

23
ZEJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA EXPRESION DE MOLECULAS COESTIMULADORAS
B7 Y LA ACTIVACION DE MACROFAGOS SE ALTERAN
DURANTE LA INFECCION CRONICA EN EL MODELO
MURINO DE CISTICERCOSIS.**

TESIS

Que para obtener el titulo de Biólogo presenta:

Rodrigo Calderón Ponce

Director de Tesis: Dr Luis Ignacio Terrazas Valdés



México, D.F.

1999



277576

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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
AVENIDA DE
MEXICO

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:
LA EXPRESION DE MOLECULAS COESTIMULADORAS B7 Y LA ACTIVACION DE MACROFAGOS
SE ALTERAN DURANTE LA INFECCION CRONICA EN EL MODELO MURINO DE CISTICERCOSIS.

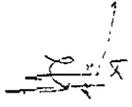
realizado por RODRIGO CALDERON PONCE

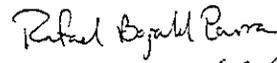
con número de cuenta 9450323-8 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

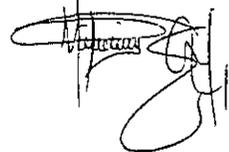
Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés 

Propietario Dr. Rafael Bojalil Parra 

Propietario Dra. María Eugenia Gonsbatt Bonaparte 

Suplente M. en C. Miriam Rodríguez Sosa 

Suplente Quim. Silvestre Alavez Espidio

Edna María Suárez Díaz

Consejo Departamental de Biología
Dra. Edna María Suárez Díaz

DEDICATORIAS

A mi madre por amarme, comprenderme, enseñarme y apoyarme en todos los momentos de mi vida y por haberme dado todo lo necesario y más, para que llegara hasta aquí.

A mi padre por haberme dado su amor y apoyo en cada momento.

A mi abuela por su amor y por haber dejado un poco de ella en mí.

A Julio por toda la enseñanza, el cariño y la amistad.

A mis hermanos de la vida con los que he compartido los mejores momentos así como las etapas difíciles: Ruly, Pato y Unser.

A mi tío Mario por su cariño y amistad.

A mi abuela Maru.

A la memoria de mis abuelos Mario y Rodrigo.

A Erika por su cariño y apoyo en una etapa muy importante de mi vida.

A mis amigos de la facultad: Al grupo complemento por haberme brindado su amistad desde el primer momento (Pilar, Verónica y Héctor). A Daniela, Maika, Lorena, Joaquín, Laura, Edith, Ursula, Samantha, Norman, Miguel, Leonor, Omar, Rashidi, Luli, Demon, Toño, Lemus, Julio, Jean Paul, Roberto y a todos aquellos que me brindaron su cariño y apoyo durante mi carrera.

A mis amigos de la Liga Olmeca y el Colegio Columbia.

A todos los maestros de la Universidad que me dieron su tiempo y conocimiento.

En especial a la Universidad Nacional Autónoma de México que atraviesa por momentos difíciles... tanto ha dado y tan poco le hemos devuelto.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, por su ayuda y apoyo para el desarrollo de esta tesis y por su amistad.

A la “doctora de doctoras” Miriam Rodríguez Sosa por dedicar tanto de su tiempo a la realización de este trabajo y por ser mas que una asesora, una excelente amiga.

Al Dr. Rafael Bojalil Parra por sus sabios consejos que en mucho contribuyeron no solo al desarrollo de este trabajo sino también a mi formación personal.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte por sus valiosas observaciones en este trabajo.

A mis amigos y compañeros del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” que con su buen humor amenizaron el trabajo, en especial a Magda, Vale, Rashidi, Elia, Silvia, Mónica, Edith, Maru y Soco.

Y a todos los que han compartido momentos conmigo a lo largo de esta etapa.
Muchas Gracias.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” bajo la dirección del Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y la asesoría del Dr. Rafael Bojalil Parra y la M. en C. Miriam Rodríguez Sosa. Ha sido en parte financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto: 0535PM).

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS.....	1
TABLAS Y FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
• Sistema y Respuesta Inmune.....	6
• Macrófagos.....	11
• Citocinas.....	13
• Oxido nítrico.....	14
• Prostaglandina E2.....	16
• Mecanismos de polarización de los linfocitos Th hacia una respuesta inmune de tipo Th1 o Th2.....	18
Naturaleza del Ag	
Vía de entrada del Ag	
Dosis administrada del Ag	
Cronicidad del estímulo	
Microambiente de citocinas	
Células presentadoras de Ag	
Modulación de receptores celulares	
• Moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2.....	27
MODELO EXPERIMENTAL.....	34
JUSTIFICACION.....	37
OBJETIVOS.....	39
HIPOTESIS.....	40
METODOLOGIA.....	41
RESULTADOS.....	47
DISCUSION.....	59
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	72

ABREVIATURAS

Ag	Antígeno
APC y CPA	Célula Presentadora de Antígeno
BSA	Albumina Sérica Bovina
FACS	Análisis de flujo citométrico
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
KLH	Hemocianina de caracol
LPS	Lipopolisacárido
M ϕ	Macrófagos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NO	Oxido Nitrico
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
PGE-2	Prostaglandina E-2
PTK	Proteína Tirosin-Cinasa
RI	Respuesta Inmune
TCR	Receptor de la Célula T
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
[3 H]TdR	Timidina tritada

TABLAS Y FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Arbol hematopoyético ..	8
Figura 2. Generación y rutas efectoras del NO.	16
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> .	36
Figura 4. Cinética de la parasitemia por <i>T. crassiceps</i> .	47
Figura 5. Expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2.	49
Figura 6A. Producción <i>in vitro</i> de IL-6.	51
Figura 6B. Producción <i>in vitro</i> de IL-12.	51
Figura 7 Producción <i>in vitro</i> de NO.	54
Figura 8. Producción <i>in vitro</i> de PGE-2.	56
Figura 9 Linfoproliferación en respuesta a KLH	57

