Sima y Vetvicka, 1990).

Este proceso de **respuesta** difiere de los de reconocimiento y procesamiento en cuanto a sus características únicas como son: la especificidad, la rapidez, la eficacia y la existencia de una memoria. Este proceso se puede dividir en una respuesta regulada por células, (respuesta celular) y en otra regulada por factores solubles (respuesta humoral), cada uno coordinado por poblaciones celulares muy bien definidas. Estos dos tipos de respuestas pueden ser específicas o no, mas no actúan aisladamente, por lo que hay una cooperación para regular cualquier desequilibrio interno que se presente regresándolo a su estado homeostático inicial (Sima y Vetvicka, 1990).

Entre mayor sea el grado de complejidad de un organismo y su jerarquía biológica, mayor es el grado de organización de su control homeostático, lo que provee a los sistemas

biológicos de una mayor capacidad de respuesta al someterse a diferentes presiones adversas del medio (Bronowski, 1970).

La evolución que se ha presentado en los sistemas homeostáticos y la complejidad de estos, ha involucrado a los procesos metabólico, neuroendócrino e inmunológico. En el caso de este último y en particular a la inmunidad es una función estructural de los animales que depende estrictamente tanto de su organización molecular y celular así como de su panorama tisular (Fox, 1985).

Se piensa que la aparición de la inmunidad pudo haber estado relacionada con el proceso de adaptación y selección de los organismos. Además las innovaciones de los sistemas de defensa de los primeros organismos, se desarrollaron con la adquisición de nuevos genes estructurales los cuales determinaron nuevas y diferentes estructuras morfológicas así como procesos morfo funcionales, asegurando de esta manera, el desarrollo de nuevos patrones de regulación y control de estos procesos (Sima y Vetvicka, 1990).

Debe considerarse que todas las especies animales son producto de un proceso de co-evolución, ya que se han relacionado con otros organismos a lo largo de su evolución y por lo tanto, también han involucrado a sus sistemas de defensa (Löther, 1985).

Los procesos fisiológicos han sido modificados como consecuencia de las presiones en los mecanismos que actúan sobre estas funciones, como son presión de selección, mutación, procesos relacionados con la radiación adaptativa (epigénesis) y la apropiada adaptación a nuevas condiciones (Bronowski, 1970).

### 3.2 SISTEMA Y RESPUESTA INMUNE.

---

El sistema inmune es el encargado de la protección del organismo a sustancias y microorganismos ajenos a él. Está constituido por un conjunto de órganos, células y moléculas que son reguladas por diferentes procesos de manera coordinada y colectiva. Por otra parte, la respuesta inmune consta de un conjunto de mecanismos homeostáticos coordinados cuyo destino es el de eliminar microorganismos patógenos y otras sustancias exógenas con capacidad antigénica (Lewin, 1995, Abbas et al., 1997 y Roitt, 1998). La inmunidad de un organismo comprende una serie de reacciones que se dan en contra de agentes infecciosos y microorganismos extraños como son bacterias, virus, hongos, macromoléculas (proteínas y polisacáridos) entre otras. Las diversas células que constituyen al sistema inmune, se encuentran distribuidas en todo el organismo, acumulándose predominantemente en los órganos linforeticulares, tales como, ganglios linfáticos, bazo, médula ósea, timo y los tejidos linfoides asociados a las mucosas de los intestinos y del sistema genito-urinario así como del árbol respiratorio. Esta diversidad de células al asociarse con diferentes factores moleculares que participan en el desarrollo y funcionamiento de este sistema como el plasma, citocinas, hormonas, iones, moléculas nutritivas, que en conjunto, son responsables de realizar los eventos de la respuesta inmune constituyen al sistema inmune. Todas las células que intervienen en las RI se originan de células madres hematopoyéticas totipotenciales (Fig. 1, Abbas et al., 1997).

El sistema inmune ha evolucionado lo que permite a los organismos protegerse de las condiciones ambientales adversas a las que son sometidos. La razón de ser y la importancia del sistema inmune es el de distinguir lo propio de lo ajeno (Abbas, 1997).

Para que un organismo pueda sobrevivir se requiere de la capacidad y habilidad de presentar una respuesta inmune contra lo ajeno y diferenciando de lo propio. La capacidad de defensa que presenta un organismos al momento del contacto con otro organismos parásito o antígeno, es la culminación de un conjunto complejo y altamente organizado de interacciones tanto celulares como moleculares entre el sistema inmune y el resto del cuerpo (Abbas et al., 1997; David y Huston, 1997)

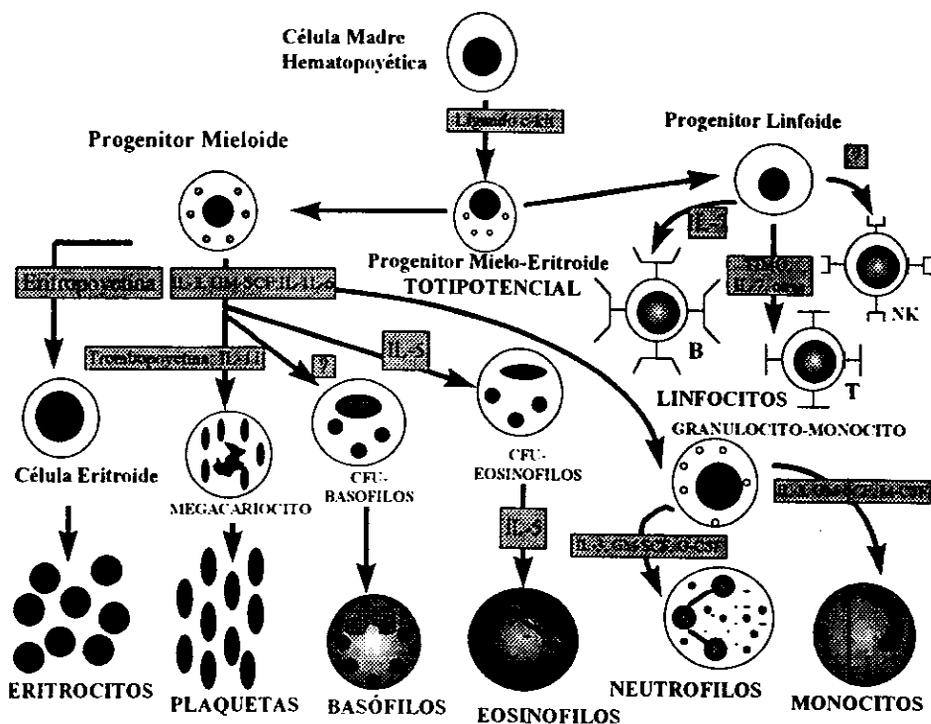


Fig. 1. Arbol hematopoyético. Durante el desarrollo hematopoyético, los diferentes linajes celulares se derivan de una misma célula madre hematopoyética la cual tiene la característica de ser totipotencial. Existen factores y señales que participan en la maduración de los diferentes linajes celulares hematopoyéticos generando microambiente necesarios para la determinación y diferenciación de cada una de los linajes celulares. CFU= Unidad formadora colonial. IL = Interleucina; GM-CSF= Factor estimulador de colonias de granulocitos (Abbas et al., 1997).

La parte celular del sistema inmune representada por los leucocitos incluye a los granulocitos, células presentadoras de antígeno (APC) y los linfocitos. El conjunto de granulocitos, también conocidos como polimorfonucleares abarca a los neutrófilos, los eosinófilos, basófilos y mastocitos. Por otra parte los neutrófilos, los monocitos y los macrófagos son importantes en el procesamiento de antígenos, además de participar en la respuesta inflamatoria (especialmente en contra de bacterias y enfermedades relacionadas con la activación de algunas vías del complemento). En el caso de los macrófagos y monocitos, estos, están especializados en el procesamiento y presentación del antígeno para el caso de la respuesta inmune adquirida, en la cual, participan junto con las poblaciones celulares antes mencionadas así como células de Langerhans y de Kupffer (cuya función es encontrar y procesar el antígeno en la piel y en el hígado, respectivamente) y células dendríticas foliculares, que se localizan predominantemente en tejidos linfoides y son las células con mayor potencial para presentar antígeno. Toda esta estirpe celular expresa dos tipos de moléculas denominadas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), con las clases I y II, el cual sirve para presentar el antígeno previamente procesado a través de mecanismos intracelulares estableciendo el reconocimiento de los diferentes antígenos para los receptores de las células T (TCR del inglés: T Cell Receptor). Dicho complejo molecular es el encargado de presentar al antígeno, el cual fue previamente procesado por las APC ya sea en un contexto de MHC de clase I (péptidos generados en el citosol) o de clase II (peptidos procesados en endosomas y lisosomas derivados de endocitosis y son generalmente exógenos) con una unión por lo general no-covalente (Abbas et al., 1997, Watts, 1997, Stites et al., 1996). Tanto la expresión de moléculas MHC como la

presentación de antígenos procesados sobre éstas determina, si los linfocitos interactúan o no contra sustancias u organismos extraños (Abbas et al., 1997).

Por otra parte, la población encargada de mediar la inmunidad principalmente está representada y controlada por los linfocitos y los fagocitos (macrófagos y monocitos) (David y Huston, 1997).

La población de linfocitos se divide en tres grandes grupos: a) linfocitos T, b) linfocitos B y c) células asesinas naturales o NK (del inglés: Natural Killers cells) (Lewis y Harriman, 1996).

Los receptores de las células T tienen la función de unirse a los antígenos procesados (en péptidos pequeños), mostrados propiamente por las células presentadoras de antígeno (APC), como por ejemplo, los macrófagos, (Brodsky y Cuargliardi, 1991).

En el caso de las células B se diferencian fenotípicamente de las células T por la expresión de moléculas transmembranales en su superficie celular denominadas inmunoglobulinas (Ig), estas, pueden unirse de manera independientemente a un antígeno no procesado por células APC (Schartz et al., 1992). Estas células también pueden procesar y presentar Ag en el contexto de moléculas MHC.

Las células NK, son un grupo celular que morfológicamente parecen linfocitos largos y granulares que se diferencian de los T y B porque carecen de TCR o IgG transmembranales respectivamente, en su lugar, presentan moléculas de superficie como CD16 (FcγRIII, receptor para inmunoglobulinas de la subclase IgG) y CD56 (molécula de adhesión celular-1) (Trincheri, 1989), mientras que las células T y B tienen la capacidad de establecer una respuesta inmune clonal específica, las células NK proveen una respuesta

inmune no específica directa citotóxica en contra de infecciones virales y células tumorales. (Fearon y Locksley, 1996).

La población de células T dependiendo de su actividad biológica, ha sido dividida en dos subclases de células: células con actividad citotóxica -Tc- (del inglés T cytotoxic cell), y células cooperadoras o ayudadoras -Th- (del inglés: T helper cells). Estas células presentan marcadores de superficie característicos conocidos como CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>-</sup> (Godfrey y Zlotnik, 1993), éstas últimas tienen la capacidad de reconocer y destruir células infectadas por virus, cooperar con los linfocitos B en la producción de anticuerpos a través de la expresión del receptor CD40L. Las células TCD4<sup>+</sup> son responsables de funciones cooperadoras en el control de la respuesta inmune (Seder y Le Gross, 1995).

En base al perfil de citocinas que secretan los linfocitos Th CD4<sup>+</sup>, después de un estímulo antigénico, se han dividido en dos subpoblaciones celulares las cuales se han denominado Th1 y Th2 (Mosmann, et al., 1986). Tanto las poblaciones de células T efectoras Th1 y Th2 se originan del mismo precursor, el cual proviene de una población de linfocitos CD4<sup>+</sup> no activado (virgen o naive), conocidos como Th0 los cuales secretan citocinas de ambas subpoblaciones celulares (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) (Fig. 2, Mosmann y Sad, 1986; Mossman y Coffman, 1989) y el destino de esta diferenciación de los linfocitos depende de varios factores, el tipo de antígeno, cronicidad del estímulo, vía de entrada, las citocinas, etc. Una vez que la subpoblación se ha diferenciado, se producen citocinas que suprimen la diferenciación de una subpoblación hacia otra, lo que trae como resultado el incremento de la polarización de la respuesta inmune. Hasta el momento no se han podido identificar marcadores fenotípicos característicos en estas subpoblaciones celulares con los

cuales puedan ser clasificadas (Mosman y Sad, 1986; Mosmann y Coffman, 1989; Abbas et al., 1997).

Las citocinas actúan sobre más de un tipo celular y generalmente tienen diversos efectos aún sobre células del mismo linaje (Fig. 1, Abbas et al., 1997). La complejidad que se puede incluir a esto, es que cada tipo de célula en el sistema inmune responde a más de un tipo de citocina (Mosmann y Coffman, 1989).

Las clonas de células de ratón del subtipo Th1 que producen altos niveles de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  (linfotóxina -LT-) son las responsables de la inmunidad celular o citotóxica y de las funciones inflamatorias además, inducen la activación de macrófagos y promueven las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH), activación de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas y de células NK así como la diferenciación de las células LAK (Fig. 2, Mosmann y Coffman, 1987, Mosmann y Sad, 1996)

Las clonas celulares de ratón del subtipo Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, generando una respuesta inmune de tipo humoral que a su vez se relaciona con la proliferación y diferenciación de linfocitos B acompañada con la producción de anticuerpos principalmente de la clase IgG1 e IgE, inmunidad de las mucosas, regulada por las células cebadas, así como la inducción de la diferenciación y proliferación de eosinófilos y la facilitación de la producción de IgA (Fig. 2, Mosmann y Sad, 1986; Mosmann y Coffman, 1987).

La producción de IFN- $\gamma$  inhibe la proliferación de las células Th2 y la secreción de IL-4 e IL-10 (ésta última liberada principalmente por macrófagos) inhibe Th1, así como la acumulación de eosinófilos (Mosmann y Sad, 1986). En cambio, la secreción de IL-4, IL-10

e IL-13 inhibe la acción de IFN- $\gamma$  sobre sus células blanco y elimina la producción de esta citocina por células de la subpoblación Th1 (Seder y Le Gros, 1994)

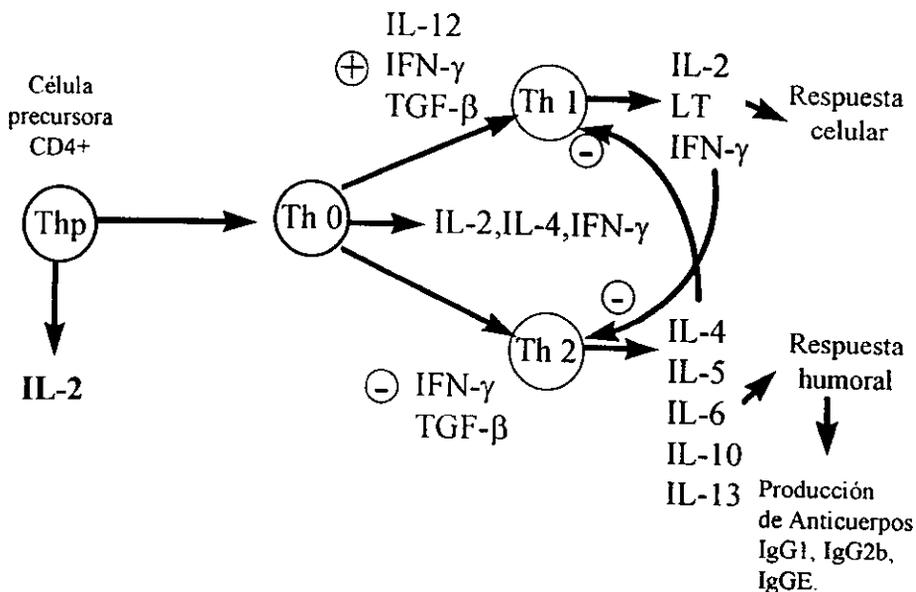


Fig. 2. Representación del perfil de citocinas secretadas por células precursoras T CD4<sup>+</sup>, posterior a la activación de estas previamente estimuladas por un estímulo antigénico (infección, presencia de un agente infeccioso, presentación de antígeno por APC, etc), generando un tipo celular clonal Th0 que presentará un tipo de respuesta específica Th1 o Th2 dependiendo del tipo de estímulo que reciba, el cual será determinante para la polarización de cada tipo de respuesta. Se observa en el esquema que el perfil secretado por un tipo de respuesta Th1 que se caracteriza por altos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-2 principalmente, regula de manera negativa al tipo de respuesta Th2 y viceversa. La respuesta tipo Th2 se caracteriza por secretar altos niveles de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 principalmente. Además se ha relacionado al tipo de respuesta Th1 con una respuesta celular, en la cual lleva a cabo la activación de otras estirpes celulares, producción de anticuerpos de la subclase IgG1, mientras que la respuesta tipo Th2 con una respuesta tipo humoral y con el incremento de anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2b e IgE (Mosmann y Sad, 1986; Mosmann y Coffman, 1989).

Durante la evolución, algunos organismos patógenos han adquirido la capacidad de producir factores mediadores que modifiquen la respuesta inmune del huésped permitiendo su propia sobrevivencia, tal es el caso de *Leishmania major* (modula la producción de óxido nítrico -NO-), *Trypanosoma cruzi* (utiliza proteínas de superficie para inhibir a TNF- $\alpha$ ,

más no a IL-1) y algo similar ocurre con *Brucella sp.* (Fresno et al., 1997) Por lo anterior, es claro que diferentes agentes patógenos son capaces de elaborar moléculas que permiten estimular y regular la producción de citocinas del huésped, a favor de ellos (Fresno et al., 1997).

### 3.3. MECANISMOS DE POLARIZACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

---

Con base a los trabajos realizados por Mosmann y colaboradores (1986 y 1989) que consistieron en identificación de las subpoblaciones celulares T CD4 + cooperadoras y la producción de distintos patrones de citocinas, se han generado valiosas herramientas para estudiar cómo las diferentes poblaciones celulares inmunes efectoras pueden recluirse *in vivo* durante una infección. Las clonas Th1 y Th2 producen ciertos factores que sirven como autónomos y al mismo tiempo, suprimen la actividad de la otra, polarizando así la respuesta inmune.

Por otra parte, diferentes investigaciones se enfocaron en definir los factores que determinaban la polarización de las células T hacia subtipos celulares Th1 o Th2, después de su activación por el reconocimiento de un antígeno (Ag) utilizando principalmente por virus y/o parásitos. Algunos investigadores han propuesto que la diferenciación de las células Th0 puede ser influida por la condición genética de individuo (Nicholson y Kuchroo, 1996; Romagnani, 1998), pero también por otros factores no propios de él, siendo algunos de estos los siguientes:

**NATURALEZA DEL ANTÍGENO.** Los estudios relacionados con la naturaleza, la estructura del antígeno y la generación de diferentes respuestas inmunes (resistencia o susceptibilidad) se iniciaron enfocándose en el análisis de la función del antígeno

(Romagnani, 1998). Los primeros trabajos en que se utilizaron péptidos modificados en residuos de aminoácidos fueron en el modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), en cual se reconoció de manera general como células responsables de la respuesta eran las clonas de células CD4<sup>+</sup> y principalmente del subtipo Th1, demostrando además que el péptido de mielina básica Ac 1-11 (MBP Ac1-11), era capaz de proteger contra la enfermedad al cambiar un sólo aminoácido (Wraith et al, 1989). Con base a lo anterior, se propuso que el fenómeno que se generaba era debido a un bloqueo del MHC, pero estudios posteriores demostraron que esto no se cumplía, para todos los péptidos (Smilek et al., 1991; Wauben et al., 1992). La identificación de diferentes antígenos que habían sido modificados en diferentes residuos de aminoácidos, tenían la capacidad de antagonizar (De Magistris et al., 1992), anergizar (Sloan et al, 1993) o parcialmente activar (Evavold y Allen, 1991) a clonas de células T, sugiere que probablemente exista cierta capacidad de los antígenos modificados para determinar la diferenciación de células Th hacia uno de los subtipos celulares Th1 o Th2. Posteriormente esto fue comprobado de forma parcial, al emplear antígenos modificados nuevamente en residuos de aminoácidos, teniendo diferentes afinidades por las moléculas MHC; conservando aquellos los residuos que interactuaban con el TCR, se demostró que la inmunización con péptidos de baja afinidad inducía una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas tipo Th2 con una producción de anticuerpos tipo IgG1, mientras que estudios *in vivo*, utilizando ligandos de alta afinidad incrementó la frecuencia de las células productoras de IFN- $\gamma$ , con producción de anticuerpos tipo IgG2a características todas de una respuesta Th1(Kumar et al., 1995, Chaturvedi et al., 1996).

Aunque no se ha establecido el mecanismo por el cual, la manipulación en el nivel de activación de un complejo péptido MHC reconocido por células T pueda influenciar el tipo de respuesta de las células T, existen trabajos que apoyan la teoría que la polarización de la respuesta inmune hacia los subtipos Th1 o Th2 se encuentra mediada por el tipo de antígeno, indicando que existen antígenos (inclusive de una misma fuente) que inducen una respuesta Th1 y otros que inducen específicamente una tipo Th2, independientemente, si estas respuestas son o no protectores (Constant et al., 1995; Hosken et al., 1995; Nicholson et al., 1995; Scott, 1991).

**VIA DE ENTRADA DEL ANTÍGENO.** El sitio de entrada del antígeno juega un papel importante en la determinación del tipo de respuesta así como el curso que toman algunas infecciones (Romagnani S., 1998). En el caso de la infección cutánea murina por *Leishmania major*, se sabe que existen diversos factores capaces de influir en el desarrollo de esta infección. Inicialmente se trató explicar algunas variables que influían sobre la entrada del antígeno, como son la temperatura local de la piel, la microvasculatura linfática o la distribución de las células de Langerhans (Reiner y Locksley, 1995). Dichos factores podrían contribuir en las diferencias observadas en la severidad y el desarrollo de la infección. Se ha demostrado en esta enfermedad que existe una respuesta Th1, la cual tiene una función protectora mientras que una respuesta tipoTh2 permite la progresión de la infección (Miralles et al, 1994). Por otra parte diversas investigaciones se han canalizado principalmente en considerar la importancia del lugar en el que se aloja el patógeno, lo que es sumamente importante para establecer un tipo determinado de respuesta, por lo que se ha llegado a concluir que para algunos agentes infecciosos fundamentalmente parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Reiner et al., 1994), *L. donovani*, *Mycobacterium*

*tuberculosis* (Martin et al, 1995), *Toxoplasma gondii*, y *Plasmodium sp* (Stevenson y Tam, 1993), la respuesta inmune dependiente de una respuesta Th1 que provee protección al hospedero, es decir, capacidad para eliminar a estos agentes (Gessnar et al , 1993; Miralles, et al., 1994; Kemp et al., 1993). Por el contrario tanto una respuesta inmune que se encuentra mediada por Th2 es ineficiente y en ocasiones hasta facilita el desarrollo de estas infecciones (Pearce y Reiner, 1995). Por otra parte, en las infecciones que son causadas por bacterias y algunos parásitos extracelulares como es el caso de algunos helmintos intestinales como *Trichuris muris* (Else y Grecnis, 1991), *Trichinella spiralis* (Grecnis et al., 1991) y *Necator americanus* (Pritchard, 1995), una respuesta Th2 es necesaria para generar protección y una respuesta tipo Th1 hace susceptible al organismo (Hermanek et al 1993). Con base en lo anterior, se ha propuesto que la respuesta inmune depende del tipo de parásito, es decir, si este es intracelular o extracelular, se desencadenará una respuesta inmune de tipo Th1 o Th2 respectivamente (Reiner y Locksley, 1993). Parece ser que la polarización de la respuesta inmune hacia una tipo Th1 o Th2 puede estar determinada ya sea por la vía de entrada o bien por el lugar de alojamiento del antígeno. Actualmente aún no se cuenta con el conocimiento de todos los mecanismos con los cuales se pueda describir cómo ocurren estos procesos de polarización, aunque existen casos como es el de la administración oral del Ag, que induce una tolerancia a este por diferentes vías, incluyendo procesos como la apoptosis, la anergia de células T reactivas antigénicas (Chen et al., 1994) y la inducción de células T reguladoras del fenotipo Th2 (Chen et al., 1995; Gajewski et al., 1994). Por otra parte, otros trabajos han demostrado que la administración vía nasal puede determinar la polarización de la respuesta de las células T CD4<sup>+</sup> hacia un tipo Th1 o Th2 (Romagnani, 1998). El caso de la ovoalbumina (OVA) inhalada o inyectada, presenta una

tendencia a inducir una respuesta de tipo Th2, lo mismo se observa en el caso de la inmunización con OVA o toxina tetánica que también inducen una respuesta similar en tejidos asociados a mucosas (Xu-Amano, et al., 1993; Marianaro et al., 1995). La exposición epicutánea de antígeno también puede inducir una respuesta predominante del tipo Th2 con una producción alta de IgE. (Wang L-F., et al., 1996).

**CRONICIDAD DEL ESTIMULO.** Para demostrar como influye la cronicidad del estímulo antigénico en el cambio de una respuesta tipo Th1 a una Th2, existen evidencias de enfermedades e infecciones crónicas, donde un estímulo permanente es determinante y al mismo tiempo contribuye al cambio de una respuesta inicial Th1 a una del tipo Th2 (Rook et al., 1994; Gorczynsky, 1995). En el caso de infecciones parasitarias, por ejemplo, el de *Brugia malayi* se ha reportado que durante las dos primeras semanas de infección con el parásito hay un perfil característico de citocinas Th1, con altos niveles de IFN- $\gamma$  y después del día 21 se observa un incremento significativo de IL-4 e IL-5 con la disminución de IFN- $\gamma$  dependiente de IL-10, lo cual, induce una respuesta de tipo Th2 (Pearlman et al., 1993). Otro ejemplo es el modelo experimental de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, en el cual, se ha demostrado que existe un cambio de una respuesta Th1 (caracterizada por una producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y la presencia de IgG2a principalmente) a una respuesta Th2 (caracterizada por producción de IL-4, IL-6 e IL-10, en etapas crónicas de la infección, además de la producción de anticuerpos IgG1), conforme avanza la infección (Terrazas et al., 1998). Lo anterior muestra como influye la cronicidad del estímulo antigénico en el cambio de una respuesta Th1 a una Th2.

**TIPO DE CELULAS PRESENTADORAS.** Últimamente se ha dado un mayor enfoque a la posibilidad de que el tipo de respuesta inmune está determinada por la

naturaleza de las células presentadoras de antígeno. Se han reportado algunas diferencias en el tipo de respuesta, Th1 o Th2, en base al tipo de APC (William y Unanue, 1990). Por otra parte, se ha observado que las células B tienen un papel importante en la producción de IL-4, debido a la activación proveída por las células T cooperadoras, que además ayudan a inducir la producción de anticuerpos (Stockinger et al., 1996). En general tanto los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B, pueden inducir tanto una respuesta Th1 o Th2, dada por el propio ambiente de citocinas (Finkelman, 1995)

**MOLECULAS COESTIMULADORAS.** Existen diferentes moléculas de naturaleza estimuladora sobre la superficie de las APC y a su vez que se encuentran relacionadas en la activación y función de las células T (Romagnani, 1998). Este conjunto de moléculas han recibido una atención considerable como posibles señales reguladoras para el desarrollo de una respuesta Th1/Th2. Los mecanismos por los cuales se genera este fenómeno no han sido completamente descritos, aunque existen reportes, los cuales han demostrado que, moléculas como B7-1 y B7-2 participan como moléculas coestimuladoras o cofactores necesarios para una óptima proliferación de un tipo celular u otro, es decir, que el tipo de respuesta Th1 y Th2 necesita reconocer la señal de proliferación provista por los diferentes tipos de células presentadoras de antígeno (Romagnani, 1998). En el proceso de iniciación de la RI, las células CD4<sup>+</sup> vírgenes al entrar en contacto con algún Ag y se diferencian a células T efectoras productoras de citocinas (T helper). Para tal diferenciación se requieren señales asociadas al TCR antígeno-específico y de otras coestimuladoras, en particular CD28 y su homólogo CTLA-4 las cuales interactúan con receptores B7-1 y/o B7-2. Estas moléculas de superficie son expresadas por células APC profesionales como son los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas (Gause et al., 1997). Últimamente

diversos estudios sugieren que en ciertos modelos de enfermedades autoinmunes, el bloqueo de B7-1 vs B7-2 puede afectar el curso de la enfermedad (Kuchroo et al., 1995; Ranke et al., 1995; Lenschow et al., 1995), esto es apoyado con otros estudios que sugieren que el bloqueo de moléculas como CD4, CD30 y CD2, afectaba el fenotipo de las células T y en consecuencia la susceptibilidad a la infección. Otras investigaciones han reportado que mediante el uso de APC estimuladas con péptidos para estimular a células T CD4<sup>+</sup> han demostrado que además de ser necesaria la interacción con moléculas B7 para la producción óptima de citocinas, existe una respuesta diferencial para las señales coestimuladoras, es decir, la producción de IL-2 por células T fue más dependiente de B7 que la producción de IL-4 (Dubey et al., 1996). Estos hallazgos son consistentes con estudios en los cuales usaron clones de células tipo Th1 y Th2 donde las células Th1 fueron más dependientes de B7 que las clones Th2 (McArthur et al., 1993; McKnight et al., 1994). Por lo tanto, la vía coestimuladora CD28/CTLA-4-B7-1/B7-2 parece ser una más de los factores sobre el balance de citocinas que afecta la diferenciación de las células T.

Por otra parte, los trabajos realizados por Gajewsky y colaboradores (1990, 1994), han propuesto en base a la transducción de la señal asociada al reconocimiento antigénico por el TCR, la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular hace que la célula sea capaz de diferenciarse hacia un tipo Th1 o Th2. Además se han comparado clones de células tipo Th1 con clones tipo Th2 y se ha visto que las células Th2 no acoplan Ca<sup>2+</sup> intracelular de manera aleatoria, mientras que las células tipo Th1 sí. Sin embargo, estos trabajos tenían la desventaja de que las células utilizadas eran de distintos organismos con distinta especificidad antigénica y que por lo tanto muchas variables pudieron haber contribuido a estos resultados. Esto resultó en un estudio realizado posteriormente por Sloan y Lancaster (1993) donde realizaron

comparaciones entre las clonas de tipo Th1 y Th2 que maduraron *in vitro* a partir de un precursor común. Para esto utilizaron células vírgenes de un ratón transgénico que estimularon con antígeno bajo condiciones que favorecieran ya fuera uno u otro fenotipo y midieron la habilidad de las células diferenciadas Th1 o Th2 para utilizar las vías de señalización de  $Ca^{++}$ . Sus resultados mostraron que ciertamente las células T vírgenes están acopladas a la vía de  $Ca^{++}$ , pero la señal es amplificada significativamente por una subsecuente estimulación antigénica bajo condiciones que generan células tipo Th1. En contraste, cuando las células maduran hacia un fenotipo Th2 pierden selectivamente la habilidad para usar esta vía de señalización. Parece ser entonces que las células de tipo Th1 tienen diferentes requerimientos para activarse que las células de tipo Th2.

**CITOCINAS.** Además de todos los factores antes mencionados los cuales parecen tener efecto sobre la diferenciación de la respuesta inmune, actualmente se acepta ampliamente que las citocinas son el mejor estímulo y factor determinante para la polarización de la respuesta inmune hacia un tipo Th1 o Th2 (Fig. 2). Se sabe que las citocinas, por sí mismas determinan la diferenciación de las células vírgenes y probablemente de memoria. Aunque son varias las citocinas que intervienen en la respuesta inmune, ya sea del tipo Th1 o Th2, se acepta que tanto para humanos como en ratones la presencia de la interleucina 12 (IL-12), la cual es sintetizada principalmente por células presentadoras de Ag, como macrófagos, monocitos y células dendríticas (Magram et al., 1996), promueve la diferenciación de las células Th0 hacia Th1 porque estimula la secreción de IFN- $\gamma$  por las células T activadas por un antígeno y la presencia de interleucina 4 (IL-4) induce la diferenciación hacia el tipo Th2 (Afonso, et al., 1994), ya que regula de manera negativa la respuesta Th1 de manera indirecta, dado que afecta la función de las células presentadoras

de Ag (Pearlman, 1993). Además induce la producción y secreción de IFN- $\gamma$  por este tipo de subpoblación celular (Th1). Por otra parte la presencia de IL-4, induce la diferenciación hacia Th2 (Afonso et al., 1994, Bradley, et al., 1995), al igual que IL-10 que regula negativamente la respuesta Th1 de manera indirecta ya que afecta la función de las células presentadoras de Ag (Pearlman, 1993) y sobre todo la IL-4 suprime la secreción de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Swain, et al., 1993). Dichos efectos son ejercidos principalmente por IL-12 e IL-4, las cuales también pueden estar presentes tempranamente en una respuesta inmune. IL-12 es una citocina que tiene efectos reguladores sobre las células T y NK (Nicholson y Kuchroo, 1996; Romagnani S., 1998). Tanto la IL-2 como la IL-4, parecen ser las citocinas más importantes que regulan la diferenciación hacia alguno de los subtipos celulares si es que están presentes tempranamente en la respuesta inmune. Las citocinas, que son determinantes para mantener o polarizar la respuesta de los linfocitos Th0 hacia un tipo de respuesta Th1 o Th2 son IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Dichas citocinas al estar presentes a diferentes tiempos de la infección son determinantes para inducir hacia un tipo de respuesta Th1 o Th2 ((Nicholson y Kuchroo, 1996; Romagnani, 1998)

**DOSIS ADMINISTRADA DEL ANTÍGENO.** Diversos trabajos han demostrado que otro de los factores que determina la clase de respuesta inmune hacia un tipo humoral o celular es la dosis administrada de antígeno. Estudios recientes sugieren que las células T CD4<sup>+</sup> efectoras diferenciadas pueden producir diferentes patrones de citocinas dependiendo de la dosis de antígeno usada. Bajas dosis desarrollan una respuesta Th1, mientras que el uso de altas dosis inducen la producción de anticuerpos y la predominante producción de citocinas del tipo Th2. (Liblau, 1995; Romagnani, 1998). Por citar un ejemplo de esto, un experimento realizado en ratones Balb/c infectado con *L. major*. En dicha infección

disminuyó el número de parásitos por la inyección inicial con un número pequeño de parásitos. Estos ratones fueron resistentes a pequeños inoculos de *L. major*, pero además fueron resistentes cuando se les retó cuatro meses después con dosis de parásitos que en teoría deberían ser letales. Estos ratones desarrollaron una inmunidad mediada por células caracterizada por un predominio de IFN- $\gamma$  más que la respuesta dominante de IL-4 que normalmente presentan estos ratones en la infección con *L. major* (Bretscher et al., 1992). Otro ejemplo es el trabajo de Brancroft y colaboradores en 1994 mostrando que una cepa de ratón (Balb/K) que normalmente genera una respuesta inmune tipo Th2 que infiere resistencia en contra de *Trichuris muris* se puede volver susceptible si se infecta con niveles bajos de este parásito (menos de 40 huevos). En este caso observaron una baja producción de citocinas del tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-9) y una producción elevada de las tipo Th1 (IFN- $\gamma$ ) que está asociada a la susceptibilidad. En ambos casos se cree que las bases inmunológicas que explican el fenómeno están relacionadas a una dramática alteración en la polarización de la respuesta de las células CD4<sup>+</sup> dependiendo de la dosis utilizada. En los dos casos estaban involucrados principalmente antígenos complejos, por lo que podrían estar presentes diferentes densidades que variarían dependiendo de las dosis de antígeno administrada. Por otra parte se sabe que la concentración de antígeno influye en el fenotipo de la población de células T (Miralles et al., 1994, Nabors et al., 1995). Esto está relacionado con el nivel de activación del complejo MHC-péptido, el cual es reconocido por las células T y puede ser determinante con el fenotipo de las respuestas de las células T CD4<sup>+</sup> (Nicholson y Kuchroo, 1996). El efecto de la dosis de antígeno en el desarrollo directo de una respuesta Th1 o Th2 puede además estar determinado por el tipo de células APC utilizadas (O'Gaea y Murphy, 1996). Por lo tanto, bajas dosis de Ag promueven la

#### 4. ANTECEDENTES.

---

La cisticercosis causada por *Taenia solium* es un problema socioeconómico en particular México así como Latinoamérica, Asia y África, debido a diversos factores de salud principalmente condiciones de salud deficientes e higiene personal. Para el caso particular de México, una de las condiciones que permiten la mayor transmisión es que más del 40 % de la carne de puerco consumida en México proviene de zonas donde la sanidad es sumamente deficiente, además de que la inspección sanitaria de la carne es inadecuada, entre otros.

El ciclo de vida de este parásito incluye: fase larval, que ocurre tanto en el cerdo como en el humano y se ve completado cuando el hombre ingiere carne de puerco infectada. La cisticercosis porcina es además necesaria para mantener el ciclo de vida de este parásito (Valdez F., et al., 1994, Brusca y Brusca, 1994).

En los últimos años el modelo experimental murino de cisticercosis causada por *T. crassiceps* ha sido ampliamente utilizado para estudiar y determinar los diferentes factores biológicos que participan en la inducción tanto de la susceptibilidad como de la resistencia en el desarrollo de esta parasitosis y en la relación huésped-parásito. Las similitudes estructurales, morfológicas e inmunológicas que comparte *T. crassiceps* con otros cestodos y en particular con *T. solium*, ha permitido relacionar tanto resultados experimentales como inmunodiagnósticos de otras infecciones que afectan al hombre (Huerta et al, 1992). Además este modelo presenta características particulares como, es que en su fase de metacéstodo se reproduce de manera asexual por gemación, manteniéndolo así fácilmente por pases intraperitoneales (i.p.) de un ratón a otro (Fig. 3).

## Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

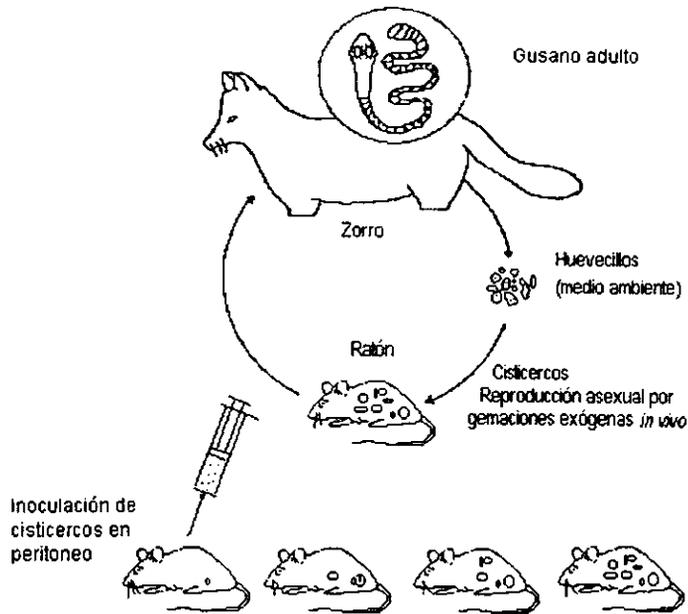


Fig. 3. Representación del ciclo de vida de *T. crassiceps*. Dicho parásito es un gusano planiforme (Platyhelmintho) cuya estadio adulto por lo general se encuentra en el intestino de la zorra roja Europea y Norteamericana. En el intestino son producidos los huevecillos los cuales son liberados al medio por las heces, que son consumidas por roedores que adquieren la infección en el momento de la ingesta de las heces. En estos se desarrolla la etapa larval (conocido como *Cysticercus longicollis*) a cisticercos el cual se puede reproducir asexualmente por gemación. El ciclo se completa cuando el ratón es consumido nuevamente por la zorra (Brusca y Brusca., 1990; Toledo A., 1997). Por otra parte, este parásito puede ser usado para fines experimentales y puede mantenerse en diferentes cepas de ratones por medio de pases intraperitoneales (i.p.) usando cisticercos de tamaño menor a 2mm, sin gemas y que provengan de una infección murina no mayor a tres meses.

Las células T cooperadoras (Th) juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria a través de su capacidad de secretar diferentes citocinas durante infecciones murinas experimentales, donde las subpoblaciones celulares Th1 y Th2 influyen sobre diferentes componentes de la respuesta del hospedero para responder en contra de patógenos por medio de la expresión diferencial de sus perfiles de citocinas

(Mosmann y Coffman, 1989; Fresno et al., 1989). La evolución de diferentes infecciones parasitarias se ha asociado con la regulación de las respuestas del tipo Th1 y Th2. En la mayoría de los casos, la respuesta del tipo Th1 parece restringir infecciones intracelulares como son *Leishmania major* (Doherty et al, 1996, Reiner et al., 1994), *Trypanosoma sp.* (Silva et al., 1992), y *Plasmodium sp.* (Stevenson y Tam, 1993) e inclusive algunos parásitos extracelulares como *Schistosoma mansoni* (Yamashita y Boros, 1991) y recientemente descrito para *Taenia crassiceps* (Terrazas et al., 1998). En el caso de la respuesta Th2 parece ser más favorable para el establecimiento de estas infecciones (Terrazas et al., 1999).

Experimentos previos han indicado que las células T están relacionadas en la respuesta inmune que restringe a la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* (Bojalil et al., 1993, Terrazas et al, 1998). Por otra parte se ha reportado que ratones infectados con *T. crassiceps* muestran una baja respuesta a la Concanavalina A (Con A) y altos niveles de IL-4 en infecciones avanzadas (Terrazas et al., 1998). Otros factores biológicos que modulan considerablemente esta infección causada por *T. crassiceps* son: el características genéticas referentes al MHC, y el microambiente hormonal donde el 17- $\beta$  estradiol es permisible para el parásito, mientras que los androgenos son restrictivos (Terrazas et al., 1994). Ambos factores posiblemente ejercen su efecto afectando la respuesta de las células T (Terrazas et al., 1998).

## 5. HIPOTESIS.

---

Actualmente se sabe que el desarrollo de diferentes enfermedades parasitarias se encuentra regulada por diversos factores biológicos, tanto del hospedero como del parásito, los cuales modifican la respuesta inmune logrando que el hospedero presente una resistencia o susceptibilidad como son: la naturaleza y la vía de entrada del antígeno, cronicidad del estímulo, el tipo de células APC, moléculas coestimuladoras, el perfil de citocinas y en particular, la dosis antigénica ya que se ha reportado en diferentes infecciones parasitarias que el uso de bajas dosis de antígeno producen una respuesta de tipo Th1, mientras que altas dosis generan una respuesta de tipo Th2 por lo que se propone lo siguiente: Si el uso de bajas dosis de antígeno inducen una respuesta -Th1-, es posible obtener una respuesta de este tipo más prolongada, proveyendo así al hospedero la capacidad de presentar una respuesta protectora en contra del parásito.

## 6. OBJETIVOS

---

**GENERALES.** Evaluar el efecto que tienen diferentes concentraciones de un extracto antigénico de *Taenia crassiceps* en la fisiología del sistema inmune .

### **PARTICULARES**

1. Caracterizar el tipo de respuesta inmunológica inducida por el antígeno de *T. crassiceps* en el modelo de cisticercosis murina.
2. Determinar si las dosis de antígeno administradas son capaces de inducir diferentes tipos de respuestas en el modelo de cisticercosis murina.
3. Demostrar que la administración de una dosis total (500 µg/ml) de antígeno, administrado diferencialmente (fraccionado: dosis de mayor a menor concentración, de menor a mayor concentración, dosis constante y una dosis única) puede influir en el tipo de respuesta inmune.
4. Determinar el tipo de respuesta inmune en cada uno de los grupo con las diferentes dosis antigénicas fraccionadas.
5. Establecer la correlación entre el estado inmunológico generado por el tratamiento de las diferentes dosis antigénicas y la susceptibilidad al parásito.

## 7. MATERIAL Y METODO

---

**7.1 ANIMALES:** Se utilizaron ratones hembras (Balb/c) de 6 a 8 semanas de edad, los cuales son susceptibles a *T. crassiceps*. Los ratones se dividieron en 6 grupos: 5 experimentales para ser tratados con diferentes dosis de antígeno total de *T. crassiceps* y 1 grupo de ratones sanos.

**7.2 PARÁSITOS.** Se utilizaron metacéstodos de *T. crassiceps* cepa ORF extraídos de la cavidad peritoneal de hembras infectadas Balb/c. Los cisticercos fueron lavados 4 veces en buffer de fosfatos (PBS; 0.15 M NaCl, 0.01 M solución de buffer de fosfatos, pH 7.2) y fueron seleccionados para la infección de los ratones aquellos que no rebasaran un tamaño mayor de 2 mm.

**7.3 OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO.** Del stock de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*, previamente sacrificados por dislocación cervical, se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal a través de una incisión en el abdomen, recolectándolos en un vaso de precipitado con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2. Posteriormente se separaron los cisticercos de menor tamaño (2mm de diámetro, sin gemas) utilizados para reinfectar a otros para stock. De los cisticercos restantes (los de mayor tamaño), se lavaron 4 veces con PBS hasta tenerlos completamente limpios. Se secaron sobre papel filtro para absorber la mayor cantidad de PBS sobrante posible. Una vez secos, se centrifugaron a 14,000 rpm durante una hora. A esta velocidad se logró romper las membranas del cisticercos, obteniendo el fluido vesicular, el cual fue utilizado como antígeno total. A este se le añadieron inhibidores de proteasas (Leupetin [2 µg/ml] y Aproptinin [2 µg/ml] Sigma) se congeló a -70° C, hasta su cuantificación de proteína total por el método

de Lowry (Lowry et al., 1951). Esta fracción sirvió como antígeno para la detección de anticuerpos (IgG1 e IgG2a) específicos y para estimular a los cultivos celulares.

**7.4 INMUNIZACIÓN CON DOSIS ANTIGÉNICA DE *T. crassiceps* e INFECCIÓN CON CISTICERCOS DE *T. crassiceps*.** Del Ag obtenido se hicieron diluciones de las dosis para cada grupo experimental, iniciando de una concentración de 500 µg/ml con diferentes intervalos de tiempo entre cada dosis (Tabla 1). TRATAMIENTOS: A) De mayor a menor concentración de Ag (+/-) [250 µg/ml a 0.1220 µg/ml], B) De menor a mayor concentración de Ag (-/+) [0.1220 µg/ml a 250 µg/ml], C) Dosis constante (CTE) [41.7 µg/ml], D) una dosis única (U) [500 µg/ml], E) PBS (pH 7.2) como control positivo (C/C) y F) ratones sanos (N) como control negativo. A cada grupo se les administró la dosis de antígeno (con jeringas de insulina de 1 ml Plastipak con aguja de 0.5 X 16 mm U.T.W.). Los grupos con tratamientos +/-, -/+ y CTE, se administró la primera dosis antigénica y después de esta se continuó con el siguiente intervalo de tiempo: 18, 12, 11, 8, 8, 8, 4, 4, 2, 2, 2 horas (Tabla 1). Al grupo con dosis U, se le administró la dosis única junto con la dosis final (12ª) de los demás grupos.

Tabla 1. Tratamientos de dosis administrados en los diferentes grupos de ratones hembras Balb/c (por lo menos n=5), en los intervalos de tiempo correspondientes. El total de dosis administrada fue de 500 µg/ml. Se hizo un sistema de diluciones 1:2, doce veces iniciando con una concentración inicial de 250 µg/ml. Posterior al tratamiento, los ratones fueron infectados con 25 cisticercos via i.p.

Grupos	Dosis administrada (Intervalos de tiempo -hrs-)												Total de Ag admon (µg/ml)
	1(18)	2(12)	3(11)	4(8)	5(8)	6(8)	7(4)	8(4)	9(2)	10(2)	11(2)	12(oo)	
+/-	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	1.95	0.975	0.48	0.24	0.12	499.82
-/+	0.12	0.24	0.48	0.975	1.95	3.9	7.8	15.6	31.25	62.5	125	250	499.82
CTE	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	41.65	499.8
U	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100
C/C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los cisticercos fueron previamente obtenidos de la cavidad peritoneal del ratón, se colocaron en una solución de PBS y se seleccionaron los que tuvieron un tamaño no mayor de 2 mm y carecieran de gemas. Tres días después del tratamiento con las diferentes dosis antigénicas, mediante el empleo de jeringas de insulina se inocularon los ratones con 25 cisticercos y por último se dejó transcurrir el tipo de infección (2, 4 y 8 semanas) para cada grupo de ratones.

**7.5 EVALUACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA.** Se realizó a través del registro del número total de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal de cada ratón, previamente sacrificados por dislocación cervical.

**7.6 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN SUERO.** Se obtuvo sangre de los ratones previamente anestesiados con éter a través del plexo retroorbital. La sangre se dejó coagular a 37 °C durante 1 hora. Se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el suero, el cual fue congelado a -20 °C hasta su uso. El suero de cada animal se procesó individualmente para evaluar los niveles de IgG1 e IgG2a, (específicos contra antígenos de *T. crassiceps*) por medio de un ensayo de ELISA- indirecto, el cual consiste en lo siguiente. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Corning) con 100 µg de antígeno de *T. crassiceps* (500µg/ml) en un buffer de Tris 0.075 M (pH 7.8), se incubaron estas placas toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavaron dos veces con PBS-Tween (PBS-T), se bloquearon con PBS-BSA 1 % por una hr. Los sueros de los distintos grupos de animales, se colocaron diluidos 1:100 se colocaron por duplicado en PBS-BSA al 1% con 100 µl/pozo y se incubaron 1 hr a 37 °C. Las placas se lavaron nuevamente cuatro veces con PBS-T y se colocaron 100 µl por pozo de los anticuerpos monoclonales diluidos en PBS-BSA 1:50 contra los isotipos de IgG1 e IgG2a (Zymed) marcados con peroxidasa y fosfatasa

respectivamente. Se incubaron las placas a 1 hr a 37 °C. Por último, se lavaron las placas 6 veces con PBS-T y se revelaron con el sustrato ABTS para la IgG1 y con el sustrato para fosfatasa para la IgG2a (Zymed) durante 30 y 60 minutos, se leyeron en un lector de placas de ELISA (Metertech, Sigma 960) a 405 nm.

**7.7 LINFOPROLIFERACION *in vitro*.** Una vez obtenida la sangre, inmediatamente los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se colocaron en alcohol al 50% y en condiciones de esterilidad se obtuvo el bazo de cada uno de los animales y se obtuvieron células linfoides perfundiéndolos con 5 ml de solución de Hanks fría (4°C) (Gibco) a lo largo del bazo. Las células fueron depositadas en cajas de Petri estéril, donde se dejaron reposar para eliminar por sedimentación posibles fragmentos de tejido. Se eliminaron los eritrocitos por medio de un choque osmótico con NH<sub>4</sub>Cl estéril, posteriormente se centrifugó a 1500 rpm a 4 °C durante 3 minutos, para separar los residuos de eritrocitos de los linfocitos. Posteriormente estas células se lavaron tres veces con solución de Hanks frío estéril por centrifugación a 3000 rpm a 4 °C durante 5 min y resuspendieron en 1 ml de medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino/estreptomycin, 1% de aminoácidos esenciales, 25 µM de buffer Hepes y 0.5% de L-Glutamina (todo marca Gibco-BRL). De esta suspensión celular se tomaron 20µl para determinar la viabilidad por exclusión del colorante vital Azul Tripano en una cámara de Neubauer. Se ajustaron a 5,000,000 de células por ml y se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) 100 µl de cada muestra en 100 µl de medio RPMI por triplicado estimuladas con 100 µl de una solución de Concanavalina-A (Con-A) (Sigma) a una concentración de 2 µg/ml disuelta en una solución saturada de NaCl, esterilizada por filtración (MEMED), cuantificada por el coeficiente de extinción con luz ultravioleta a una

resolución de 280 nm y con Ag de *T. crassiceps* a [50 µg/ml]. Las placas fueron incubadas en un ambiente controlado que alcanzó la subconfluencia de 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 19 % de humedad durante 72 h. A las 54 h de cultivos (o durante las últimas 18 h de cultivo) las células fueron marcadas con 0.5 µCi de timidina tritiada (H<sup>3</sup>TdR) (Amersham) en 10 µl de medio RPMI 1640 suplementado. Posteriormente 24 horas después, las células fueron cosechadas en filtro (papel de fibra de vidrio Whatman) y procesadas para determinar la incorporación de radioactividad en las células estimuladas y en los controles. Se cuantificaron las cuentas por minuto (CPM) de los papeles fibra con líquido de centelleo (Whatman) con un contador de centelleo (Beckman LS6000SE). El nivel de estimulación fue determinado mediante la fórmula:

$$NE = \text{CPM células estimuladas} - \text{CPM de las células no estimuladas (basales)}.$$

**7.8 PRODUCCION DE CITOCINAS *in vitro*.** De la misma fracción de células esplénicas obtenidas para los estudios de proliferación, se sembraron 5 X 10<sup>6</sup> células por pozo en placas de cultivo de 24 pozos (Costar), las cuales fueron estimuladas con 2 µg/ml de Con A y con 50 µg/ml de antígeno soluble de *T. crassiceps*. Las placas fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 19% de humedad. Se obtuvieron 200 µl los sobrenadantes de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo, para cuantificar los niveles de las citocinas IL-2 (24 hrs) y 800 µl para las citocinas IL-4, IL-10, e IFN-γ (48 hrs) por medio del ensayo de ELISA.

**7.9 DETECCIÓN Y EVALUACIÓN DE CITOCINAS.** Las citocinas IL-2, IL-4, IL-10, TNF-α e IFN-γ, fueron evaluadas en los sobrenadantes extraídos de los cultivos celulares estimulados con Con-A y Ag, por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Las placas de 96 pozos (High binding, Costar), las cuales se sensibilizaron con 50 µl por pozo

con una concentración de 2 µg/ml del anticuerpo de captura (purified anti-mouse, IL-2 IL-4, IL-10 e IFN-γ, Pharmigen), diluido en un buffer de carbonatos pH 8.2. Se dejaron incubar toda la noche a 4 °C. Transcurrida la incubación, se lavaron dos veces con PBS-T 0.05% y posteriormente se bloquearon con u los cultivos celulares estimulados con Con A y antígeno a solución de albúmina diluida en buffer de fosfatos (PBS-BSA) al 3% con 100 µl/pozo, incubándose dos horas a temperatura ambiente y por último se lavaron nuevamente con PBS-T. La curva de interleucinas con las IL recombinante murina respectivamente por duplicado en los primeros 10 pozos de la placa iniciando con una concentración de 4000 pg/ml de la cual se fueron haciendo diluciones dobles (diez pozos por lo menos). A los pozos restantes de la placa se les adicionaron 50µl de PBS-BSA para después agregar por duplicado 50 µl de las muestras de los sobrenadantes (dilución 1:2). Se incubaron toda la noche a 4 °C. Después de la incubación se lavaron cuatro veces con PBS-T y se agregó el segundo anticuerpo (biotinilado, Pharmigen) con una concentración de 1 µg/ml en una solución de PBS-BSA con una concentración de 1 µg/ml y se agregaron 100 µl/pozo. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos y una vez transcurrida la incubación se lavó seis veces con PBS-T y se agregó a cada pozo 100 µl de estreptoavidina/peroxidasa diluida 1:1500 en PBS-BSA al 1%. Incubando nuevamente temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrida la incubación, se lavaron ocho veces con PBST-T y se reveló con 100 µl de ABTS por pozo. Se leyeron las placas en un lector de ELISA (Metertech, Sigma 960) a 405 nm.

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

---

Con el objetivo de determinar si el efecto de dosis antigénicas en el modelo murino de cisticercosis causado por *T. crassiceps*, modifica el desarrollo de la infección se evaluaron los siguientes parámetros biológicos.

**CARGA PARASITARIA.** Se evaluó el desarrollo de la infección causada por *T. crassiceps* a las 2, 4 y 8 semanas de infección en los grupos experimentales (C/C=grupo control con cisticercos; +/- = mayor a menor concentración; -/+ = menor a mayor concentración; CTE= dosis constante; U= dosis única; N= normales o sanos) infectados con 25 cisticercos de *T. crassiceps* tres días posterior al tratamiento con dosis antigénica con un tamaño menor a 2 mm intraperitonealmente (ip), previamente inmunizados con diferentes concentraciones del antígeno específico de *T. crassiceps* (dosis). En la tabla II, se muestra el número promedio de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones en los diferentes grupos experimentales, así como el porcentaje de crecimiento de los parásitos comparados con el grupo control, considerando el número de parásitos de este grupo como el 100% en cada semana de infección.

TABLA II: Número promedio de cisticercos recuperados y porcentaje de crecimiento en cada grupo de ratones (n=al menos 5 ratones), previamente tratados con la misma cantidad de antígeno pero administrada a diferentes concentraciones (fraccionada: +/-, -/+. CTE y U) a diferentes intervalos de tiempo, durante la 2, 4 y 8 semana de infección.

SEMANAS	C/C		+/-		-/+		CTE		U	
	X	%	X	%	X	%	X	%	X	%
2	43	100	48	116.62	17.6	40.93	17	39.53	26.6	61.86
4	508	100	26.3	5.17	15.6	3.07	18.6	3.66	54.8	10.78
8	505.33	100	14.8	2.42	33.6	6.65	145.16	28.72	318	62.42

Por otra parte, en la figura 4 se muestra los resultados del crecimiento de los parásitos en ratones solamente infectados con cisticercos de *T. crassiceps* así como aquellos que solamente recibieron un tratamiento con dosis de antígeno y en los ratones que recibieron dosis antigénicas fraccionadas.