RESUMEN

La respuesta inmune puede clasificarse en tipos Th1 o Th2, en función del patrón de citocinas secretado. El mecanismo último que modula la predominancia de uno u otro tipo de respuesta es hasta ahora desconocido. Recientemente se ha sugerido que las células presentadoras de antígeno podrían participar como importantes moduladores de la polarización de la respuesta inmune hacia alguno de estos dos subtipos. En la infección murina con cisticercos de *Taenia crassiceps* hay una polarización de la respuesta inmune de Th1 a Th2; en etapas tempranas de la infección hay una respuesta inmune tipo Th1 que restringe el crecimiento parasitario y en etapas crónicas hay una respuesta tipo Th2 que facilita el establecimiento del parásito. En este estudio, se buscó determinar si el tipo de respuesta inmune que se genera (Th1 o Th2) a lo largo de una infección con el cisticercos de *T. crassiceps*, pudiera estar relacionada con el estado de activación de los macrófagos (M ϕ). Se utilizaron ratones BALB/c sanos como control e inoculados con 25 cisticercos de *T. crassiceps*. A las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección, se les extrajeron las células del exudado peritoneal, de las que se seleccionaron las células adherentes (M ϕ). Se les midió la expresión de moléculas B7-1 y B7-2 (FACS), se estimularon con LPS para determinar la producción *in vitro* de citocinas (ELISA), óxido nítrico (NO) y prostaglandina E2. Además se evaluó su capacidad para presentar antígeno al cocultivar M ϕ con linfocitos TCD4⁺ sensibilizados con KLH y medir la linfoproliferación en respuesta a este mismo antígeno. Los resultados de este trabajo muestran que a las ocho y doce semanas de infección hay un claro incremento en el número de parásitos. Hay aumentos en la expresión de moléculas B7-2 y en la producción de IL-6, IL-12 y PGE-2, y una gran disminución en la producción de NO en los M ϕ provenientes de fases avanzadas de la infección (8 y 12 semanas) con respecto a los M ϕ de ratones no infectados y con infecciones tempranas 2 y 4 semanas de infección). La capacidad de los M ϕ para inducir linfoproliferación disminuyó significativamente a partir de la semana 4 de infección y continuó disminuyendo al menos hasta la semana 12. Podemos concluir que el estado de activación de los M ϕ -tanto en lo que se refiere a la expresión de moléculas en su superficie (B7-2) como a la secreción de moléculas al medio- y su capacidad para activar linfocitos, varían notablemente como resultado de la cronicidad de la infección, al menos en el modelo murino de cisticercosis. Esto sugiere que existen cambios en los M ϕ a la largo de una infección crónica, y que estos cambios observados podrían participar en la modulación de la polarización de la respuesta inmune hacia los subtipos Th1 o Th2. Conocer con mayor detalle las condiciones de polarización de la respuesta inmune permitirá en un futuro manipularla para beneficio de la humanidad.

INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial. Los parásitos son los agentes causantes de mayor morbilidad y mortalidad en muchos países en vías de desarrollo. Se calcula que aproximadamente 30% de la población mundial presenta algún tipo de parasitosis. La magnitud que ha alcanzado este problema de salud pública es la razón principal del interés que hay por la inmunidad a parásitos, y es por esto también que se desarrolló la inmunoparasitología como un derivado de la inmunología cuyo fin es el de estudiar y conocer a profundidad las interacciones parásito-hospedero a nivel inmunológico (Abbas, Lichtman y Pober, 1997).

En una relación balanceada hospedero-parásito, el parásito no pone en riesgo el bienestar del grueso de la población de hospederos, por lo menos en la etapa pre-reproductiva. Algunos escritos de inmunología de hace 20 ó 30 años abarcan la noción evolutiva de 'hospedero muerto → parásito muerto', junto con especulaciones sobre como pueden los parásitos establecer una residencia permanente en hospederos inmunocompetentes. Esta serie de observaciones despertaron una duda, si los parásitos que establecen infecciones crónicas son realmente inmunogénicos o no. Métodos serológicos y otras pruebas subsecuentes demostraron que todos los parásitos son inmunogénicos. Las razones por las cuales las infecciones parasitarias persisten se encuentran en la evolución de las complejas interacciones entre las tácticas de evasión del parásito y las medidas de represalia del hospedero (Mitchell, 1991).

Las infecciones parasitarias causadas por helmintos constituyen un constante riesgo, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo (Maizels et al, 1993; Rodríguez et al, 1999). Estas infecciones son, generalmente, crónicas y persisten en el individuo durante largos periodos de tiempo, durante el cual, el hospedero no es capaz de generar una respuesta inmune protectora a pesar de la constante exposición al parásito. Los helmintos son casi siempre patógenos extracelulares y su ciclo de vida requiere de la existencia de un hospedero intermediario o por lo menos un estadio a través del suelo o el agua. Debido a que presentan ciclos de vida complejos, con antígenos estadio-específicos, el control inmunológico de estas enfermedades presenta muchos problemas (Terrazas, 1998). La patogenicidad de estos parásitos tiene distintos niveles. esta variación se debe a diversas causas. la vía de entrada, el estadio de infección, la localización anatómica del parásito, la cronicidad de la infección y la cantidad de individuos que parasitan al hospedero. La capacidad de los helmintos para infectar a su hospedero durante largos periodos de tiempo, a pesar de ser reconocidos y atacados por el sistema inmune. constituye una de las principales preguntas a resolver en este campo. Por esto, el desarrollo de vacunas contra este tipo de parásitos constituye un objetivo importante en los países con altos índices de incidencia de este tipo de infecciones. Sin embargo, por tratarse de organismos complejos, es necesario conocer a detalle cuales son los mecanismos inmunológicos que están involucrados en la susceptibilidad o resistencia al parásito, así como las formas mediante las cuales, este evade o resiste la respuesta inmune (Terrazas, 1998).

Los mecanismos que utilizan estos parásitos para establecerse, temporal o permanentemente, en un hospedero inmunológicamente competente son muy complejos.

Algunos, manipulan la respuesta inmune para favorecer su establecimiento e incluso pueden llegar a aprovechar las sustancias “dañinas” secretadas por las células del sistema inmune para su desarrollo o para el paso de una fase de su ciclo de vida a otra (Amiri et al, 1992). Actualmente, se sabe que el resultado de muchas parasitosis en términos de resistencia o susceptibilidad puede depender directamente del patrón de citocinas que presentan las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ involucradas en la respuesta inmune antiparasitaria y por lo tanto también del estado de activación de las células presentadoras de antígeno que activan a dichos linfocitos.

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, 1997; Roitt, 1998). Se entiende por inmunidad como la protección contra enfermedades infecciosas, las cuales implican una serie de reacciones que se presentan en un organismo en contra de sustancias 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 linforreticulares, tales como, ganglios linfáticos, bazo, médula ósea, timo y los tejidos linfoides asociados a las mucosas de los intestino y del sistema genito-urinario así

como del árbol respiratorio. Esta diversidad de células al asociarse con diferentes factores moleculares, participan en el desarrollo y funcionamiento de este sistema como es el caso del plasma, citocinas, hormonas, iones y moléculas nutritivas, los cuales, en conjunto, son responsables de realizar los eventos de la respuesta inmune y constituyen al sistema inmune. Todas las células que intervienen en la respuesta inmune se originan de células madres hematopoyéticas totipotenciales (Fig. 1).

El sistema inmune ha evolucionado para proteger a los organismos de las condiciones ambientales adversas a las que han sido 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 montar una respuesta inmune contra lo ajeno, diferenciándolo de lo propio. La capacidad de defensa que presenta un organismo al momento del contacto con otro organismo 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 (David y Huston, 1997).