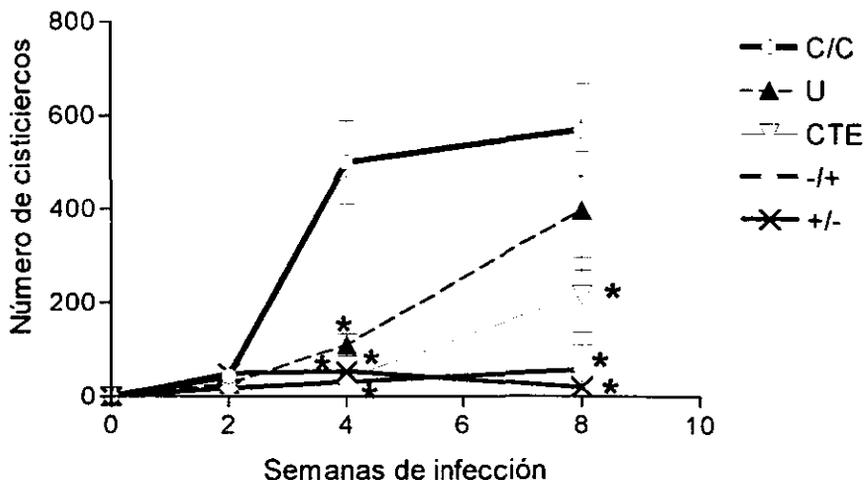


Fig. 4. Número de cisticercos de *T. crassiceps* en ratones hembras Balb/c (n=al menos 5 ratones) a las 2, 4 y 8 semanas de infección en los diferentes grupos tratados previamente con diferentes dosis de antígeno de *T. crassiceps*. C/C= ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* sin recibir tratamiento previo de antígeno; +/- = dosis de antígeno de mayor a menor concentración; -/+ = dosis de antígeno de menor a mayor concentración; CTE= dosis constante de antígeno; U = dosis única de antígeno. Los ratones fueron infectados con 25 cisticercos después del tratamiento y se evaluó el efecto que tuvo el tratamiento previo de dosis sobre la carga parasitaria para cada grupo experimental

Durante la segunda semana de infección, el número de cisticercos recuperados en los grupos tratados con diferentes dosis de antígeno, se encontraron ligeramente por debajo del grupo C/C con 43 (100%), siendo los grupos con el menor número de cisticercos el grupo con dosis CTE con 17 (39.53%) y con dosis -/+ con 17.6 (40.93%), continuando con un ligero incremento en el número de cisticercos los grupos con dosis U con 26.6 (61.86%) y con dosis +/- con 48 (116.62%), éste último, fue el que mayor número de parásitos presentó

e incluso mayor con respecto al grupo C/C (Fig. 4,  $P>0.05$ ). En la cuarta semana de infección, el número de parásitos se incrementó en el grupo C/C a 508 cisticercos (100%), mientras que para el resto de los grupos tratados con diferentes dosis antigénicas, el número de cisticercos recuperados fue menor con respecto este grupo ( $*P<0.05$ ), siendo los grupos con dosis +/- con 26.3 (5.17%), -/+ con 15.6 (3.07%) y CTE con 18.6 (3.66%), los que menor número de cisticercos presentaron entre los grupos experimentales, mientras que el grupo con dosis U tuvo 54.8 (10.78%). Cabe mencionar que al comparar este periodo de infección con el anterior (a la segunda semana de infección), se observó que el incremento se dio principalmente en tres grupos: un incremento drástico en el grupo C/C pasando del número promedio de 43 a 508 cisticercos; el grupo U cuyo incremento fue de 26.6 a 54.8 (100%) cisticercos y el grupo CTE con un incremento pasando de 17 a 18.6 cisticercos (Fig. 4; Tabla II). Por otra parte para los grupos tratados con dosis +/- y -/+ presentaron una disminución en el número de parásitos pasando de 48 a 26.3 y de 17.6 a 18.6 respectivamente. Al comparar los grupos experimentales entre ellos, se observaron diferencias estadísticamente significativas para los grupos con dosis +/-, -/+ y CTE con respecto al grupo de dosis U ( $*P<0.05$ ).

En la octava semana de infección, el mayor número de cisticercos recuperados se encontró en el grupo C/C con 503 (100%) con respecto al resto de los grupos tratados con diferentes dosis antigénicas (Fig. 4; Tabla II). Entre estos, los grupos tratados con dosis CTE y U se recuperaron 145.16 (28.72%) y 318 (62.92%) cisticercos respectivamente, mientras que en los grupos con dosis +/- y -/+ fueron los que menor número de cisticercos presentaron 14.8 (2.92%) y de 33.6 (6.65%) respectivamente ( $*P<0.05$ ). Por otra parte, el grupo con dosis CTE muestra una disminución significativa en la carga parasitaria con

respecto al grupo U, sin embargo en este grupo con dosis CTE no se logró la resolución de la parasitosis.

**RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS DE BAZO A CONCANAVALINA (Con-A) Y ANTIGENO ESPECÍFICO DE *T. crassiceps*.** Con el objetivo de evaluar la respuesta inmune celular en los distintos grupos de animales, los linfocitos obtenidos de los bazos fueron estimulados con Con A y un extracto antigénico soluble de *T. crassiceps* durante las diferentes semanas de infección (2, 4 y 8), para medir posteriormente la respuesta proliferativa por incorporación de [ $H^3$ ] TdR. En la figura 5 A se observa que los linfocitos de ratones únicamente infectados (control: C/C), presentaron una respuesta similar al grupo de ratones normales durante la segunda semana de infección, sin embargo, esta respuesta fue significativamente menor en la cuarta y octava semana de infección (Fig. 5 A; \*P<0.05).

Al comparar la proliferación a la cual los grupos tratados con las diferentes dosis antigénica (+/-, -/+, CTE y U) se observó de manera general presentaron una respuesta proliferativa en respuesta a Con A significativamente menor después del tratamiento (Fig. 5). En el caso del grupo con dosis +/-, este mantuvo el mismo nivel de respuesta hasta la cuarta semana de infección disminuyendo significativamente en la octava semana de infección (Fig. 5B; \*P<0.05). Por otra parte no pudo evaluarse la respuesta de este grupo a la segunda semana de infección debido a contaminación del cultivo. En el grupo con dosis -/+, la respuesta a la segunda semana de infección fue igual que el grupo de ratones N, mientras que durante la cuarta semana de infección presentó una disminución significativa en la respuesta, continuando así hasta la octava semana de infección siendo en este periodo de infección la respuesta más baja que se observó (Fig. 5C; \*P<0.05). Por el contrario, en el

caso de la respuesta proliferativa presentada por el grupo con dosis CTE este presentó una disminución significativa a la segunda y octava semana de infección, mientras que se registró un aumento en esta proliferación durante la cuarta semana de infección (Fig. 5D, \* $P < 0.05$ ).

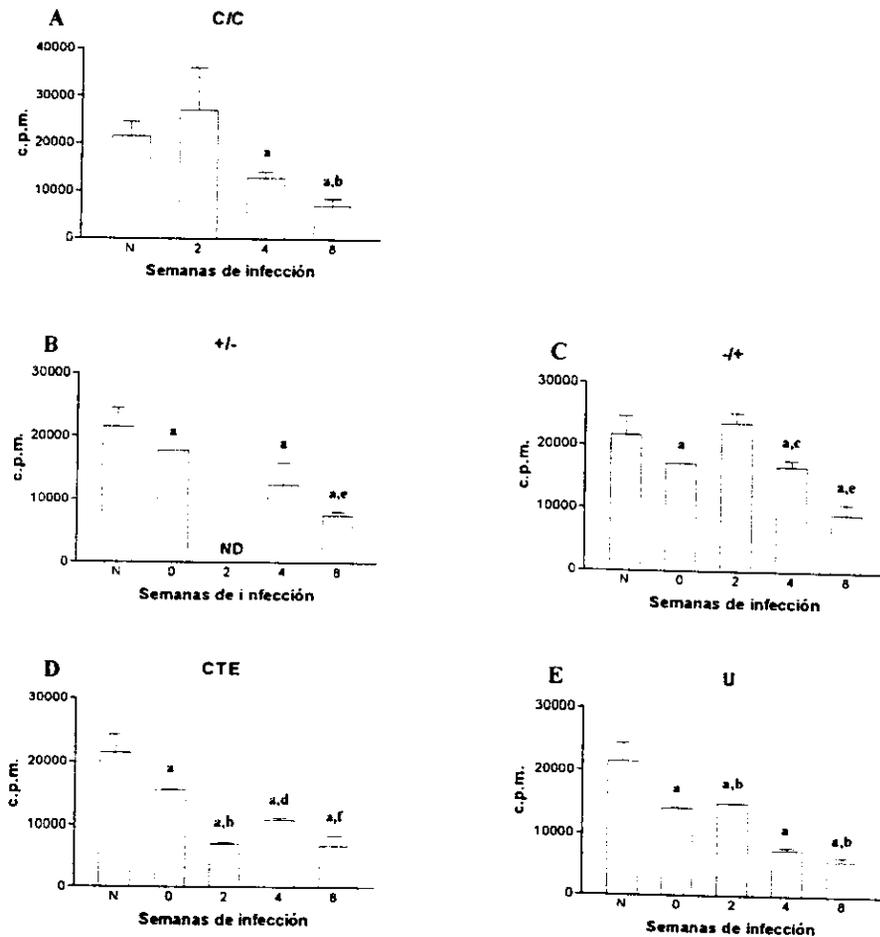


Fig. 5. Proliferación en respuesta a Con A de células de bazo posteriormente al tratamiento con dosis antigénicas fraccionadas así como después de las 2, 4 y 8 semanas de infección. De manera general se observa que hubo respuesta después del tratamiento, la cual cae para los grupos experimentales a la segunda semana de infección (con excepción del grupo +/-), aumenta la respuesta a la cuarta semana y vuelve a decrecer a la octava semana de manera similar para todos los grupos, conforme va avanzando la infección. a= \* $P < 0.05$  comparado con el grupo normal. b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c, d, e y f= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\* $P < 0.05$ )(n=a al menos 5 ratones).

Por otra parte, para el grupo con dosis U, presentó una respuesta significativamente menor desde la segunda semana de infección con respecto al grupo de ratones sanos siendo más evidente esta disminución en la respuesta durante la cuarta y octava semana de infección (Fig. 5E, \*P<0.05). De manera general la respuesta presentada por los linfocitos en presencia de Con A de los grupos experimentales, presentó una cinética de respuesta similar con respecto al grupo C/C, donde, conforme avanza la infección existe una disminución en la capacidad de respuesta de las poblaciones celulares la cual se refleja en la proliferación de cada grupo.

Por otro lado, la respuesta proliferativa de las células de ratones estimulados con el extracto soluble de *T. crassiceps* presentó una respuesta extremadamente baja en los diferentes grupos experimentales durante las semanas de infección.

**MEDICION DE CITOCINAS EN SUERO.** Se cuantificó la concentración sérica de dos citocinas en particular: IFN- $\gamma$  e IL-4, (cada una de ellas determinante y específica para un tipo de respuesta del tipo Th1 y Th2 respectivamente) (Moosman y Coffman, 1986; 1989), en los sueros de ratones sanos (N), ratones con infección sin tratamiento (C/C) y en ratones con tratamiento de dosis de antígeno e infectados con 25 cisticercos de *T. crassiceps* durante la segunda, cuarta y octava semana de infección.

**IL-4:** En la figura 6 se muestran los niveles de IL-4 en el grupo C/C así como para los grupos de ratones previamente tratados con diferentes dosis de antígeno.

Para el grupo C/C (grupo con infección solamente), se registraron niveles significativos de IL-4 en suero a partir de la segunda y cuarta semana de infección (\*P<0.05), posteriormente se incrementaron de manera considerable los niveles de esta

citocina en la octava semana de infección (Fig. 6 A; \*P<0.05). La cinética presentada por la IL-4 coincidió con el crecimiento parasitario (Fig. 6; Fig. 4).

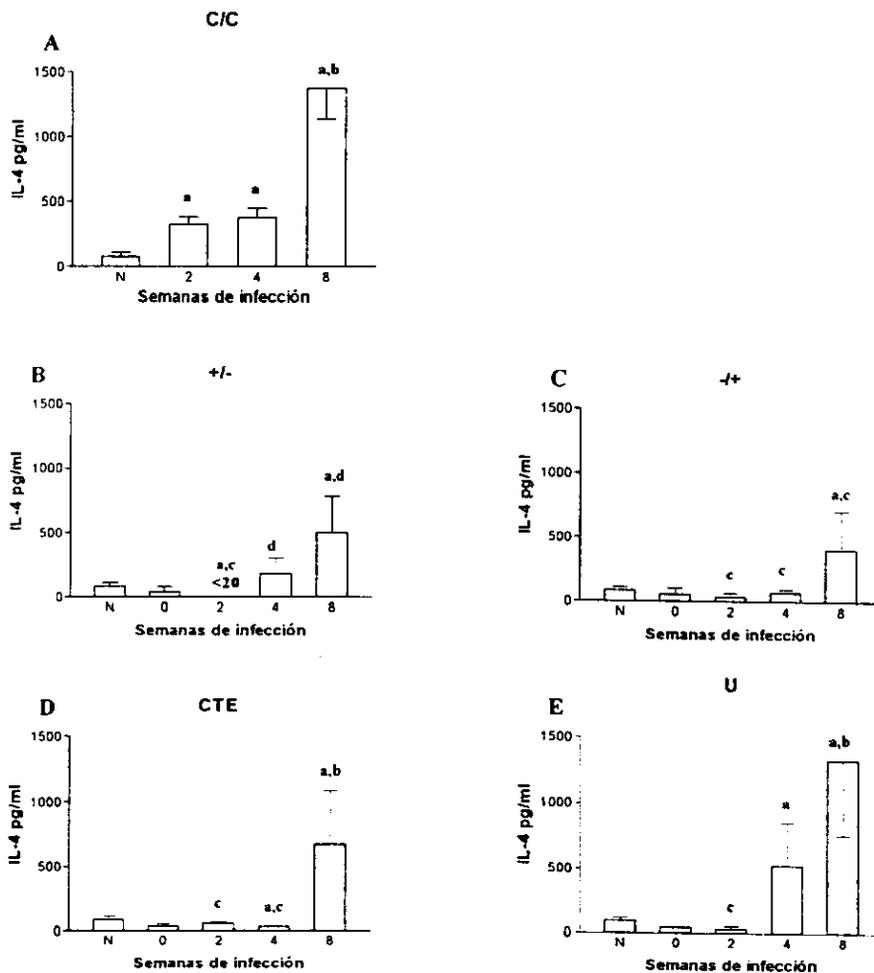


Fig. 6. Niveles de IL-4 en suero de animales ratones hembras Balb/c previamente tratados e infectados después del tratamiento a las 2, 4 y 8 semanas de infección con cisticercos de *T. crassiceps* (n=al menos 5 ratones por grupo). De manera general, los niveles de IL-4, incrementó conforme fue avanzando la infección, siendo más evidente este aumento para el grupo con dosis CTE y sobretodo la dosis U, similar al grupo control, mientras que los grupos con dosis +/- y -/+ fueron menores. a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal; b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c,d= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)(n= al menos 5 ratones)

Por otra parte, se procedió a evaluar los niveles de IL-4 en los grupos con diferentes dosis antigénicas: +/-, -/+, CTE y U (Fig. 6). En el grupo con dosis +/- se registraron niveles bajos de IL-4 posterior al tratamiento con dosis antigénica (0 semanas de infección) y durante la segunda semana de infección. Posteriormente, hubo un aumento en los niveles de esta citocina a partir de la cuarta semana y octava semana de infección (Fig. 6B).

Por otra parte, un comportamiento similar lo tuvo el grupo con dosis -/+. Dicho grupo presentó niveles bajos de IL-4 posterior al tratamiento con dosis antigénica así como durante la segunda y cuarta semana de infección siendo hasta la octava semana cuando se registró un incremento en los niveles de esta citocina (Fig. 6C), que sin embargo, se mantuvieron por debajo de los observados en el grupo control.

El grupo con dosis CTE también presentó niveles bajos de IL-4 posterior al tratamiento con dosis antigénica continuando así durante la segunda y cuarta semana de infección siendo nuevamente a la octava semana de infección cuando existió un aumento evidente en los niveles de esta citocina (Fig. 6D). En el caso del grupo con dosis U los niveles de IL-4 fueron bajos a la segunda semana de infección, pero hubo un incremento significativo durante la cuarta semana de infección, el cual se hizo más evidente hacia la octava semana (Fig. 6E).

**IFN- $\gamma$ .** La figura 7 muestra los niveles de IFN- $\gamma$  en el grupo C/C así como para los grupos de ratones previamente tratados con diferentes dosis de antígeno.

Como se muestra en la figura 7A, los niveles de IFN- $\gamma$  para el grupo C/C, se encontraron significativamente elevados en la segunda y cuarta semana de infección (\* $P < 0.05$ ). Sin embargo, mostraron una drástica disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  en la octava semana de infección. Nuevamente este comportamiento en la cinética de esta citocina

coincide con reportes previos que mencionan que durante etapas tempranas de la infección aumenta y prevalecen niveles altos de IFN- $\gamma$  relacionado con un número bajo número de cisticercos mientras que conforme avanza la infección se presenta una disminución en los niveles de esta citocina y un aumento en el número de parásitos (Terrazas et al., 1998). El grupo con dosis +/- presentó bajos niveles de IFN- $\gamma$  posteriormente al tratamiento y durante la segunda semana de infección, mientras que para la cuarta y octava semanas de infección hubo un aumento evidente en los niveles de IFN- $\gamma$  con respecto al grupo N (Fig. 7B; \*P<0.05). Por otra parte una cinética similar en la producción de IFN- $\gamma$  la presentó el grupo con dosis -/+, siendo nuevamente los niveles más bajos después del tratamiento de dosis antigénica (0 semanas) y en la segunda semana de infección, mientras que se observa un incremento para la cuarta semana haciéndose más evidente este incremento para la octava semana de infección con respecto al grupo N (Fig. 7C; \*P<0.05).

En el grupo con dosis CTE, la producción de IFN- $\gamma$  mostró variaciones durante las diferentes semanas de infección (Fig. 7D). Posterior al tratamiento con dosis antigénica, los niveles de IFN- $\gamma$  presentados fueron prácticamente nulos, mientras que se registró un incremento en los niveles de esta citocina similares a los del grupo C/C (Fig. 7 A y 7D). Posteriormente se dio una disminución en los niveles de IFN- $\gamma$  en la cuarta semana de infección presentando posteriormente un incremento drástico en los niveles de esta citocina para la octava semana de infección. Para el caso del grupo con dosis U, este presentó una cinética similar de los niveles de IFN- $\gamma$  que el grupo con dosis CTE (Fig. 7E). En este caso posterior al tratamiento los niveles de IFN- $\gamma$  fueron bajos, mientras que durante la segunda semana de infección estos niveles aumentaron, teniendo una disminución en la concentración

para la cuarta semana y presentando un incremento drástico en la octava semana de infección (Fig. 7E; \*P<0.05).