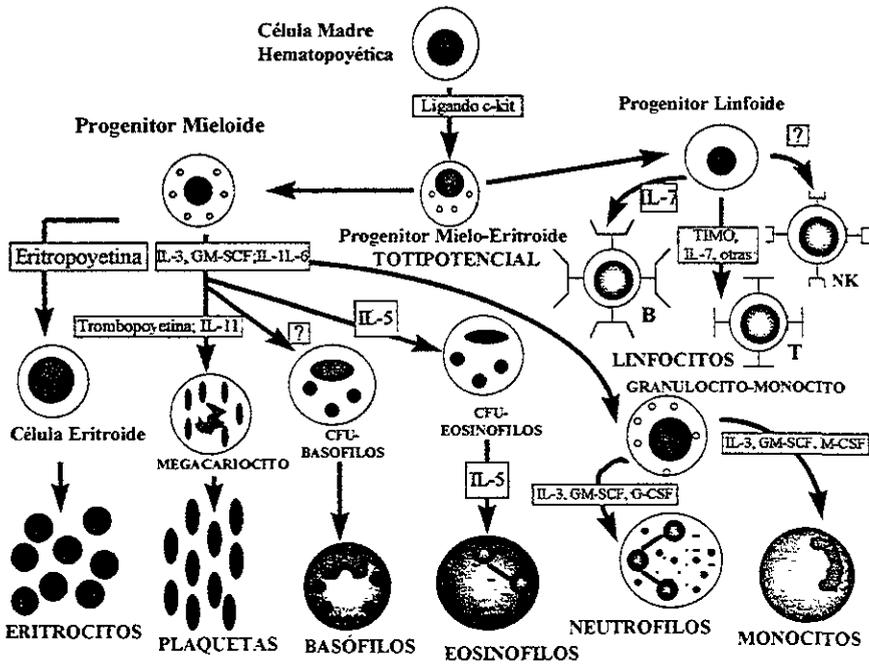


Fig 1. Arbol hematopoyético. Durante el desarrollo hematopoyético, los diferentes linajes celulares se derivan de una misma célula madre hematopoyética la cual tiene la característica de ser totipotencial. Existen factores y señales que participan en la maduración de los diferentes linajes celulares hematopoyéticos generando microambientes 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

La parte celular del sistema inmune representada por los leucocitos incluye granulocitos, células presentadoras de antígeno (APC) y linfocitos. El conjunto de granulocitos, también conocidos como polimorfonucleares abarca a los neutrófilos, los eosinófilos, basófilos y mastocitos. 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). Los macrófagos y monocitos también participan en la respuesta inmune adquirida, en la cual, participan junto con las

poblaciones celulares antes mencionadas, así como células de Langerhans, 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 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), con dos clases clase 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). 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 (péptidos procesados en endosomas y lisosomas derivados de endocitosis y son generalmente exógenos) con una unión por lo general no-covalente (Abbas, 1997, Watts, 1997, Stites. 1996). Tanto la expresión de moléculas MHC como la presentación de antígenos procesados sobre éstas determina, si los linfocitos interaccionan o no contra sustancias u organismos extraños (Abbas, 1997). Entonces, la población encargada de mediar la inmunidad principalmente está representada y controlada por los fagocitos (macrófagos y monocitos), células dendríticas y linfocitos (David, 1997; Rissoan et al, 1999)

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) (Lewis D y Harriman, 1996).

Los receptores de las células T tienen la función de unirse a los antígenos procesados (en péptidos pequeños), expuestos propiamente por las células presentadoras de antígeno (APC), como por ejemplo, los macrófagos, (Brodsky y Cuarghiardi, 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, 1992). Estas células (aunque no son APC por excelencia) 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 el receptor de células T (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 adición 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, 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⁺ y CD8⁺ (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⁺ son responsables de funciones cooperadoras en el control de la respuesta inmune (Seder y Le Gross, 1995).

Macrófagos

A mediados del siglo XIX el embriólogo ruso Elie Metchnikoff, haciendo investigaciones sobre el origen del mesodermo, comenzó a dilucidar las complejas funciones de la célula fagocítica e hizo un detallado seguimiento de estas funciones a lo largo del desarrollo embrionario así como de la escala filogenética. En un principio con el fin de conocer su función en el desarrollo ontogénico, y después como parte de una teoría a la que llamó “fisiología de la inflamación”. Sus observaciones demostraron que aunque los fagocitos cumplen un papel nutricional en animales “inferiores”, no lo hacen así en aquellos animales que presentan un intestino. Así, Metchnikoff combinó diversas observaciones obtenidas de estudios en embriología, microbiología y patología para crear una nueva teoría de la inmunidad. En ella propone que el fagocito “la célula que come” mantiene su función filogenética primordial como defensor del organismo, y no como un simple sistema nutricional. La hipótesis de Metchnikoff va aun mas allá, ya que su propósito era el de definir los mecanismos evolutivos responsables de la teoría de Darwin. A partir de esto propone que la inmunidad es un proceso “definitorio” del organismo que se acompaña del subordinado proceso de la protección, definitorio debido a que la inmunidad constituye el mecanismo principal para definir lo propio y diferenciarlo de lo extraño. Por lo tanto, los procesos inmunitarios mas tempranos son aquellos que dirigen el desarrollo embrionario, y solamente cuando el organismo madura se utilizan estos mismos

mecanismos para defenderlo de patógenos invasores. Metchnikoff, entonces, considera a la célula fagocítica como la célula armonizante durante el desarrollo ya que media las reacciones que permiten la conjunción de elementos celulares potencialmente discordantes (Tauber, 1994). El sistema fagocítico mononuclear constituye la segunda mayor población de células del sistema inmune y consta de células con un ancestro común o progenitor mielóide que da origen a 5 líneas celulares (Fig. 1): la eritroide, que posteriormente da origen a los eritrocitos; la de los megacariocitos, que dan lugar a las plaquetas; el progenitor de basófilos; el de eosinófilos y el progenitor llamado granulocito-monocito, que da origen tanto a neutrófilos como a monocitos (Abbas Lichtman y Pober, 1997). Los monocitos salen de la médula ósea y entran al torrente sanguíneo. Una vez que estos monocitos entran a tejidos, maduran y se transforman en macrófagos ($M\phi$). Estos pueden ser activados por una gran variedad de estímulos y pueden adquirir diferentes morfologías. Los $M\phi$ se encuentran en todos los órganos y tejidos conectivos y fagocitan partículas extrañas como microbios, macromoléculas e incluso tejidos del propio organismo que se encuentren lesionados o muertos (Abbas, Lichtman y Pober, 1997). Se cree que el reconocimiento de sustancias extrañas se da por receptores de fosfolípidos y azúcares, sin embargo los mecanismos precisos aún no se conocen. Los $M\phi$ también fagocitan partículas cubiertas con proteínas que pueden provenir de respuestas inmunes específicas o inatas. Estas células, además, tienen la capacidad de secretar enzimas, oxígeno reactivo y óxido nítrico que sirven para destruir microbios y controlar la diseminación de infecciones. También producen citocinas que reclutan otras células, especialmente linfocitos T $CD4^+$ y neutrófilos. Uno de los más importantes inductores de este tipo de respuesta es un componente de la pared celular de las bacterias gramnegativas (Frosch et al, 1997)

llamado endotoxina (lipopolisacárido LPS) que se une a la molécula de superficie CD14 del Mφ. Sin embargo, quizá la mas importante de las funciones de los Mφ es la capacidad que estos tienen para presentar antígenos extraños en su superficie de una forma tal que este puede ser reconocido por linfocitos T específicos para ese antígeno. Al mismo tiempo producen diferentes citocinas (específicamente IL-6, IL-10, IL-1 e IL-12) que modulan la proliferación y diferenciación de las células T (Abbas, Lichtman y Pober, 1997).

Estudios recientes en inmunología han enfatizado en la idea de que los macrófagos juegan un papel crítico en el sistema inmune, tanto como reguladores de la homeostasis así como de células efectoras durante una infección (Celada y Nathan, 1994).

Citocinas

Las citocinas son moléculas de comunicación que juegan un papel esencial en la interacción célula-célula que a su vez es importante en el control del equilibrio del sistema inmune. La falla en alguna de estas citocinas generalmente desencadena desordenes patológicos de muchos tipos, incluyendo varias enfermedades inmunoinflamatorias. En un principio se creyó que los linfocitos y los monocitos eran los únicos tipos celulares que las producían, por lo que se les denominó linfocinas y monocinas respectivamente. Sin embargo, posteriores investigaciones demostraron que estas moléculas biológicamente activas tenían su fuente de producción en muchos otros tipos celulares (a excepción de IL-2) y por lo tanto se les dio un nombre mas apropiado, citocinas (Gupta, 1988). Estas moléculas ejercen sus funciones biológicas a través de la unión con receptores específicos en la superficie de sus células blanco. Gran parte de las citocinas y sus receptores ya se

encuentran identificados a nivel molecular. Algunos estudios con moléculas recombinantes y sus anticuerpos han revelado que las características de las citocinas son su pleiotropismo funcional y su redundancia. Esto debido a que en un principio se creía que cada citocina ejercía un efecto específico en cada célula blanco. Sin embargo este no es el caso, de hecho, la mayoría de las citocinas presentan una gran variedad de efectos biológicos en diferentes tejidos y células. La IL-6 es el ejemplo típico de una citocina multifuncional (Kishimoto et al, 1992; 1994). Originalmente se identificó como un factor de diferenciación de células B que participa en la maduración final para la transformación de células B en células productoras de anticuerpos. Sin embargo, estudios subsecuentes demostraron que no solo funciona en el sistema inmune sino también en el hematopoyético, endócrino, hepático e incluso el nervioso. Las citocinas también actúan de una forma redundante, es decir, diferentes citocinas pueden actuar en un mismo tipo celular para mediar efectos similares, por ejemplo, al igual que la IL-6 también la IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ y varias otras citocinas tienen la capacidad de inducir la producción de anticuerpos en células B (Kishimoto et al, 1994).

Oxido nítrico.

En 1987, Furchott e Ignarro propusieron que el factor de relajamiento derivado del endotelio (EDRF) debía ser óxido nítrico (NO) o alguna molécula relacionada con este. La primera demostración directa de la secreción de NO en células de mamíferos se observó en el endotelio vascular donde juega un importante papel en el control del tono vascular y agregación plaquetaria. Desde entonces, la secreción de NO se ha demostrado en muchos tejidos. Para los inmunólogos la característica más importante del NO es su inducción en

células endoteliales, macrófagos, neutrófilos y hepatocitos tras la estimulación con TNF- α e IFN- γ . Los macrófagos producen nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-) derivados de L-arginina y su producción es inhibida por analogos estructurales como la N^G -monometil-L-arginina (L -NMMA) (Fig 2a). Se ha demostrado que el NO se sintetiza a partir de uno de los átomos terminales guanidino-nitrógeno de la L-arginina. La enzima responsable de la síntesis de NO (NO sintetasa) es citosólica, dependiente de NADPH. Entre las funciones del NO en el sistema inmune destacan : la actividad de ataque no-específico contra células tumorales mediado por IFN- γ y LPS (Hibbs et al, 1987); actividad citostática contra los patógenos *Cryptococcus neoformans* y *Toxoplasma gondii* (Granger et al, 1986). Se ha comprobado la importancia del NO en otras infecciones parasitarias, principalmente en la leishmaniasis y trypanosomiasis. Los macrófagos peritoneales de ratón estimulados, *in vitro*, con IFN- γ y en presencia de LPS, condiciones que promueven la producción de NO, son eficientes leishmanicidas, actividad que puede ser inhibida con la adición de L -NMMA (Liew y Cox, 1991)

Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la actividad tóxica no-específica del NO no están del todo claros, sin embargo se ha postulado que el NO reacciona con los grupos Fe-S, resultando en la formación de complejos hierro-nitrosil (Fig. 2b) que causan la inactivación y degradación de los grupos prostéticos Fe-S de la aconitasa y de los complejos I y II de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Alternativamente, el NO puede reaccionar con el radical O_2^- para formar el anión peroxinitrito (ONOO^-) que se protona rápidamente para formar el radical hidroxilo HO y el radical libre estable NO_2 (Fig 2c). Los radicales hidroxilo son altamente reactivos, y pueden combinarse con casi todas las moléculas de las células vivas (Liew y Cox, 1991).

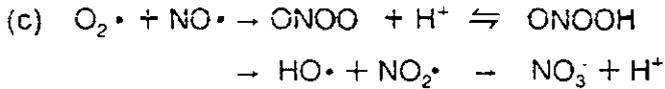
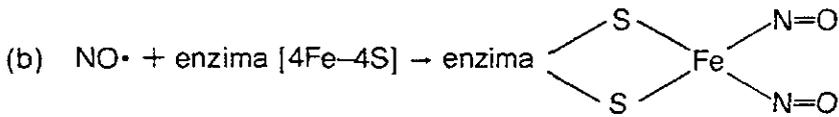
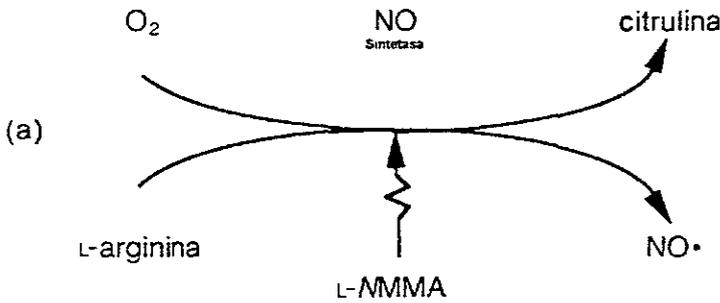


Fig 2. La generación del NO y los posibles mecanismos de su actividad microbicida (a) Síntesis del NO catalizada por la NO sintetasa e inhibida por el análogo de la L-arginina, L-NMMA (b) El NO puede reaccionar con grupos Fe-S formando grupos Hierro-Nitrosil inactivando y degradando grupos prostéticos Fe-S de diversas enzimas (c) Alternativamente el NO puede reaccionar con O₂ para formar HO altamente reactivo

Prostaglandina E2.