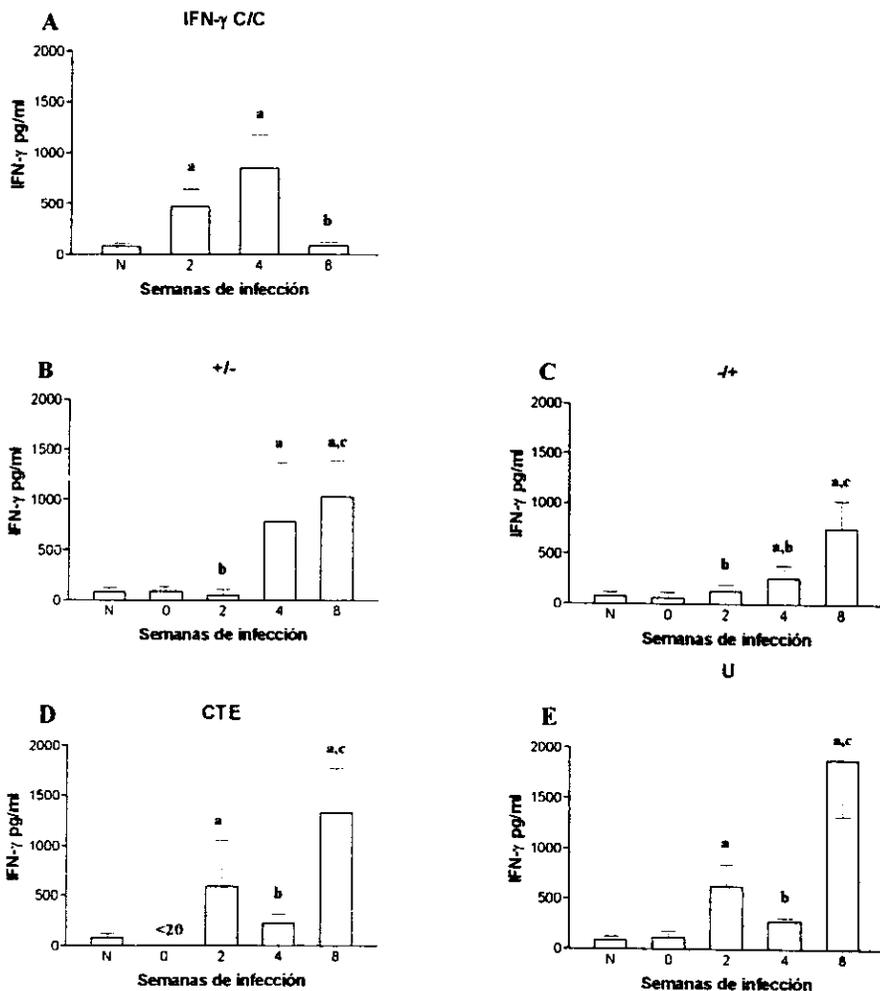


Fig. 7. Niveles de IFN- $\gamma$  en suero de animales ratones hembras Balb/c previamente tratados e infectados después del tratamiento a las 2, 4 y 8 semanas de infección con cisticercos de *T. crassiceps* (n=al menos 5 ratones por grupo). La cinética presentada para los diferentes grupos experimentales aumentó de manera paulatina alcanzando los máximos niveles en la octava semana para los grupos +/- y -/-. Mientras que los grupos tratados con dosis CTE y U, presentaron primeramente un aumento en la segunda con una consecuente disminución en los niveles de esta citocina a la cuarta semana, recuperando drásticamente los

niveles en la octava semana de infección. a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal; b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c.= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)

### **MEDICIÓN DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LINFOCITOS EN RESPUESTA A CONCANAVALINA A (Con A).**

Se evaluó la producción de citocinas por células de bazo en respuesta a Con A y a un extracto soluble de *T. crassiceps* en ratones sanos (N); ratones infectados (C/C); ratones tratados con dosis antigénica +/-, -/+, CTE y U sin infección (0 semanas) e infectados con 25 cisticercos de *T. crassiceps*. De todos los grupos se hicieron las mediciones de las citocinas : IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10.

#### **Citocinas de una respuesta tipo Th1:**

**IL-2:** Los resultados de la producción de IL-2 en el grupo C/C así como en los grupos de ratones con las diferentes dosis antigénicas se muestran en la figura 8.

Durante las etapas tempranas de la infección (2 semanas) los linfocitos de los ratones del grupo C/C presentaron bajos niveles de IL-2 en respuesta a Con A con respecto al grupo N (\*P<0.05). Posteriormente a la cuarta semana de infección los niveles de IL-2 producidos en respuesta a Con A se incrementaron significativamente con respecto al grupo de ratones N (\*P<0.05), registrando posteriormente una baja en los niveles para la octava semana de infección (Fig. 8 A; \*P<0.05). Cabe mencionar que esta cinética presentada por este grupo coincide con reportes previos (Terrazas et al., 1998) en los cuales durante las etapas tempranas de infección (2 y 4 semanas de infección) cuando existe un bajo número de parásitos, hay un incremento en esta citocina y conforme avanza la infección se presenta una disminución considerable en los niveles asociada con un aumento considerable en el número de parásitos (Fig. 4).

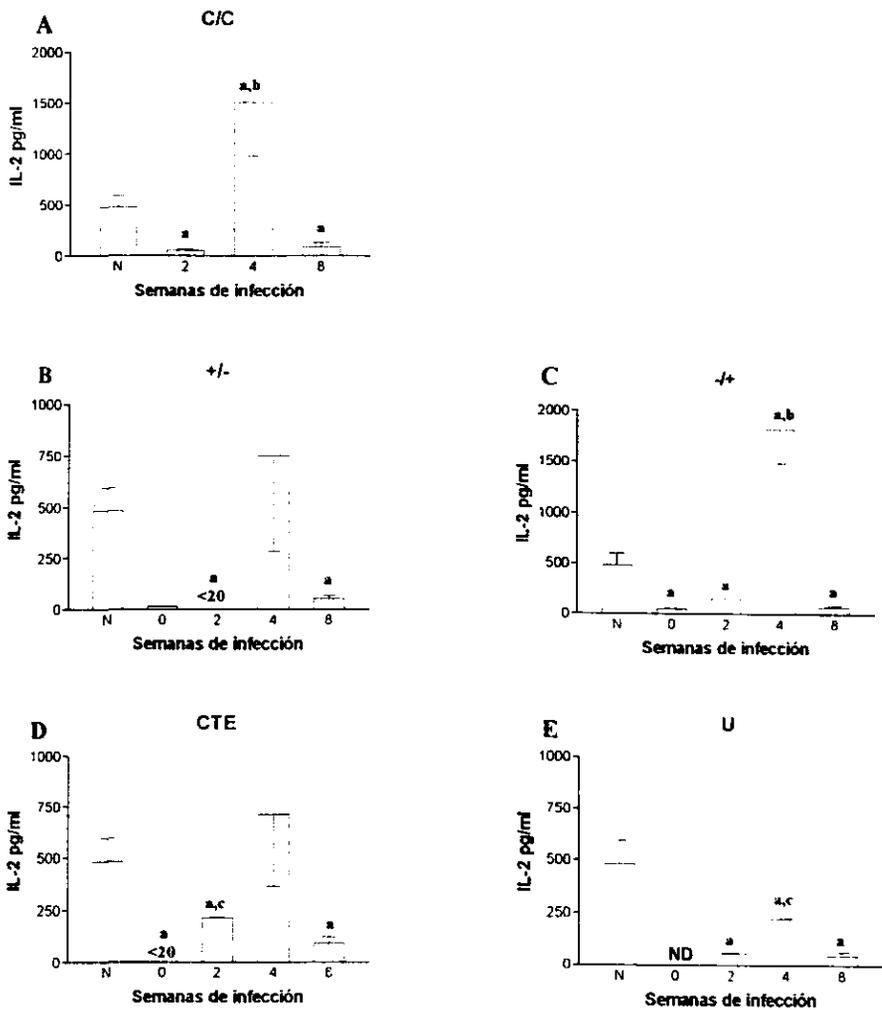


Fig. 8 Producción de IL-2 en sobrenadantes de células de bazo de ratones en respuesta a Con A, previamente tratados e infectados después del tratamiento a las 2, 4 y 8 semanas, con cisticercos de *T. crassiceps* (n=al menos 5 ratones por grupo). La cinética de IL-2 para el grupo control coincidió con reportes anteriores. La producción de ésta citocina presentó los niveles más altos a la cuarta semana para los grupos con dosis +/-, -/+ y CTE, disminuyendo considerablemente en la octava semana, mientras que el grupo con dosis U, fue el que presentó los niveles más bajos durante toda la infección a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal; b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c.= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)

Al comparar la producción de IL-2 en los diferentes grupos experimentales, se observa una cinética diferente para cada uno de los grupos. En el caso del grupo grupo tratado con dosis +/- presento bajos niveles de IL-2 en respuesta a Con A, posterior al tratamiento de dosis antigenica (Fig. 8B; \*P<0.05). Durante la segunda semana de infección estos niveles fueron prácticamente nulos con respecto al grupo N. En la cuarta semana de infección la producción de esta citocina aumentó considerablemente y disminuyendo nuevamente para la octava semana de infección (Fig. 8B). Al comparar este grupo con el grupo C/C, los linfocitos presentaron una cinética similar en cuanto a la producción de IL-2 en respuesta a Con A, en los mismos tiempos de infección pero con niveles más bajos de esta citocina que el grupo C/C (Fig. 8 A).

Por otra parte el grupo tratado con dosis -/+, produjeron bajos niveles de IL-2, presentando a partir de la segunda semana de infección un ligero incremento en los niveles de IL-2 en respuesta a Con A. Posteriormente se registró un aumento considerable en los niveles de esta citocina para la cuarta semana de infección (\*P<0.05) coincidiendo con el bajo número de cisticercos recuperados y disminuyendo los niveles de IL-2 en la octava semana de infección, manteniéndose un bajo número de cisticercos. (Fig. 8C; \*P<0.05).

Para el caso del grupo con dosis CTE, los linfocitos estimulados con Con A presentaron muy bajos niveles de IL-2 después del tratamiento de dosis (Fig. 8D), registrando un incremento durante la segunda semana (\*P<0.05), aumentando evidentemente en la cuarta semana de infección con una disminución para la octava semana (Fig. 8D; \*P<0.05). En particular este grupo el caso de este grupo durante la segunda semana de infección presento un número bajo de parásitos al igual que los bajos niveles IL-2, aumentando el número de parásitos en la cuarta semana coincidiendo con los niveles más

altos de esta citocina y durante la octava semana de infección que fue el periodo de infección donde se registró el mayor número de parásitos recuperados en este grupo, se registraron los niveles más bajos de IL-2. Para el caso del los linfocitos del grupo con dosis U registraron una ligera producción de IL-2 en respuesta a Con A a partir de la segunda semana de infección (\*P<0.05), mientras que a la cuarta semana de infección aumentaron los niveles de esta citocina los cuales disminuyeron significativamente a la octava semana de infección (Fig. 8E). Cabe mencionar que dentro de los grupos experimentales, este último grupo fue el que presentó de manera general los niveles más bajos de IL-2 durante las diferentes semanas de infección coincidiendo con el número más alto de cisticercos recuperados principalmente durante la cuarta y octava semana de infección (Fig. 4).

IFN- $\gamma$ . En la figura 9 puede apreciarse la producción de IFN- $\gamma$  de linfocitos en respuesta a Con A del grupo C/C así como en los grupos experimentales tratados con dosis antigénica (0 semanas) y con infección durante la 2, 4 y 8 semanas de infección. La producción de esta citocina para el grupo C/C, mostró bajos niveles durante la segunda semana de infección con respecto al grupo N, en la cuarta semana de infección se observó una recuperación en la producción de IFN- $\gamma$ , posteriormente disminuyendo para la octava semana de infección (Fig. 9 A, \*P<0.05).

Los resultados obtenidos en la producción de IFN- $\gamma$ , coinciden con la cinética del crecimiento de los parásitos, en la cual, durante etapas tempranas de infección (2 semana) hay un bajo número de cisticercos relacionados con un bajo nivel de esta citocina. Conforme avanza la infección, incrementándose el número de parásitos existe un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  (4 semana), posteriormente se presenta una disminución considerable en los

niveles de esta citocina acompañada con un crecimiento evidente del parásito (en la 8 semanas de infección) (Terrazas et al , 1998)

Entre los grupos con diferentes dosis de antígeno, el grupo tratado con dosis +/- posterior al tratamiento, presentó una baja producción de IFN- $\gamma$ , la cual se mantuvo hasta la segunda semana de infección (\*P<0.05), siendo hasta la cuarta semana de infección cuando se registró un incremento considerable en los niveles de IFN- $\gamma$  y nuevamente disminuyendo drásticamente para la octava semana de infección (Fig. 9B, \*P<0.05)). Este grupo presentó una cinética muy similar al grupo C/C en la producción de citocinas, pero en el caso del número de cisticercos presentó un número muy bajo desde la segunda semana de infección hasta la octava semana de infección (Fig. 4).

En el caso de grupo con dosis -/+, los niveles de IFN- $\gamma$  posteriormente al tratamiento con dosis antigénica, fueron bajos, prácticamente nulos. Por el contrario durante la segunda semana de infección fue cuando hubo una recuperación en la producción de esta citocina (\*P<0.05), disminuyendo los niveles de IFN- $\gamma$  de manera paulatina en la cuarta y octava semana de infección. (Fig. 9C; \*P<0.05). Cabe mencionar que este grupo fue uno de los dos grupos (+/- y CTE) que presentaron niveles altos durante la segunda semana de infección. La disminución de los niveles de IL-2 se dio de manera paulatina en la etapa intermedia de la infección (4 semanas) y tardías (8 semanas).

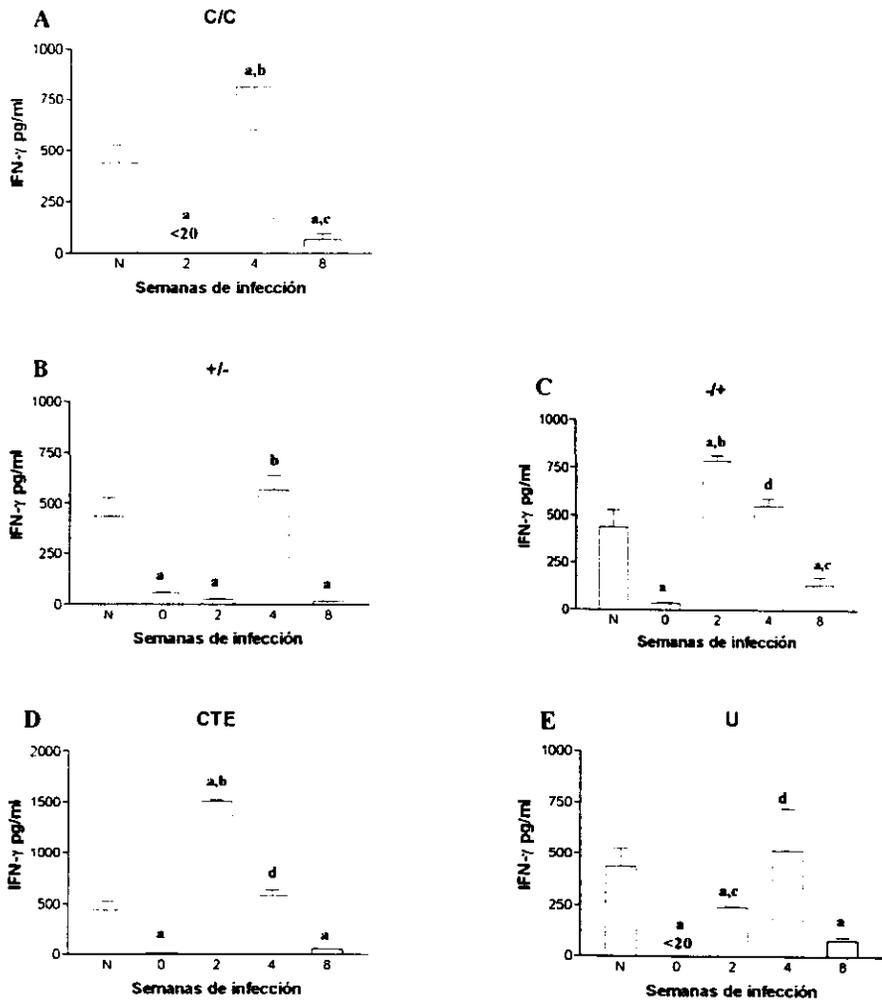


Fig. 9. Producción de INF- $\gamma$  en sobrenadantes de células de bazo de ratones en respuesta a Con A, previamente tratados e infectados después del tratamiento a las 2, 4 y 8 semanas con cisticercos de *T. crassiceps* (n= al menos 5 ratones por grupo). El grupo control presentó una cinética en la producción de esta citocina con reportes previos. Los grupos experimentales presentaron diferentes cinéticas de producción de INF- $\gamma$ , siendo el grupo -/+ y CTE los que presentaron niveles más tempranamente (2semanas), mientras que el grupo con dosis +/- y U, los niveles permanecieron similares o por debajo de los ratones normales. a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal. b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección. c y d= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)

Por otra parte en el caso de los linfocitos del grupo con dosis CTE, presentaron una cinética de producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a Con A, similar al grupo anterior, siendo en este caso el grupo que presentó los niveles más altos de IFN- $\gamma$  a partir de la segunda semana de infección, e inclusive estos niveles fueron mayores con respecto al grupo C/C (Fig. 9D; \*P<0.05). Por otra parte al evaluar la carga parasitaria de este grupo, presentó un bajo número durante la segunda y cuarta semana de infección coincidiendo con los niveles más altos de IFN- $\gamma$ , mientras que en la octava semana de infección, el número de cisticercos aumentó registrando una baja significativa en los niveles de esta citocina (Fig. 9D; \*P<0.05).

En el caso del grupo tratado con dosis U, los linfocitos de este grupo en respuesta a Con A, produjeron niveles muy bajos de IFN- $\gamma$ . A la segunda semana de infección se registró un aumento considerable en los niveles de esta citocina (\*P<0.05), presentando posteriormente a la cuarta semana de infección un incremento el cual disminuyó significativamente en la octava semana de infección (Fig. 9E; \*P<0.05). Al evaluar la carga parasitaria en este grupo, fue uno de los que mayor número de cisticercos presentó a partir de la cuarta semana de infección y aumentando considerablemente en la octava semana de, lo que podría explicar los bajos niveles de IFN- $\gamma$  encontrados durante el transcurso de la infección en este grupo.

### **Citocinas de una respuesta tipo Th2:**

**IL-4.** Los niveles de IL-4 en los diferentes grupos tratados con dosis antigénicas durante las diferentes semanas de infección pueden apreciarse en la figura 10.

En respuesta a Con A las células de ratones del grupo C/C produjeron niveles de IL-4 ligeramente por encima del grupo de ratones (N) durante la segunda y cuarta semana de infección, que fue cuando se registró el número más bajo de parásitos (Fig. 4), siendo en

la octava semana cuando hubo un incremento significativo en la producción de esta citocina, coincidiendo con el mayor número de cisticercos recuperados (Fig. 10 A, \*P<0.05). Por otra parte la respuesta presentada por los linfocitos del grupo tratado con dosis +/- en respuesta a Con A, fue de manera general baja (Fig. 10B). Posterior al tratamiento con dosis antigénica y en la segunda semana de infección los niveles de IL-4 fueron bajos con respecto al grupo N (\*P<0.05). Durante la cuarta semana de infección se observó una recuperación en la producción de esta citocina manteniéndose constante hasta la octava semana de infección (P>0.05). En este grupo el número de cisticercos recuperados durante las diferentes semanas de infección, fue de los más bajos (Fig. 4), coincidiendo con reportes anteriores que indican que bajos niveles de IL-4 se relacionan con una baja carga parasitaria (Terrazas et al., 1998). Por otra parte, en el caso del grupo con dosis -/+, los linfocitos estimulados con Con A presentaron un ligero incremento en los niveles de IL-4 posterior al tratamiento de dosis antigénica al igual que durante la cuarta semana de infección con respecto al grupo N. Se registró una disminución significativa en la segunda semana y octava semana de infección (Fig. 10D; \*P<0.05). Los niveles de IL-4 que presentó este grupo nuevamente coincidieron con el bajo número de cisticercos recuperados para este grupo durante los mismos periodos de infección (Fig. 4). Por el contrario, el grupo con dosis U, presentaron bajos niveles de IL-4 después del tratamiento de dosis antigénica, presentó un incremento significativo a partir de la segunda semana de infección (\*P<0.05), siendo este grupo el que más altos niveles de IL-4 presentó disminuyendo ligeramente para la cuarta semana de infección y aumentando ligeramente pero de manera significativa en la octava semana. Cabe mencionar que fue el grupo que presentó una producción de IL-4 sin tanta fluctuación entre los diferentes periodos de infección coincidiendo además con el número

más alto de cisticercos recuperados a partir de la cuarta a la octava semana de infección corroborando con reportes anteriores (Terrazas et al., 1998).