Las prostaglandinas (PG) son ácidos grasos poliinsaturados y oxigenados que contienen una estructura de anillo ciclopentano, se producen por la acción que ejerce la enzima ciclooxigenasa sobre el ácido araquidónico liberado de la membrana celular. Las

PG más estudiadas son las pertenecientes al grupo o serie E (i.e. PGE₁ y PGE₂). Las PGE son sintetizadas por macrófagos, células dendríticas foliculares y fibroblastos como producto principal del metabolismo del ácido araquidónico. Las PGE pueden ser inducidas por una gran variedad de estímulos membranales que incluyen IL-1, TNF- α , entrecruzamiento de receptores Fc, LPS y componentes de la cascada del complemento. Existe la noción de que las PG son supresores del sistema inmune, esto debido a que estudios *in vitro* han demostrado su habilidad para inhibir la mitogénesis de las células T, la producción de IL-2 y la síntesis de anticuerpos IgM en células B. Los efectos inhibitorios de la PGE resultan de su unión a un receptor que estimula la producción del segundo mensajero 3', 5' adenosin monofosfato cíclico (cAMP). El incremento en la concentración de este compuesto trae consigo una importante reducción en la actividad de ciertos eventos celulares y humorales. Esto ha contribuido a que se cree el concepto de que la PGE es únicamente una molécula inmunosupresora (Phipps et al, 1991).

Sin embargo, otros experimentos han demostrado que la PGE al activar al cAMP puede ejercer un efecto estimulante en la producción de IgE e IgG1 por parte de las células B, esto cuando sinergiza con la actividad del LPS e IL-4. Es importante considerar, también, el efecto de estas moléculas sobre las células T. Se ha comprobado que los agentes que incrementan las concentraciones de cAMP, incluyendo la PGE₂, pueden ser utilizados como marcadores de las señales que llevan a la diferenciación de las células Th hacia los subtipos Th1 o Th2. Se ha visto que existe un patrón de respuesta consistente: La PGE, al igual que otros agentes que elevan los niveles de cAMP, propician un considerable decremento en la producción de IL-2 e IFN- γ en células del subtipo Th1, por el contrario, no se han observado efectos inhibitorios de estas moléculas sobre la producción de IL-4 en

células del subtipo Th2 e inclusive se ha demostrado que las PGE junto con el cAMP estimulan la producción de IL-5 en estas mismas células. Se ha visto que el cAMP actúa disminuyendo los niveles del mRNA que codifica para IL-2 inhibiendo la producción de esta citocina, no así con la IL-4. La PGE no solo afecta el balance de IL-2 e IL-4, también afecta de manera considerable la producción de IFN- γ . Esta citocina, importante para la regulación de las moléculas del MHC clase II es inhibida de manera considerable por la PGE. Podemos decir entonces que el efecto neto de la PGE producida por una APC, sería el promover la estimulación de células Th2 productoras de IL-4 e IL-5 e inhibir la proliferación de las células Th1 (Phipps et al, 1991).

Mecanismos de polarización de los linfocitos Th hacia una respuesta inmune de tipo

Th1 o Th2

Para comprender la diferenciación de la respuesta inmune hacia el tipo Th1 o Th2 es importante comprender el papel de las células presentadoras de antígeno (principalmente macrófagos y células dendríticas), así como sus productos de secreción y las citocinas que participan en los mecanismos de polarización de los linfocitos T CD4⁺. Los linfocitos T CD4⁺ forman el grupo denominado "células colaboradoras" (T helper-Th) debido a su capacidad de iniciar y regular la respuesta inmune, de mediar las respuestas efectoras antígeno-específicas así como regular el estado de activación de otros leucocitos (Goodman, 1983). Los mecanismos capaces de encender, amplificar o apagar una respuesta inmune celular, aún no han sido totalmente estudiados. En los últimos años se ha dado gran

importancia al papel que desempeñan las diferentes citocinas en el desarrollo de la respuesta inmune y en el destino de las células T CD4⁺ vírgenes que han sido activadas por un antígeno. Por lo anterior, Mossman y Coffman observaron que la estimulación antigénica repetida en células T CD4⁺ *in vitro*, resultaba en el desarrollo de un patrón específico de citocinas que, invariablemente, caía en uno de dos tipos de subpoblaciones de células T. A partir de esto se concluyó que la población de células T CD4⁺ se subdivide en los subtipos Th1 o Th2 tanto por su función como por su perfil de producción de citocinas (Mossman y Coffman, 1986, 1987)

Las células del subtipo Th1 producen altos niveles de IL-2, IFN- γ , IL-18 y linfotóxina (TNF- β) y son responsables de la inmunidad mediada por células, así mismo inducen la activación de macrófagos, células T CD8⁺ citotóxicas, células NK y promueven las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH).

Por otro lado las células del subtipo Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. son capaces de generar y mantener una respuesta inmune humoral (mediada por anticuerpos), con proliferación y diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos (principalmente IgG1 e IgE), inmunidad de las mucosas por células cebadas, inducen la diferenciación y proliferación de eosinófilos y facilitan la producción de IgA.

Una vez diferenciadas, estas dos subpoblaciones celulares se regulan negativamente una a la otra por medio de la acción de las diferentes citocinas que producen. El IFN- γ tiene la capacidad de inhibir la proliferación de las células Th2, las producciones de IL-4 e IL-10, la producción de IL-10 proveniente de macrófagos y el reclutamiento de eosinófilos. Mientras que IL-4, IL-10 e IL-13 inhiben la acción del IFN- γ sobre sus células blanco e

incluso tienen la capacidad de inhibir la producción de IFN- γ por células del subtipo Th1 (Fiorentino et al, 1991).

En las investigaciones que se han enfocado a definir cuál es el factor determinante para la polarización de las células Th hacia alguno de las subpoblaciones celulares Th1 o Th2 tras el reconocimiento de un antígeno, se han hecho experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando diversos modelos de infección (bacterias, virus y parásitos) Todos estos estudios coinciden en que la participación de las subpoblaciones Th1 y Th2 son fundamentales para el resultado final de una infección. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual una célula T CD4⁺ se diferencia hacia el tipo Th1 o Th2 tras el estímulo antigénico, no es aún del todo conocido. Se ha propuesto que las características genéticas del individuo como el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), están involucrados en la diferenciación de estas células (Lindsay y Vijay, 1996, Murray, 1998), sin embargo, existen otros factores que pudieran influir de manera importante en la polarización de la respuesta inmune:

- **Naturaleza del antígeno:** A finales de los ochentas se empezaron a realizar estudios enfocados a analizar el papel de la estructura del antígeno en la generación de diferentes respuestas inmunes que generaran resistencia o susceptibilidad. Uno de los primeros trabajos donde se usaron péptidos modificados, fue en el modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), en el cual se ha reconocido universalmente como células autopatógenicas a las células Th1. Los experimentos descritos en este modelo demuestran que el péptido de mielina básica Ac 1-11 (MBP Ac1-11), que genera la encefalomiелitis, es capaz de proteger contra la enfermedad con el cambio de un solo residuo de aminoácido (Wraith et al, 1989) En su momento se

creyó que este efecto se debía a un bloqueo del MHC, pero subsecuentes análisis demostraron que este no era el caso para todos los péptidos (Smilek et al, 1991; Wauben et al, 1989). La identificación de diferentes antígenos modificados, los cuales, antagonizan (De Magistris et al, 1992), anergizan (Sloan et al, 1993) o parcialmente activan (Evavold, 1991) clonas de células T, sugiere que probablemente haya una cierta habilidad de estos antígenos para afectar la diferenciación de células T hacia uno de los dos subtipos celulares. Esto fue comprobado de forma parcial usando antígenos modificados con diferentes afinidades por las moléculas del MHC; en estos experimentos se modificaban residuos que afectaban la unión al MHC, pero se conservaban aquellos que interactuaban con el receptor de las células T (TCR). Los resultados demostraron que la inmunización con péptidos de baja afinidad inducían una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas tipo Th2, mientras que el uso de ligandos de alta afinidad incrementaba la producción de IFN- γ *in vivo* (Kumar et al, 1995). En un estudio análogo se encontró que los péptidos de baja afinidad inducían un incremento en la concentración de anticuerpos tipo IgG1 (Th2) y que los ligandos de alta afinidad inducían mayor concentración de anticuerpos IgG2a (Th1) (Chaturvedi, 1996). Parece ser que la manipulación del nivel de unión de un complejo péptido-MHC reconocido por células T puede influir en el fenotipo de las segundas. Existen más trabajos (Constaant, 1995; Hosken, 1995; Nicholson, 1995) que apoyan que la polarización de la respuesta inmune hacia los tipos Th1 o Th2 está mediada por el tipo de antígeno, independientemente de que estas repuestas sean o no protectoras (Scott, 1991).

- **Vía de entrada del antígeno:** Desde los años ochenta ya se mencionaba que la vía de exposición al antígeno en el hospedero era un factor determinante de la severidad y el curso que tomaban algunas infecciones (Van den Eertweg et al, 1992). Un claro ejemplo de esto se encuentra en el trabajo de Nabors y colaboradores en 1995, donde se reporta que la leishmaniasis varía en su severidad si el parásito es inoculado a nivel del cojinete plantar, por vía nasal, ótica o en diferentes zonas del abdomen. Inicialmente, esto se trató de explicar considerando ciertas variables del sitio como son: la temperatura local de la piel, la microvasculatura linfática o la distribución de las células de Langerhans. Sin embargo en un trabajo posterior se demostró la influencia del sitio de inoculación de un parásito (*Leishmania major*) sobre el tipo de respuesta montada. Se comprobó que los ratones F1 (BALB/c x C57BL/6) que eran inoculados en la piel dorsal desarrollaban una enfermedad progresiva con una respuesta tipo Th2, mientras que los inoculados en el cojinete plantar sanaban y presentaban una respuesta tipo Th1, la cuál se sabe, es requerida para la resistencia en contra de este parásito. Por otro lado, recientemente, se ha dado gran importancia al lugar en que se aloja el patógeno, así, de los trabajos realizados con infecciones parasitarias se ha llegado a concluir que para algunos agentes infecciosos, fundamentalmente virus y parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Reiner et al, 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (Martín, 1995), *Plasmodium sp* (Stevenson y Tam, 1993), la respuesta inmune dependiente de Th1 provee protección (Gessnar et al, 1993; Miralles et al, 1994; Kemp et al, 1993), en tanto una respuesta inmune mediada por Th2 es ineficiente y en ocasiones hasta facilitadora (Pearce, 1995). Por el contrario, otras infecciones, fundamentalmente aquellas causadas por bacterias y algunos parásitos extracelulares,

principalmente helmintos intraintestinales como *Trichuris muris* (Else y Grencis, 1991), *Trichinella spiralis* (Grencis et al, 1991; Pond et al, 1989) y *Necator americanus* (Pritchard, 1995) una respuesta dependiente de Th2 es capaz de establecer protección. Todo parece indicar, entonces, que la polarización de la respuesta inmune hacia los tipos Th1 o Th2 se ve influida tanto por la vía de entrada como por el alojamiento del antígeno.

- **Dosis administrada del antígeno:** Desde hace aproximadamente 20 años se sabe que la dosis de antígeno que reta a un organismo puede determinar la clase de respuesta inmune, ya sea hacia una inmunidad celular o humoral. Estudios más recientes sugieren que diferentes células T CD4⁺ efectoras pueden producir diferentes citocinas dependiendo de la dosis de antígeno usada. Se ha observado que dosis bajas promueven la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) al estimular el desarrollo de células Th1, mientras que dosis altas inducen la producción de anticuerpos debido a un incremento en la producción de citocinas tipo Th2 (Bancroft et al, 1994). Un ejemplo se observa con la disminución de la sensibilidad de ratones BALB/c a *L. major* tras una inyección inicial con un pequeño número de parásitos. Estos ratones resultaron resistentes a pequeños inóculos de *L. major*, pero además también fueron resistentes cuando se les retó 4 meses después con dosis de parásitos que normalmente serían letales. Estos ratones desarrollaron una inmunidad mediada por células caracterizada por un predominio de IFN- γ , y no una respuesta de IL-4, la cual se monta normalmente ante este parásito (Bretscher, 1992). En posteriores experimentos se observó que una cepa de ratones (BALB/k) que normalmente monta una respuesta tipo Th2 que provee resistencia en contra de *T. muris* se puede volver susceptible si se le infecta con dosis

bajas de este parásito (< 40 huevos). En este caso se registró una baja producción de citocinas del tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-9) y una elevada producción del tipo Th1 (IFN- γ) (Bancroft et al, 1994) que en estudios previos se había asociado a la susceptibilidad. En ambos casos se cree que las bases inmunológicas que explican el fenómeno están relacionadas a una dramática alteración en la respuesta de las células T CD4⁺ directamente dependiente de la dosis de antígeno. En los dos casos se involucran antígenos complejos, por lo que se podría asociar la presencia de diferentes péptidos, cuyas densidades virarían según la dosis de antígeno administrada, a las alteraciones en el tipo de respuesta. Esta serie de observaciones concuerdan con otras que afirman que el nivel de activación de las células presentadoras de antígeno influye en el fenotipo que desarrollan las células T CD4⁺ (Nicholson y Kuchroo, 1996). Así, tenemos que a bajas dosis de antígeno, se promueve el incremento de la subpoblación de células Th1 mientras que a dosis altas aumentan las Th2

- **Cronicidad del estímulo.** Existen algunas evidencias en enfermedades y/o infecciones crónicas de que un estímulo persistente contribuye al cambio de una respuesta tipo Th1 a una de tipo Th2 (Gorczyns, 1995) En el caso de las infecciones parasitarias existen algunos ejemplos, como es el de la infección murina por *Brugia malayi*, en la cuál se ha reportado que durante las dos primeras semanas después de la inoculación del parásito se presenta un perfil de citocinas tipo Th1 (altos niveles de IFN- γ), pero después de 21 días se da un incremento significativo en la producción de IL-4 e IL-5 con una clara disminución del IFN- γ , la cuál es dependiente de IL-10 (Pearlman, 1993) Otro claro ejemplo se observa en el modelo experimental murino de cisticercosis, donde también se ha observado un cambio secuencial de una respuesta Th1 a una respuesta Th2

conforme avanza la infección (Terrazas et al, 1998). En ambos casos queda claro que la cronicidad del estímulo promueve el cambio de una respuesta a la otra.

- **Microambiente de citocinas:** Actualmente existe un consenso general que reconoce que el principal estímulo para la polarización de la respuesta inmune hacia Th1 o Th2 son las citocinas, por sí mismas determinan la diferenciación de las células T vírgenes y probablemente de memoria. Aunque son varias las citocinas que intervienen en la respuesta inmune, se ha observado que tanto para ratones como para humanos la presencia de la IL-12, la cual es sintetizada principalmente por células presentadoras de antígeno, como macrófagos, monocitos y células dendríticas (Magrath et al, 1996), promueve la diferenciación de las células Th0 hacia Th1 pues induce la secreción de IFN- γ en células T activadas. Mientras que la presencia de IL-4 induce la diferenciación hacia el subtipo 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 antígeno (Pearlman, 1993). Tanto la IL-12 como la IL-4, parecen ser las citocinas más importantes que regulan la diferenciación hacia alguno de los subtipos celulares cuando se encuentran presentes en las etapas tempranas de una respuesta inmune (Nicholson y Kuchroo, 1996).
- **Las células presentadoras de antígeno (CPA):** Gajewsky y colaboradores (1991) publicaron evidencias que afirman que la proliferación de los tipos celulares Th1 y Th2 se ve influenciada por el tipo de células que les presentan el antígeno. Así, clones de células Th1 y Th2 específicas para ovoalbúmina (OVA) proliferan diferencialmente según el tipo de CPA. Los resultados obtenidos demostraron que las células adherentes (macrófagos y células dendríticas) inducen eficientemente la proliferación de células

Th1 pero no de las Th2. Por otro lado, los linfocitos B tienden a inducir la proliferación de las células Th2 pero no la de las Th1. Aún no se tiene una explicación completa de esto, sin embargo existe la posibilidad de que las diferentes CPA expresen cofactores especializados necesarios para la óptima proliferación de un tipo celular, pero no para el otro. Es decir que Th1 y Th2 tienen distintos requerimientos para reconocer la señal de proliferación provista por las diferentes CPA.

Recientemente, se ha observado que las células dendríticas constituyen una importante población de CPA, que influye de manera definitiva en la polarización inicial de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺. a partir de estas observaciones se han establecido dos poblaciones de células dendríticas dependiendo del tipo de respuesta que inducen, a estas subpoblaciones se les ha denominado DC1 y DC2, las cuales, polarizan a la respuesta inmune hacia Th1 y Th2 respectivamente (Rissoan et al, 1999).

- **Modulación de los receptores celulares:** Se ha propuesto que otro factor importante en la polarización de la respuesta inmune radica en moléculas coestimuladoras, que son capaces de completar el estímulo de las células T, en conjunto con el reconocimiento de un antígeno unido al MHC de la CPA. Diversos estudios sugieren que en ciertos modelos de enfermedades autoinmunes el bloqueo de B7-1 y B7-2 puede afectar el curso de la enfermedad (Kuchroo et al, 1995; Racke et al, 1995; Lenschow et al, 1995), esto es apoyado por otros estudios que sugieren que el bloqueo de moléculas como CD4, CD30 y CD2 afecta el fenotipo de las células Th y por lo tanto también la susceptibilidad a infecciones. Otra hipótesis propone que la diferenciación de una célula Th0 hacia Th1 o Th2 depende de manera importante de la movilización de calcio

(Ca²⁺) intracelular. Comparando clones del subtipo Th1 con otras Th2, demostraron que las células Th2 no acoplan Ca²⁺ de manera “aleatoria”, mientras que las Th1 si lo hacen (Gajewsky et al, 1990, 1994). En posteriores experimentos se demostró que a pesar de que todas las células Th0 están acopladas a la vía del Ca²⁺, solo las que se encuentran en condiciones generadoras de Th1 son capaces de amplificar esta vía de señalización, mientras que las que se someten a condiciones del tipo Th2 pierden selectivamente la habilidad para usarla (Sloan-Lancaster et al, 1993).

Moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2

El reconocimiento del antígeno por las células Th requiere de la presencia de células presentadoras de antígeno (CPA). Esto debido al hecho de que las células T no tienen la capacidad de reaccionar contra antígenos (Ag) procedentes de proteína intacta, solo reconocen aquellos que hayan sido procesados y expuestos en la superficie de las CPA. Esta presentación requiere de la presencia de pequeños péptidos unidos al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC), la interacción del complejo MHC/Ag con el receptor de las células T (TCR/CD3) constituye la única forma en que las células T pueden reconocer antígenos. La interacción entre el complejo TCR/CD3 y el complejo MHC/Ag en la CPA constituye una estructura que genera una señal de activación para las células T. Sin embargo, la interacción entre el complejo MHC/Ag en la CPA y el TCR CD4/CD8 en la célula T no es suficiente para generar una activación completa de la célula (June, 1994), para que la señal sea completa se requiere de moléculas coestimuladoras en la CPA que interactúen con sus ligandos en la superficie de la célula T. Dos de las moléculas coestimuladoras más conocidas y estudiadas son B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que se

encuentran en la membrana de las CPA y están directamente relacionadas con la segunda señal que requiere la célula T para su activación (Harding, 1992). Esta serie de señales activadoras se dan por medio de la ruta Ca^{2+} ciclofilina/calcineurina y esta mediada por tirosin cinasas (PTK's) asociadas a receptores ($P56^{lck}$ y $P59^{fyn}$) e incluye a: proteínas asociadas al complejo TCR/CD3-CD4 (ZAP-70 y SHC); proteínas asociadas (p120/130) al dominio 2 (SH2) de las PTK's y proteínas asociadas (PI 3-cinasa) al dominio 3 de las PTK's (SH3). Esta ruta resulta en la activación de las PTK's que fosforilan al motivo $CD28_{pYMM}$ (Rudd et al, 1994). Esta señalización induce la estabilización del mRNA de varias linfocinas seguida por un incremento en la transcripción (Fraser et al, 1991). Esta activación esta dada por la unión de CD28 al dominio SH2 de la subunidad p85 de la PI 3-cinasa por medio de su motivo citoplásmico $pYMM$ previamente fosforilado mediante la activación del complejo TCR/CD3-CD4. Esta unión de CD28 induce el reclutamiento de PI 3-cinasa y da como resultado la producción de IL-2 así como la activación de la síntesis de DNA (Rudd et al, 1994).