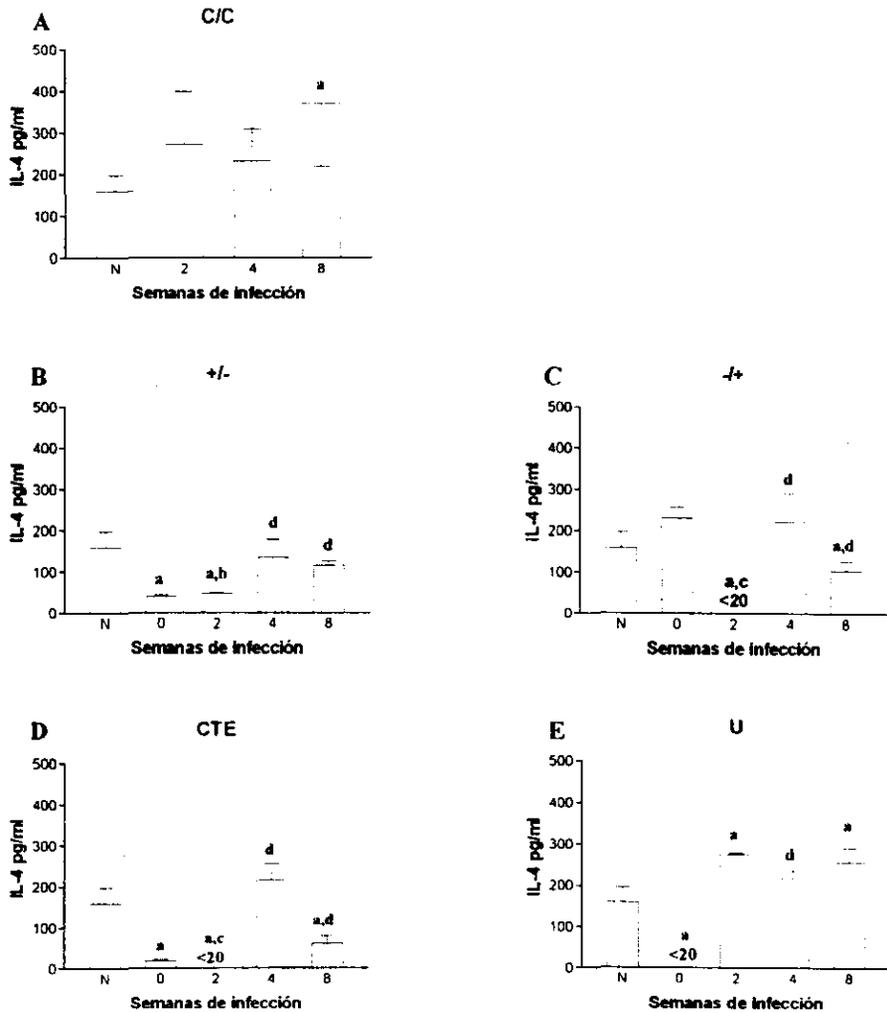


Fig. 10. Producción de IL-4 en sobrenadantes de células de bazo de ratones en respuesta a Con A. previamente tratados e infectados después del tratamiento a las 2, 4 y 8 semanas con cisticercos de *T. crassiceps* (n= al menos 5 ratones por grupo). Los niveles presentados por el grupo C/C de IL-4 coinciden con reportes previos. En los grupos con dosis +/-, -/+ y CTE presentaron una tendencia a disminuir estos niveles en etapas avanzadas de la infección, mientras que el grupo con dosis U presentó un comportamiento contrario. a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal. b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c y d= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)

**IL-10.** En la figura 11 se muestra la producción de IL-10 en respuesta a Con A. Las células de los ratones del grupo C/C tuvieron una baja producción de IL-10 durante la segunda semana de infección (\*P<0.05), mientras que para la cuarta y octava semana de infección se observó una recuperación en la producción de esta citocina (Fig. 11A; \*P<0.05).

Al comparar nuevamente la cinética de producción de IL-10 con respecto al número de cisticercos recuperados, vuelven a coincidir los bajos niveles de esta citocina con el número más bajo de cisticercos en etapas tempranas de la infección, incrementándose de manera evidente en etapas tardías acompañada con un incremento en el número de parásitos (Fig.4). En el grupo de animales tratados con dosis antigénica +/- se encontraron bajos niveles de IL-10 después del tratamiento, así como durante la segunda y cuarta semana de infección (\*P<0.05), mientras que en la octava semana se observó un aumento significativo en los niveles de esta citocina. (Fig. 11B; \*P<0.05). El grupo con dosis CTE, presentó una baja producción de IL-4 después del tratamiento de dosificación (\*P<0.05) así como durante la segunda semana, en la cual los niveles de esta citocina fueron prácticamente nulos. Durante la cuarta semana de infección se recuperó ligeramente la producción de esta citocina, volviendo a disminuir de manera significativa a la octava semana de infección (Fig. 10D; \*P<0.05).

Para el grupo de ratones tratados con dosis -/+, la producción de IL-10 en respuesta a Con A, presentó niveles extremadamente bajos después del tratamiento así como durante la segunda y cuarta semana de infección, con respecto al grupo de ratones N (\*P<0.05). Sin embargo, en la octava semana de infección, presentó un incremento en la producción de IL-10, similar a la del grupo de ratones sanos (N) (Fig. 11C; \*P<0.05). Cabe señalar que que este grupo fue el que presentó los niveles más bajos de IL-10 durante la infección.

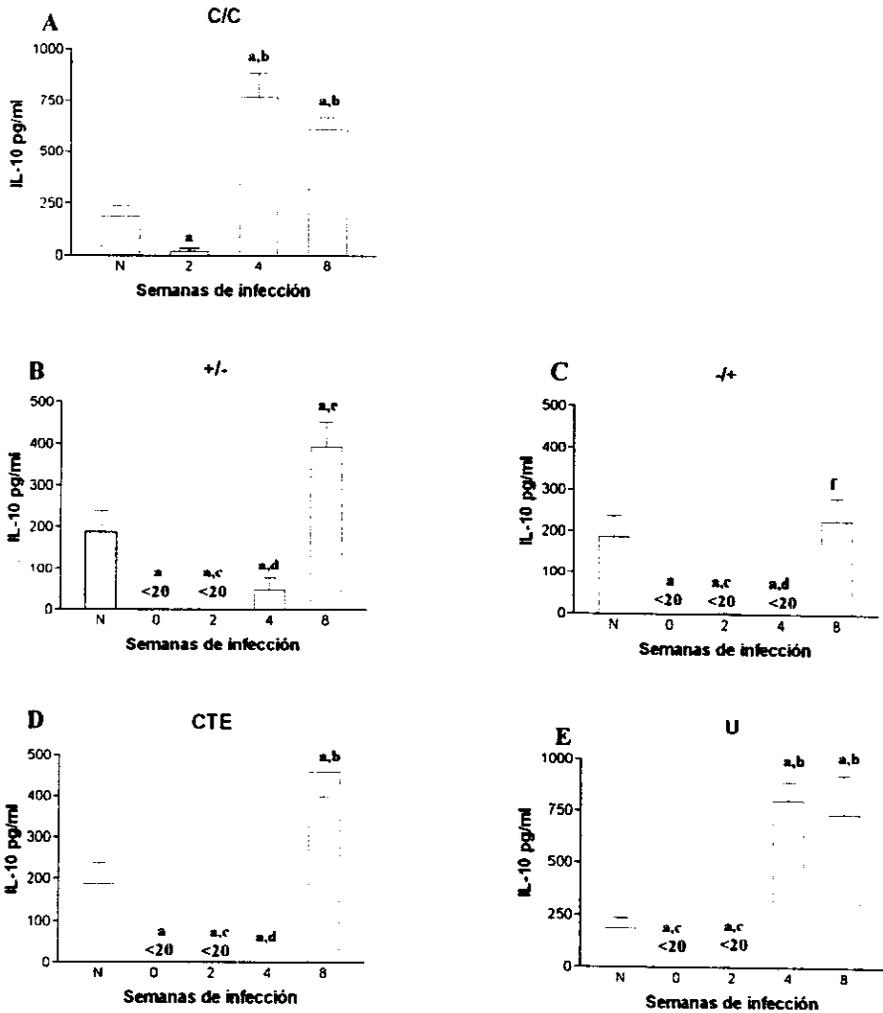


Fig. 11. Producción de IL-10 en sobrenadantes de células de bazo de ratones en respuesta a Con A. previamente tratados e infectados después del tratamiento a las 2, 4 y 8 semanas con cisticercos de *T. crassiceps* (n= al menos 5 ratones por grupo). Los niveles de IL-10 en el grupo control presentaron niveles considerables a partir de la cuarta y hasta la octava semana de infección, mientras que los niveles de esta citocina en grupos experimentales con dosis +/-, -/- y CTE fueron considerables hasta la octava semana de infección. Por el contrario, el grupo con dosis U, registró niveles significativos desde la cuarta semana de infección y manteniéndolos hasta la octava. a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal; b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c y d= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)

Por otra parte, en el caso del grupo de ratones tratados con dosis CTE, produjeron bajos niveles de IL-10 desde el tratamiento con dosis antigénica así como durante la segunda y cuarta semana de infección. En la octava semana de infección fue cuando se detectaron los niveles más altos de esta citocina, coincidiendo esto nuevamente con el mayor número de cisticercos recuperados (Fig. 6; Fig. 11D; \*P<0.05).

En el grupo con dosis U, nuevamente se detectaron bajos niveles de IL-10 después del tratamiento como durante la segunda semana de infección siendo estos prácticamente nulos. Por el contrario, a la cuarta semana de infección se presentó un incremento considerable en los niveles de esta citocina manteniéndose así hasta la octava semana de infección. Cabe mencionar que este grupo fue el que presentó mayor número de cisticercos recuperados entre los grupos experimentales desde la cuarta hasta la octava semana de infección (Fig. 6), coincidiendo así, con los altos niveles de IL-10 presentados en este grupo (Fig. 11E; \*P<0.05).

**PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS.** Con el fin de explorar y valorar la respuesta inmune humoral presentada contra *T. crassiceps* y si esta fue alterada por el tratamiento de dosis antigénica, en los diferentes grupos tratados solamente con dosis antigénica y aquellos con dosis antigénica e infección, se analizó la presencia de dos isotipos de anticuerpos específicos contra este parásito. Actualmente se sabe que IgG2a está asociada con un tipo de respuesta Th1, mientras que el isotipo IgG1 para el tipo de respuesta tipo Th2.

**IgG1.** En la figura 12 se observan los niveles de IgG1 de los ratones control (C/C) así como aquellos que fueron tratados con dosis antigénica e infectados.

En el caso del grupo C/C, los niveles de IgG1 fueron bajos durante la segunda y cuarta semana de infección, aumentando considerablemente para la octava semana de

infección coincidiendo nuevamente con el mayor número de cisticercos recuperados en esta última semana de infección (Fig. 12 A; \*P<0.05)

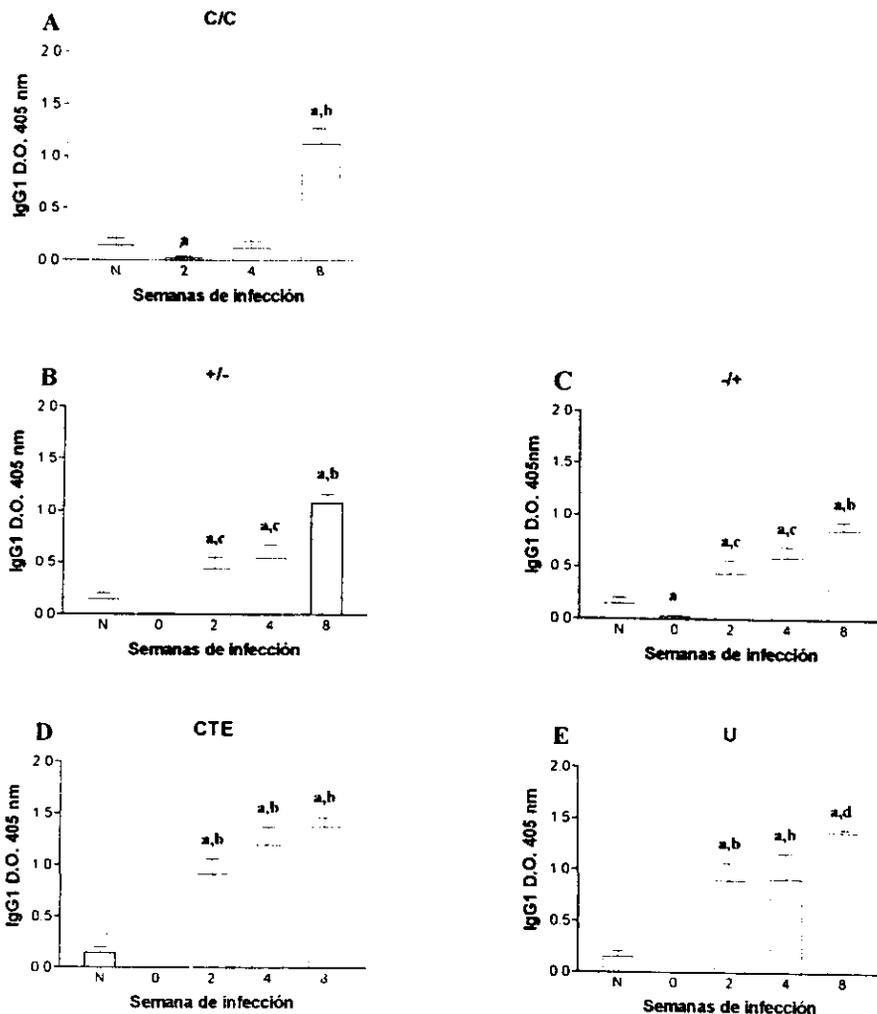


Fig. 12. Producción de anticuerpo de la subclase IgG1 en sueros de ratones hembras Bal/c previamente tratados con diferentes dosis de antígeno de *T. crassiceps* y posteriormente infectados con 25 cisticercos y valorados a las 2, 4 y 8 semanas de infección. a= \*P<0.05 comparado con el grupo normal; b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c y d= diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\*P<0.05)

**IgG2a.** La figura 13 muestra los niveles de IgG2a de los ratones control así como los ratones con tratamiento e infección.

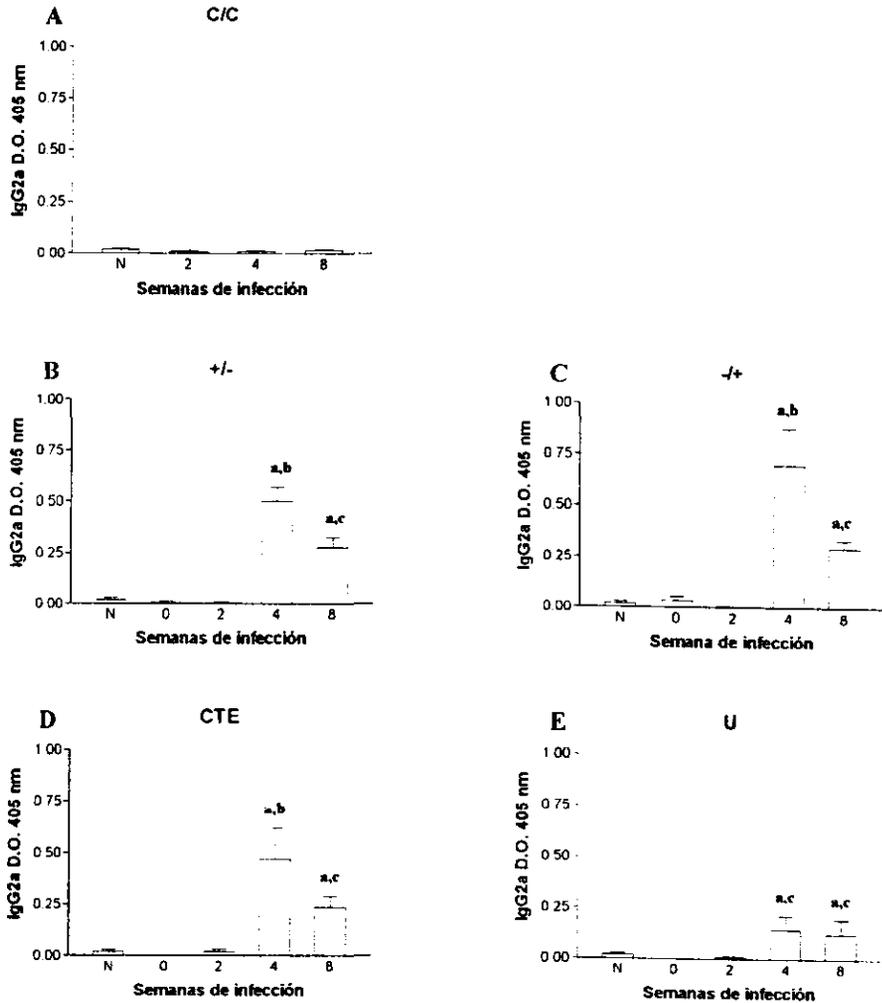


Fig. 13 Producción de anticuerpo de la subclase IgG2a en sueros de ratones hembras Bal/c previamente tratados con diferentes dosis de antígeno de *T. crassiceps* y posteriormente infectados con 25 cisticercos y valorados a las 2, 4 y 8 semanas de infección. a= \* $P < 0.05$  comparado con el grupo normal. b= diferencias dentro del mismo grupo entre los diferentes tiempos de infección; c = diferencias entre los diferentes grupos en el mismo tiempo de infección(\* $P < 0.05$ )

Por otra parte de manera general después del tratamiento los niveles de IgG1 en los grupos experimentales (+/-, -/+, CTE y U) fueron prácticamente nulos (Fig. 12).

Los grupos tratados con dosis +/- y -/+ presentaron aumentos significativos en los niveles de IgG1 (\*P<0.05) durante la segunda y cuarta semana de infección incrementándose ligeramente en la octava semana de infección (Fig. 12B y 12C; \*P<0.05).

Por el contrario en el caso de los grupos tratados con dosis CTE y U, presentaron también un incremento a partir de la segunda y cuarta semana de infección (Fig. 12D y 12E; \*P<0.05), inclusive mayor que los dos primeros grupos anteriormente descritos.

Para la octava semana de infección se aprecia una tendencia en el incremento en el grupo con dosis CTE (Fig. 12C; \*P<0.05), haciéndose evidente en este periodo de infección para el grupo con dosis U (Fig. 12E; \*P<0.05). Sin embargo, el grupo -/+, fue el que presentó los niveles más bajos de ésta subclase de anticuerpos.

En el grupo C/C se observó que los niveles de IgG2a fueron bajos durante toda la infección, además, no se observaron diferencias en ningún de los diferentes periodos de infección (Fig 13 A). Nuevamente, de manera general en los grupos experimentales, se registraron bajos niveles de IgG2a después del tratamiento con las dosis antigénicas correspondientes como durante la segunda semana de infección (Fig. 13). En el caso del grupo de ratones tratados con dosis antigénica +/-, presentó incrementos significativos en los niveles de este anticuerpo durante la cuarta semana de infección y con una ligera disminución hacia la octava semana (Fig. 13B; \*P<0.05). Comparando estos niveles de IgG2a con respecto al número de cisticercos recuperados en este grupo, estos niveles coincidieron con el bajo número de parásitos que se recuperaron en este grupo en estos periodos de infección (Fig. 4). Los niveles de IgG2a que del grupo de ratones tratados con

dosis -/+, se detectaron nuevamente a partir de la cuarta semana de infección disminuyendo nuevamente durante la octava semana de infección. Cabe mencionar que entre los grupos experimentales, éste fue el que mayores niveles de IgG2a presentó, así como uno de los grupos que menor carga parasitaria desarrolló durante los diferentes intervalos de infección (Fig. 13B; \*P<0.05). Por otra parte, el grupo tratado con dosis CTE presentó niveles considerables de IgG2a en la cuarta semana de infección y encontrándose disminuidos en la octava semana de infección (Fig. 13D; \*P<0.05). Para el grupo con dosis U, los niveles de este anticuerpo se detectaron a partir de la cuarta semana de infección, siendo estos los más bajos en comparación de los demás grupos experimentales hasta la octava semana de infección, sin registrar ni aumento ni disminución. En este caso, los bajos niveles de este anticuerpo coincidieron con un alto número de cisticercos recuperados en este grupo en la cuarta y octava semana de infección (Fig. 13E; \*P<0.05).

## 9. DISCUSIÓN.

---

Actualmente se sabe que el control de diferentes enfermedades parasitarias está muy relacionado con los tipos de respuestas inmunes que se desarrollan en el transcurso de infección. Una respuesta de tipo Th1 se caracteriza por niveles altos de IFN- $\gamma$  e IL-2 principalmente, induciendo una respuesta de tipo celular, la activación de macrófagos y la producción de anticuerpos de la subclase IgG2a. En cambio, una respuesta tipo Th2 presenta niveles altos de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 principalmente, los cuales favorecen la respuesta de tipo humoral que va acompañada por una mayor producción de anticuerpos de la subclase IgG1, IgG2b e IgE (Mosmann y Coffman, 1989; Mosmann y Sad, 1996; Abbas et al., 1996; Romagnani, 1992). En base a diferentes investigaciones realizadas en los últimos años, se ha descrito la participación de estos tipos de respuesta en la cisticercosis experimental murina causada por *T. crassiceps*, donde existe una respuesta inmune tipo Th1 durante etapas tempranas de la infección, con una alta respuesta de hipersensibilidad retardada antígeno-específica la cual, se encuentra asociada con una alta respuesta proliferativa *in vitro* en presencia de Con-A y del antígeno de *T. crassiceps* en células del bazo de los animales infectados. Así mismo, se demostró que existe una alta producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , que se relacionan con los niveles más altos de anticuerpos de tipo IgG2a y con los bajos niveles de IL-4, IL-6, IL-10 y de anticuerpos de los subtipos IgG1 e IgG2b; lo cual además se relaciona con una baja carga parasitaria. Después de la cuarta semana de infección se observa un periodo de inhibición en la respuesta de hipersensibilidad retardada, en la respuesta proliferativa de linfocitos a Con-A y al antígeno específico, así como en los niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de los linfocitos de los animales parasitados,

además, con una disminución significativa en los niveles de IgG2a antígeno-específicos en estos mismos animales, lo que va acompañado con niveles significativamente mayores de IL-4, IL-6 e IL-10 y de anticuerpos específicos de los subtipos IgG1 e IgG2b, lo cual mantiene una relación con el establecimiento y crecimiento sostenido de la carga parasitaria. Por lo tanto se ha establecido que al inicio de la infección con *T. crassiceps* se presenta una respuesta inmune tipo Th1 con un bajo número de parásitos pero, conforme avanza la infección, aparece una respuesta inmune de tipo Th2 asociada con un incremento significativo en el número de parásitos (Terrazas et al., 1998).

Por otra parte, se cree que la polarización de las células tipo Th0 hacia una respuesta inmune tipo Th1 o una Th2 es afectada tanto por las características genéticas del individuo como por la naturaleza del antígeno, la vía de entrada del antígeno, la cronicidad del estímulo, el tipo de células presentadoras, moléculas coestimuladoras, el microambiente de citocinas y la dosis administrada de antígeno (Nicholson y Kuchroo, 1996; Romagnani, 1998).

En base a lo reportado para la dosis administrada de antígeno, refiriéndose a que el uso de bajas concentraciones del antígeno inducen una respuesta tipo Th1, mientras que las dosis altas inducen un tipo Th2 (Hosken et al., 1995), se procedió evaluar el efecto de la administración de la dosis antigénica sobre la polarización hacia un tipo de respuesta Th1 la cual si se mantuviera durante más tiempo durante la infección, lo que podría resolverse o eliminar el mayor número de parásitos de *T. crassiceps* (Terrazas et al., 1998)

La respuesta generada por el grupo control, durante la infección coincidió en general con lo reportado recientemente (Terrazas et al., 1998). Durante etapas tempranas de la infección (2 y 4 semanas) cuando pocos parásitos fueron recuperados de la cavidad peritoneal

de los ratones infectados estos, mostraron una respuesta claramente de tipo Th1, la cual se caracterizó por una respuesta proliferativa en respuesta a la Con-A, con una ligera tendencia mayor en relación con los ratones normales (Fig. 7 A). Los niveles en suero de IFN-  $\gamma$  se incrementaron con respecto a los de IL-4 (Fig. 9 A y Fig. 8. A). Para el caso del microambiente de citocinas detectado en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos, tanto la IL-2 e IFN-  $\gamma$  mostraron niveles altos, siendo la IL-2 mostró una mayor expresión que IL-4 e IL-10, aunque los niveles fueron similares al grupo N (para la IL-4; Fig. 12 A) y por debajo de estos (para la IL-10; Fig. 13 A). En la respuesta humoral se esperaba contar con niveles considerables de anticuerpos de la subclase IgG2a, sin embargo, estos, no se observaron (Fig. 15 A), aunque si se expresó a bajos niveles de IgG1 (Fig. 16 A). Durante las etapas avanzadas de la infección (semana 8), se observó una disminución significativa en la respuesta a Con-A, acompañada con una disminución en los niveles de IFN-  $\gamma$  y un aumento significativo de IL-4 en lo sueros de estos animales. Por otra parte, la producción de IL-2 e IFN-  $\gamma$  presentaron una disminución significativa, mientras que hubo un aumento significativo para la IL-4 e IL-10, todo esto acompañado con un incremento en los niveles de anticuerpos IgG1 y una disminución de IgG2a, además de un incremento considerable en la carga parasitaria, perfilando claramente una respuesta de tipo Th2 la cual permite el establecimiento y crecimiento de los metacístodos de *T. crassiceps* (Terrazas et al., 1998).

Estos factores anteriormente descritos fueron modificados por el tratamiento de dosis utilizada en cada grupo de ratones, prolongando el comportamiento o aparición de unos y restringiendo otros.

Posterior al tratamiento con las diferentes dosis administradas, considerando el perfil de citocinas INF- $\gamma$  e IL-4 detectado en los sueros de los animales, fue claro que el dominio

de un tipo de respuesta tipo Th2 se estableció ya que los niveles de IL-4 se incrementaron conforme la infección se hizo crónica. Por el contrario, los niveles de IFN- $\gamma$ , tendieron a disminuir en el grupo control, pero los diferentes tratamientos antigénicos mostraron estas tendencias, especialmente los grupos +/- y -/+ fueron los que a su vez presentaron menores niveles de IL-4 y mayores de IFN- $\gamma$  con respecto a los controles y relacionándose lo cual coincidió con el menor número de parásitos encontrados (Fig. 8 y 9). Por otra parte, al evaluar la producción de citocinas de linfocitos de bazo de los grupos de ratones tratados con diferentes dosis en respuesta a Con-A, nuevamente para establecer que tipo de respuesta inmune podría estar presente después del tratamiento, se observó que para el caso de los grupos tratados con dosis +/- y -/+, se presentaron bajos niveles de IL-4 en suero, en relación con los niveles de IFN- $\gamma$  lo cuales se encuentran por encima de los niveles presentados por IL-4. Conforme avanzó la infección (cuarta y octava semana ) en estos grupos el número de parásitos permaneció por debajo del grupo C/C e inclusive por debajo de los grupos tratados con dosis CTE y U, lo que se relacionó con un incremento en la cinética de producción IFN- $\gamma$  en las células de bazo en estas etapas avanzadas de la infección. Parece ser que en estos grupos predominó un ambiente rico en IFN-  $\gamma$ , el cual es un factor determinante para mantener una respuesta de tipo Th1, mostrando que se encuentra todavía presente en etapas avanzadas de la infección y con una tendencia a incrementar los niveles de esta citocina. La IL-4 presentó una tendencia similar, pero este incremento fue evidente hasta la octava semana de infección, teniendo por lo tanto un temprano dominio de IFN-  $\gamma$  sobre la IL-4, restringiendo así el establecimiento o polarización de una respuesta tipo Th2 y por tanto afectando de manera directa al desarrollo de la infección.

Al evaluar la producción de citocinas en células de bazo en respuesta a Con-A, en estos grupos, ésta también se vio favorecida hacia una respuesta del tipo Th1 protectora (Terrazas et al., 1998).

Por el caso del grupo tratado con dosis +/- durante la segunda semana de infección, no se observó ningún patrón de respuesta, ni del tipo de respuesta Th1 o Th2, ya que los niveles de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 se encontraron por debajo de los grupos de ratones normales. Sin embargo, para el caso del grupo con dosis -/+, en este tiempo de infección, tuvo altos niveles significativos de IFN- $\gamma$ , bajos de IL-2, pero estos dos fueron mayores con respecto a la producción de IL-4 e IL-10 de estos grupos, indicando que prevaleció una respuesta Th1. Nuevamente se encontró que lo anterior coincide con el bajo número de parásitos recuperados además de una alta proliferación en respuesta a la Con-A en este periodo de infección y aunque se registraron niveles superiores de IgG1 con respecto a los de IgG2a, estos estuvieron por debajo de los otros grupos los cuales tuvieron niveles superiores de IgG1. Con base a lo anterior podría considerarse que este grupo que fue tratado con dosis fraccionadas (-/+), presentó una capacidad de protección muy importante (>90%) al final de la infección reflejado por el bajo número de cisticercos obtenidos y además corroborando que el uso de bajas dosis de antígeno pueden inducir una respuesta del tipo Th1 (Hosken et al., 1995; Romagnani et al., 1998).

Los niveles de anticuerpos IgG1 presentados por estos grupos fueron similares y presentaron un incremento con respecto al grupo control además la presencia de estos niveles mayores de este isotipo de anticuerpo durante las etapas tempranas de la infección, puede deberse a que tanto el tratamiento de dosis de antígeno así como la presencia del parásito por la infección después dos semanas, generó una respuesta humoral induciendo a su

vez la producción de anticuerpos, sobre todo el de este isotipo, mientras que fue menor para aquellos animales, que fueron expuestos solamente al parásito (grupo control). Aunque se sabe que la respuesta humoral se caracteriza por la presencia de IgG1 y que está relacionada con una tipo de respuesta Th2, que se reflejaría en un alto número de cisticercos acompañado del perfil de citocinas, pero no en estos grupos, que no se reporta respuesta. Cabe señalar que la producción de IgG2a no se detectó sino hasta etapas posteriores de la infección.

Las cinética presentada por estos grupos en cuanto a los niveles de IFN-  $\gamma$ , fueron prácticamente similares en estos grupos. Dichos niveles fueron significativos a partir de la segunda semana de infección disminuyendo durante la cuarta semana e incrementándose de manera evidente y significativa para la octava semana de infección. Por otra parte el tiempo de expresión de la IL-4 en los sueros de estos grupos de animales mostró diferencias. Para el grupo con dosis CTE se detectaron incrementos en los niveles de IL-4 hasta la octava semana de infección, mientras que para el grupo tratado con una dosis U, los niveles de esta citocina se detectaron a partir de la cuarta semana de infección presentando un ligero incremento para la octava, lo que coincidió con una alta carga parasitaria en estos dos grupos. Es importante remarcar que para la octava semana de infección, en ambos grupos se detectaron los mismos niveles de IFN- $\gamma$  e IL-4, pero considerando el alto número de cisticercos recuperados en ambos grupos, el tipo de respuesta que presentaron, se caracteriza como un tipo Th2, por bajos niveles de IFN- $\gamma$  y altos de IL-4. Con base a lo anterior, la respuesta obtenida, no corrobora con lo esperado por lo que podría considerarse como una etapa de transición en la respuesta Th1 a una Th2. Un aspecto que resulta interesante considerar, es la recuperación en los niveles de IFN- $\gamma$  en este periodo de

infección generando una mezcla de citocinas. De manera teórica, se esperaría que los niveles de IFN- $\gamma$  disminuyeran (Terrazas et al., 1998) sin embargo no sucedió así posiblemente debido a diferentes factores (Fig. 8E y 9E). En los dos primeros grupos descritos +/- y -/+, se puede apreciar no tan evidentemente la mezcla de estas dos citocinas, lo que indicaría nuevamente esta transición, en la cual se manifiesta preferentemente, una respuesta Th1 donde los niveles de IFN- $\gamma$  son superiores a los presentados por la IL-4, lo que conlleva a la prolongación de la respuesta en etapas más avanzadas de la infección. Puede considerarse que posiblemente este tipo de respuesta mixta o de transición entre los dos tipos de respuesta pudo no ser tan benéfica para los grupos que fueron tratados con dosis CTE y U.

Para el caso de las citocinas en los sobrenadantes, se presentó para el grupo con dosis CTE, niveles considerables tanto de IL-2 e IFN- $\gamma$ , siendo este último el más elevado, mientras que en el caso de la IL-4 e IL-10, los niveles registrados fueron prácticamente nulos, indicando que existió un perfil de respuesta tipo Th1, lo cual no correspondió con la baja proliferación, los altos niveles de IgG1, pero bajos de IgG2a y con una carga parasitaria que presentó un número intermedio entre todos los grupos experimentales (Fig. 6; Tabla II). Este comportamiento mixto dentro de los factores evaluados durante la parasitosis pudo haber influido para que este grupo haya proveído de una respuesta intermedia, ya que este grupo proporcionó cierto grado de respuesta inicial tipo Th1 y a su vez un tipo Th2, indicando que pudo atacar con la primera respuesta algunos factores del cisticercos que contribuyen en su crecimiento y establecimiento y la segunda favoreció alguno de estos.

Por otra parte, el grupo tratado con dosis U, presentó una respuesta de tipo Th2 más evidente desde etapas tempranas de la infección, debido al efecto producido por el uso de la dosis única, la cual coincide con lo reportado ya que este tipo de dosificación induce una

respuesta tipo Th2 (Rook., 1994; Brancroft et al., 1994, Hosken et al., 1995; Romagnani, 1998).

La cinética de IFN- $\gamma$  en este grupo, presentó inicialmente niveles considerables aunque bajos niveles de IL-4 (segunda semana de infección), indicando una respuesta inicial Th1 evidente la cual, a la cuarta semana de infección viró este perfil ya que el perfil de citocinas aumentó para la IL-4 hasta la octava semana de manera significativa dominando hasta la última semana de infección, mientras que aunque en estos mismos momentos de infección los niveles de IFN-  $\gamma$  sufrieron una caída, estos volvieron a incrementarse, siendo similares a los presentados por la IL-4, indicando nuevamente que en suero existió un perfil de citocinas mixto pero dominando una respuesta del tipo Th2, esto asociado con una carga parasitaria considerable e inclusive similar a la del grupo control. Por otra parte en el caso de las citocinas producidas por los linfocitos de este grupo, estas presentaron un microambiente rico de IL-4 e IL-10 que el de la IL-2 e IFN-  $\gamma$  durante la cuarta y hasta la octava semana de infección, además se vio acompañada de los niveles más altos de IgG1 y bajos de IgG2a con una baja respuesta proliferativa en respuesta a Con-A desde la segunda y hasta la octava semana de infección perfilando así evidentemente una respuesta tipo Th2, que inicio mucho más temprano que la de los demás grupos debido al uso de la alta dosis y sin una administración de manera permanente como fueron tratados los demás grupos, indujo una respuesta del tipo Th2 (Rook., 1994; Brancroft et al., 1994; Hosken et al., 1995; Romagnani, 1998)

Considerando que se ha reportado para otras infecciones parasitarias como la Leishmaniasis, que el uso de bajas dosis de antígeno inducen una respuesta de tipo Th1, protectora (Bretscher, et al., 1994), posiblemente esto haya ocurrido en el caso de la

cisticercosis experimental murina causada por *T. crassiceps*, al ser tratada principalmente con las dosis -/+ y +/-, las cuales, aunque no permitieron eliminar completamente la infección, al menos no permitieron que el parásito se desarrollara de manera óptima como se esperaba. En el caso de la dosis única (U), ésta permitió un mejor desarrollo parasitario debido a que no favoreció la aparición de una respuesta tipo Th1 temprana, en cambio, favoreció a que se presentara más tempranamente una respuesta inmune tipo Th2, lo cual coincide algunos reportes (Liblau et al., 1995; Romagnani, 1998), en los que menciona que el uso de dosis altas de antígeno inducen claramente una respuesta tipo Th2.

En el caso de la dosis constante (CTE), se obtuvo un desarrollo parasitario similar al grupo tratado con dosis única, pero menor al grupo control, indicando de cierta manera que el tratamiento con este tipo de dosis posiblemente determinó un tipo de respuesta mixta, la cual, permitió que existieran las condiciones inmunológicas para el crecimiento del parásito. Por la dosis utilizada, pero por otra parte, la cronicidad del estímulo igual a la de los grupos tratados con dosis +/- y -/+, pudo haber influido en el grado de protección que tuvo este grupo, aunque no se eliminó totalmente la parasitosis, debido a que es uno de los grupos que mayor número de parásitos presentó (Fig. 4; Tabla II). Todos los factores anteriormente descritos jugaron un papel importante de manera conjugada en la resistencia y al mismo tiempo, en la susceptibilidad de este grupo.

Recientemente Terrazas y colaboradores (1998), han reportado que la respuesta protectora necesaria para disminuir el crecimiento del parásito es una respuesta de tipo Th1, mientras que una respuesta Th2 facilita el establecimiento el crecimiento de este, por lo que al conseguir que se haya presentado una respuesta tipo Th1 en los organismos debido al uso de las bajas dosis, así como de la administración permanente, se estableció una respuesta que

se caracteriza en ser más prolongada con respecto al tiempo de duración de una respuesta normal, lo que, permitió una mayor protección en contra de la parasitosis.

Por todo lo anterior, es importante señalar que los resultados de este trabajo muestran que el uso de diferentes dosis antigénicas pueden inducir tipos de respuesta diferentes y que estos a su vez pueden prolongarse en su tiempo de acción y/o apagarse, dando lugar a otro tipo de respuesta que puede ser o no benéfica o no para el organismo. Por lo tanto, es posible manipular la respuesta inmune con el uso de dosis antigénicas administradas a diferentes concentraciones. Es importante mencionar que es necesario prolongar el tiempo de infección para poder evaluar mucho mejor el efecto de los diferentes tratamientos y trabajar con dosis de menor concentración para ver si el efecto de protección se ve incrementado, además de trabajar también con dosis altas pero administradas de manera constante.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten proponer nuevas estrategias de tratamiento para esta parasitosis la cual podía ser combinada con otros tratamientos para tener una mejor respuesta en contra del parásito y utilizarla en el caso de otras parasitosis como es el caso de la cisticercosis porcina.

## CONCLUSIONES.

Con base a los resultados obtenidos en esta tesis se concluye lo siguiente:

1. Existe una respuesta inmune secuencial causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps* con una clara respuesta tipo Th1 inicial culminando con una tipo Th2 en etapas crónicas de la infección.
2. La respuesta inmune tipo Th1 se encuentra ampliamente relacionada con la protección del hospedero por medio de la restricción del crecimiento parasitario, mientras que una respuesta tipo Th2 es favorable y permite el crecimiento y la instalación óptima del mismo.
3. El uso de una misma cantidad de antígeno administrada de manera fraccionada (diferentes concentraciones) en diferentes tiempos, influye tanto en el tiempo de activación de la respuesta inmune como en su polarización.
4. El uso de bajas dosis de antígeno inducen un tipo de respuesta Th1, con una duración más prolongada de lo normal proporcionando así un mayor grado de protección en contra de la cisticercosis experimental.
5. El uso de dosis altas a bajas administradas durante diferentes intervalos de tiempo inducen también una respuesta tipo Th1
6. Las dosis altas administradas constantemente inducen una respuesta de tipo mixta pero con un perfil dominante tipo Th2
7. El tratamiento de dosis alta y única inducen evidentemente una respuesta Th2, la cual apareció más tempranamente facilitando de este modo el establecimiento del parásito.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

---

1. Abbas, A. K., Kenneth M. Murphy and Alan Sher. (1996). Functional Diversity of Helper T lymphocytes. *Nature*. October, 31: 787-793.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H & Pober, J. S. (1997). *Cellular and Molecular Immunology*, 3th Edition., W.B. Saunders Company., USA., 493.
3. Afonso L.C.C., scharton T. M., Viera L. Q., Wysocka M, Trincheri G. and Scott P. (1994). The adjuvant effect of Interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 263: 235-237.
4. Agrewala, J.N., Suras Susmit, Verma Rakesh K and Mishra. Differential Effect of Anti-B7-1 and Anti-M150 Antibodies in restricting the Delivery of Costimulatory Signals from B Cells and Macrophages. *The Journal of Immunology*. 1998, 160: 1067-1077.
5. Bojalil R., L.I., Terrazas, Govezensky T., Scitutto 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.
6. Bradley L.M., Yoshimoto K. and Swain S. (1995). The cytokines IL-4, IFN-g and IL-12 regulate the development of subsets of memory effector helper T cells in vitro. *J. Immunol*. 155: 1731-1724.
7. Brestcher P.A., Wei G., Menon J.N., Bielefeldt O H. (1992). Establishment of stable cell-mediated immunity that make "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257 :539-542.
8. Brodsky FM and . Guargliardi L. (1991). The cell biology of antigen processing and presentation. *Ann Rev Immunology*. 9:707-744.
9. Bronowski, J. (1970). New concepts in the evolution of complexity. *Syntheses*, 21, 228 pp.
10. Brusca R., C. and Brusca G., J. (1990). *INVERTEBRATES*, Sinauer Associates, Inc. USA., 922 pp.
11. Chatuverdi P., Yu Q., Southwood S., Sett A., Singh B. (1996) Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells. *Int. Immunol*. 8: 745-755.

12. Chen Y., Kuchroo v.K., Inobel J., Hafler D.A., Weiner H.L. (1994). Regulatory T Cell clones induced by oral tolerance: supression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 265: 1237-1240.
13. Chen Y., Inobe J., Marks R., Gonnella P., Kuchroo V.K. and Weiner H.L. (1995) Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 376: 177-180.
14. Constant S., Pfeiffer C., Woodard A., Pasqualini T., Bottomly K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* 182: 1591-1596.
15. Curry A.J., Else K.J., Jones F., Bancroft A., Grecis R. and Dunne D.W. (1995). Evidence that cytokine-mediated immune interactions induce by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infect with *Trichuris muris*. *J. Exp. Med.* 181: 769-774.
16. David, P. and Huston, MD. (1997) The biology of the Immune System. *JAMA*, Dec, 278 (22).
17. De Magistris M.T., Alexander J., Coggeshall M., Altman A., Gaeta F. C.A., Grey H. M. and Sette A., (1992). Antigen Analog-Major Histocompatibility Complexes Act as Antagonists of the T Cell Receptor. *Cell* 68 (21): 625-634.
18. Doherty T.M and Coffman R.L. (1996). *Leishmania major*. Effect of Infectious Dose on T Cell Subert Development in BALB/c MICE. *Experimental Parasitology* 84: 124-135
19. Dubey C., Croft M., and Swain S.L. (1996). Naive and effector CD4<sup>+</sup> T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *Immunol.* 157 :3280
20. Else K.J. and Grecis P.K. (1991). Cellular Immune Responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential cytokine production during acute or hronic infection. *Immunol.* 72:508-513.
21. Evavold B.D. and Allen P.M. (1991). Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science*, 252: 1308-1310
22. Fresno, M., Kopf, M. and Rivas. (1997). Cytokines and infectious diseases. *Immunology Today*,(18), 2: 56-58.
23. Fearon D.T. and Locksley R.M. (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*. 272:50-53.

24. Finkelman F D. (1995) Relationship among antigen presentation, cytokine, immune deviation and autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 182: 279-282.
25. Fox, S.W., (1985). Morphogenesis within evolution: morphomolecular evolution , in *Evolution and Morphogenesis*. Mlíkovský, J. And Novák, V.J.A., Eds., Academia, Prague, 97 pp.
26. Gajewski, T F., D.W., Stack R. and Fitch F.W. (1994). “Anergy” of Th0 Helper T Lymphocytes Induces Downregulation of Th1 Characteristics and a Transition to a Th2-like Phenotype. *J. Exp. Med.* 179: 481-491.
27. Gause W.C., Mitgro V., Via C., Lunsley P., Urban J.F. and Greenwald J. (1997). Do effector and memory cells also need B7 ligand costimulatory signals?. *J. Immunol.* 159 1055-1058.
28. Gessner A., Blum H., Rollingoff M. (1993). Differential regulation of IL-9 expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunol.* 189: 419-435.
29. Godfrey D. I. and Zlotnik A., (1993). Control points in early T-cell development. *Immunology Today.* 11 (14): 547-553.
30. Gorczyns M.R. (1995). Regulation of IFN- $\gamma$  and IL-10 Synthesis in vivo, as well as continuous Antigen Exposure is Associated with Tolerance to Murine Skin Allografts. *Cel. Immunol.* 160: 224-231.
31. Grecis, R.K., Hunter L. and Else K.J., (1991). Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: Activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunol.* 74: 329-332.
32. Hara J., Ohtani H., Matsumoto T., Nakamura S., Kitano A., Arakawa T., Nagura H and Kobayashi K. Expression of Costimulatory Molecules B7-1 and B7-2 in Macrophages and Granulomas of Crohn's Disease: Demonstration of Cell-to-Cell Contact with T Lymphocytes. *Lab. Invest.* 1997, 77(2): 175-184.
33. Hermanek J., Goyal P.K., Wakelin D. (1993). Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity. *Parasite Immunol.* 16: 111-117.

34. Huerta L., Terrazas L.I., Sciuotto E. and Larralde C (1992). Immunological mediation of gonadal effects on experimental cysticercosis caused by taenia crassiceps metacestodes. *J Parasitol.* 78 (3): 471-476.
35. Hosken N.A., Shibuya K., Heath A.W., Murphy K.M., O'garra A.O. (2005). The effect of antigen dose on CD4<sup>+</sup> T helper cell phenotype development in a T cell receptor  $\alpha/\beta$ -transgenic model. *J.Exp. Med.* 192: 1579-1584.
36. Kemp M., Kurtzals J.A., Kharazmi A., Theander T.G. (1994). Interferon gamma and interleukin-4 immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. *Immunol.* 82: 462-467.
37. Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.A., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi N. and Glimcher L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707-715.
38. Kumar V., Bhardawaj V., Soares L., Alexander J., Sette A., Sercarz E. (1995). Major histocompatibility complex binding affinity of an antigenic determinant is crucial for the differential secretion of interleukin 4/5 or Interferon gamma by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9510-9514.
39. Lenschow D.J., Walunas T.L. and Bluestone J.A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Ann. Rev. Immunol.* 14: 233-258.
40. Lewin B. (1995). *GENES V.* 5<sup>th</sup> Edition. Oxford Press. USA. 1272 pp.
41. Lewis D. and Harriman Gr. (1996) Cells and Tissues of the immune system. In Rich RR, Fleisher TA., Schwartz BD, Shearer WT, Strober W eds. *Clinical Immunology Principles and Practice* St Louis, Mo: Mosby-Year Book Inc (1) 15-38.
42. Liblau R.S., Singer S.M. and McDevitt H.O. (1995). Th1 and Th2<sup>CD4+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol. Today* 16: 35-38.
43. Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry.* 193: 265-275.
44. Löther, R. (1985) Evolutionary aspects of health and disease in Evolution and Morphogenesis, Mlikovsky, J. And Novák, V.J.A., Academia Prague, 131 pp.

45. Magram J, Connaughton E.S., Warriar R.R., Carvajal D.M., Chang-You W., Ferrante J., Stewart C., Sarmiento U., Faheerty D.A. and Gately M.K. (1996). IL-12 Deficient mice are defective in IFN- $\gamma$  production and type cytokine responses. *Immunity*, Vol. 4: 471-481.
46. Marinaro M., Staats H.F., Hiroi Takachika., Jackson R. J., Coste M., Boyaka P.N., Okahashi N., Yamamoto M., Kiyono H., Bluethmann H., Fujihashi K and McGhee J.R. (1995). Mucosal Adjuvant Effect of Cholera Toxin in Mice Results from induction of T Helper 2 (Th2) Cells and IL-4. *The Journal of Immunology* . 155: 4621-4629.
47. Manoutcharia K., Rosas G., Hernández M., Fragoso G., Aluja A., Villalobos N., Rodarte L.F and Sciuotto E (1996). Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigen. *Journal of Parasitology* 82(2): 250-254.
48. Martin D., Slim J.G. and Sole G.J. (1995). CD4<sup>+</sup> Lymphocyte count in African patients co-infected with HIV and Tuberculosis. *J AIDS Hum. Retrovirol.* 8:386-391.
49. Mc Arthur J.C. and Rauler D.H. (1993). *J. Exp. Med.* 178: 1645.
50. McKnigh A.J. Perez V.L. Shea C.M., Gray G.S. and Abbas A.K. (1994). *J. Immunol.* 152: 5220.
51. Mirales G., D., Stoeckle M., Y., McDermott., D., F., Finkelman F., D. and Murray., H., W. (1994). Th1 and Th2 Cell-Associated Cytokines in Experimental Visceral Leishmaniasis., *Infection and Immunity.* 62 (3):1058-1063 pp
52. Mire-Sluis and Robin Thorpe. (1998). *CYTOKINES*. Academic Press. USA. 584 pp.
53. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bound M.W., Giedlin M.A. and Coffman R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2358.
54. Mosmann, T.R., Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells (1989). Different Patterns of Lymphokine Secretation Lead to Different Functional Properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7:145-73.
55. Mosmann T.R. and Coffman R.L. (1987) Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunol. Tod.* 8: 223-226
56. Mosmann, T. R. and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immun. Tod.*, March 3 (17): 138-146.

57. Nabors S.G., Nolan T., Croop W., Li J., and Farrel P.J. (1995). The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune response in Balb/c X C57BL/6 F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol.* 17: 569-579.
58. Nicholson L.B., Geer J.M., Soberl R.A., Lees M.A., Kuchroo V.K. (1995). An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 3: 387-405
59. Nicholson L.B. and Kuchroo V.K. (1996). Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr. Op. Immunol.* 8: 837-842.
60. Ogarra A., Murphy K.J. (1996). Role of cytokine in the development of Th1 and Th2 cells. *Chem Immunol.* 63: 1-13
61. Pearlman E., Kazura W.J., Hazlett E.F., and Boom H.W. (1993). Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cells responses. *J. Immunol.* 151: 4857-4864.
62. Pearce E.J., Reiner S.L. (1995). Induction of Th2 responses in induction diseases. *Curr. Op. Immunol.* 7: 497-504.
63. Pritchard D.I. (1995). The survival strategies of hookworms. *Parasitol. Today.* 11: 255-259.
64. Ranke M.K., Scoot D.E., Quigley L., Gray G.S., Abe R., June C.H. and Perrin P.J. (1995). *L. Clin. Invest.* 96: 2195.
65. Reinisch, C.L. and Litman, G.W. (1989). Evolutionary Immunobiology, *Immunology Today.* 10, 278.
66. Reiner S.L. and Locksley R.M. (1993). The Worm and the Protozoa: Stereotyped Responses or Distinct Antigen? *Parasitology Today.*, 9 (7): 258-260 pp
67. Reiner S.L., Zheng S., Wang Z., Stowring L. and Locksley R.M. (1994). *Leishmania* promastigotes evade interleukin IL-12 induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4<sup>+</sup> T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* 179: 447-456.
68. Reiner S.L. and Locksley R.M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 151-177

69. Rich RR, Fleisher TA, Schwartz BD, Shearer WT, Strober W, eds. *Clinical Immunology Principles and Practice*. St Louis, Mo: Mosby-Year Book Inc; 1996: 115-30.
70. Roitt I., Brostoff J. And Male David. (1998). *IMMUNOLOGY*, 4<sup>th</sup> Edition., Mosby., USA. 28. 15.
71. Rolink, A. & Melchers, F., *Molecular and Cellular Origins of B Lymphocyte Diversity*. *Cell.*, 1991, Sept, 20 (66):1081-1094.
72. Romagnani S. (1998). *The Th1/Th2 Paradigm in Disease*. Chapman & Hall. I.T.P., 241pp.
73. Rugtveit J., Bakka A. and Brandzaeg P. Differential distribution of B7.1(CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subset in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clin. Exp. Immunol.* 1997, 110: 104-113.
74. Salgame P., Abrams J. S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R. L. and Bloom B., R. (1991). Differing Lymphokine Profiles of Functional Subsets of Human CD4 and CD8 T Cells Clones. *Sciences*. 254:279-282 pp.
75. Scharz D.G., Oettinger M.A., Schlissel M.S. (1992). V(D)J recombination. *Annual Revision of Immunology*. 10: 359-383 pp.
76. Scitutto, E., Fracoso G., Diaz M.L., Valdez E., Lomeli C., Govezensky T., Montoya R.M. and Larralde C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H 2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
77. Scott P. (1991). IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis. *J. Immunol.* 147: 3149.
78. Schortz D.G., Oettinger M.A., Schlissel M.S. V(D)J recombination. *Annual Revision of Immunology*. 1992; 10:359-383.
79. Sebbing, A.R.D. and Heath, G.W., 1984. Is growth controlled by a hierarchical system?., *Zool. J. Linn. Soc.*, 80, 345 pp.
80. Seder R.A. and Paul E.W. (1994). Acquisition of lymphokine producing phenotype by CD4<sup>+</sup> T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 12:635-73 pp.
81. Seder R. A. and Le Gros G. G. (1995). The Functional Role of CD8<sup>+</sup> T Helper Type 2 Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 181: 5-7p

82. Sima, P., Vetvicka, V. (1990). Evolution of Immune Reaction., CRC Press., Boston, USA., 247 pp.
83. Silva J.S., Morrisey P.J., Grabstein K.H., Mohler K.M., Anderson D and Reed S.G. (1992). Interleukin 10 and interferon  $\gamma$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. J. Exp. Med. 175: 169-174.
84. Sloan-Lancaster J., Evavold B.D. and Allen P.M. (1993). Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. Nature. 363: 156- 159.
85. Smilek D., Wraith D.C., Hodgkinson S., Dwivedy S., Steinman L., McDevitt H.O. (1991). A single amino acid change in a myelin basic protein peptide confers the capacity to prevent rather than induce experimental autoimmune encephalomyelitis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 88: 9633-9637.
86. Stebbing, A.R.D. and Healt., G.W. (1984). Is Growth controlled by a hierarchical System?. Zool. J. Linn. Soc., 1984, 80, 345 pp.
87. Stevenson M.M. and Tam F. (1993). Differential induction of helper T cell Subsets during blood stage *Plasmodium chabaudi* as infection in resistant and susceptible mice. Clin. Exp. Immunol. 92: 77-83.
88. Stites D.P., Terr A. I. and Parslow T.G. (1998). Inmunología Básica y Clínica., 8ª. El Manual Moderno, S.A. de C.V., México., 1099 pp.
89. Terrazas L. I., Bojalil R., Govezensky T and Larralde C. (1994). A role for 17- $\beta$  estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). Journal of Parasitology. 80(4): 563-568 pp.
90. Terrazas L. I., Bojalil R., Govezensky T and Larralde C. 1998 Shift from an early protective Th1-Type immune response to a late permissive Th2-Type response in murine Cysticercosis (*Taenia crassiceps*). Journal of Parasitology. 84(1): 74-81 pp
91. Trincheri G. (1989). Biology of natural killer cells. Adv. Immunol. 47:187-376.
92. Toledo A., Cruz A., Fragoso G., Lacleite J.P., Merchant T.M., Hernández M and Scitutto E. 1997. In vitro culture of *taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. Journal of Parasitology., 82(2): 189-193 pp.
93. Valdez F., Hernandez M., Govezensky T., Fragoso F. and Scitutto E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: Identification of the most

- promise antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitology*, 80 (6), 931-936.
94. Villa O.F. and Kuhn R.E. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1 associated phenomena. *Parasitol.* 112: 561-570.
  95. Wang L-F., Lin J-Y., Hsieh K-H. and Lin R-H (1996). Epicutaneous exposure of protein antigen induces a predominant Th2-like response with high IgE production. *J. Immunol.* 156: 4079-4082.
  96. Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 821-50
  97. Wauben M.H.M., Boog C.J.P., Van der Zee R., Joosten I., Schhief A., Van Eden W. (1992). Disease inhibition by major histocompatibility complex binding peptide analogues of disease-associated epitopes: more than blocking alone. *J. Exp. Med.* 176: 667-677
  98. Wraith D.C., Smilek, D.E., Mitchell D.J., Steinman, L and McDevitt H.O. (1989). Antigen Recognition in Autoimmune Encephalomyelitis and the Potential for Peptide-Mediated Immunotherapy. *Cell.* 59: 247-255.
  99. William J.R., Unanue E.R. (1990). Costimulatory requirements of murine Th1 clone. The role of accessory cell-derived signals in responses to anti-CD3 antibody. *J. Immunol.* 145: 85-93.
  100. Xu-Amano, J., Kiyono H., Jackson R. J., Staats H.F., Fujihashi K., Burrows P.D., Elson C. L., Pillai S. and McGhee J.R. (1993). Helper T Cell Subsets for Immunoglobulin A Responses: Oral Immunization with Tetanus Toxoid and Cholera Toxin as Adjuvant Selectively Induces Th2 Cells in Mucosa Associated Tissues. *J. Exp. Med.* 178: 1309-1320.