Las moléculas B7-1 y B7-2 son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y están compuestas por un dominio sencillo del tipo V de Ig y otro dominio sencillo del tipo C2 de Ig, ambos extracelulares. La comparación entre las secuencias de aminoácidos demuestra una relación distante entre B7-1 y B7-2, sin embargo se sabe que existen algunas similitudes a nivel estructural. El cDNA de B7-2 en ratón fue aislado, y aparenta estar íntimamente relacionado con su homólogo en humanos, esta homología se presenta principalmente en los dominios tipo Ig, y existe poca similitud en los dominios citoplásmicos, lo cual sugiere que las proteínas B7 no tienen una importante función de transducción de señales, sino que actúan únicamente como ligandos. En un

principio se pensó que B7-1 era un receptor que se expresaba solamente en células B, sin embargo, estudios mas recientes indican que tanto B7-1 como B7-2 se expresan también en macrófagos/monocitos, células dendríticas y linfocitos T activados. Se ha demostrado también que las citocinas juegan un papel fundamental en la expresión de las moléculas B7, parece ser que IL-2 e IL-4 promueven la expresión de B7-1 en células B estimuladas mientras que IL-7 induce su expresión en células T (June et al, 1994). Por otro lado se ha propuesto que el IFN- γ induce el aumento de la expresión de B7-2 en macrófagos de médula ósea infectados *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* (Frosch et al, 1997).

Estas moléculas expresadas sobre la superficie de las CPA se unen a CD28 y/o CTLA-4 en células T (June et al, 1994, Lenschow et al, 1996), cuando esta interacción se presenta induce la activación de las células T, sin embargo si la interacción no se da el resultado es la anergia y/o apoptosis de las células T (June et al, 1994)

Por otro lado, las moléculas CD28 y CTLA-4 pertenecen a la familia de genes CD28 y muestran un 31% de identidad entre ellas a nivel de la secuencia de aminoácidos, ambas presentan dominios extracelulares del tipo V de Ig, un dominio transmembranal y un dominio intracelular altamente conservado. Se ha probado que CD28 se expresa en todas las células T, ya sea en reposo o activadas, mientras que CTLA-4 solo se ha identificado en células T activadas. A pesar de la marcada similitud entre los dominios intracelulares de CD28 y CTLA-4, aun no se ha establecido el papel funcional de CTLA-4. Se ha sugerido que la unión de su ligando provoca la inhibición de señales negativas induciendo el aumento de la proliferación de las células T (June et al, 1994).

Como ya se mencionó anteriormente, es necesario que haya otras señales para que se de una correcta activación de las células T, entre estas destacan las moléculas

coestimuladoras y las señales inducidas por las citocinas que producen las CPA. Dentro de este contexto, los M ϕ juegan un papel fundamental como fuente de citocinas tempranas con capacidad de modificar de manera importante el subsecuente desarrollo de la respuesta inmune. En particular, las citocinas presentes durante la diferenciación de las células T influyen en la capacidad de los linfocitos Th para diferenciarse hacia Th1 o Th2. Los M ϕ , al ser estimulados, pueden producir citocinas que afecten directamente esta diferenciación, ya que son una fuente muy importante de IL-6, IL-10 e IL-12. Se sabe que la IL-12 se produce rápidamente después de una infección, probablemente como respuesta directa al contacto de la célula fagocítica con el patógeno (bacteria, parásito, toxina, etc...) influyendo de esta forma sobre el desarrollo posterior de la respuesta inmune. Otra citocina que es producida en grandes cantidades por los M ϕ es la IL-6, la cuál ha sido recientemente involucrada en los procesos de diferenciación de los linfocitos Th0 hacia Th2 (Rincón et al, 1997). Por otro lado la IL-10 se caracteriza por ser una citocina autorreguladora de la actividad del M ϕ aunque es probable que también participe en mecanismos de regulación de otras células inmunitarias: recientemente se ha descrito que la IL-10 puede inhibir la producción de IL-12, ejerciendo, por lo tanto, una acción autócrina sobre el mismo M ϕ .

Por otro lado, los M ϕ , como células presentadoras de antígeno, tienen una influencia sobre el desarrollo de la respuesta inmune, no solo por las citocinas producidas en respuesta a un estímulo, sino también por las moléculas coestimuladoras (B7-1 y B7-2) que expresan en su superficie. Recientemente, se ha desatado un gran auge en el estudio de las interacciones entre estas moléculas y sus ligandos CD28/CTLA-4 en células T, esto debido a que se ha demostrado que estas moléculas influyen cualitativamente en la diferenciación de las células T CD4⁺ por ser determinantes en el grado de activación de

estas, y cuantitativamente por su influencia en el perfil de citocinas producidas por los linfocitos Th una vez que han sido activados. Los resultados, en general, resultan contradictorios en cuanto a la importancia de estas moléculas en el desarrollo de una respuesta inmune tipo Th1 o Th2. Se ha demostrado que la repetida estimulación de CD28 induce el desarrollo de una respuesta tipo Th2 (King et al, 1995). Dentro de este contexto, varios experimentos que han analizado la participación de B7-1 y B7-2 en la polarización de la respuesta inmune arrojan también datos contradictorios. Varios grupos de investigación han sugerido que el bloqueo de B7-1 promueve la diferenciación de la respuesta inmune hacia Th2 en la encefalomiелitis autoinmune experimental (Nicholson y Kuchroo, 1996) disminuyendo la intensidad de la enfermedad, también se ha propuesto que el bloqueo de esta molécula inhibe significativamente la proliferación de las células Th en general (Agrewala et al, 1998). Por el contrario, en el modelo murino experimental de diabetes autoinmune, el bloqueo de B7-2 induce la protección que es mediada por una respuesta tipo Th2, mientras que el bloqueo de la interacción de B7-1 con su ligando aumenta la intensidad de la enfermedad que es mediada por una respuesta tipo Th1 (Lenschow et al, 1996). En enfermedades alérgicas el bloqueo de B7-2 con un anticuerpo monoclonal inhibe el desarrollo de una respuesta tipo Th2 (Keane-Myers et al, 1998). Por otro lado en ratones infectados por nemátodos el bloqueo de B7-1 o B7-2 no modifica el desarrollo de la respuesta inmune (Greenwald et al, 1997).

Se ha sugerido que la sobre expresión de B7-2 precede a la expresión de B7-1 en linfocitos B y células dendríticas *in vitro*, en realidad no hay muchos trabajos que se hayan abocado a estudiar la expresión de estas moléculas de membrana en CPA profesionales durante el desarrollo de una respuesta inmune *in vivo* (Gause et al, 1998).

El desempeño de estas moléculas coestimuladoras en la polarización de la respuesta inmune ha sido estudiado en sistemas que presentan ambos tipos de respuestas (Th1/Th2) a lo largo de la enfermedad y no se ha enfatizado en los cambios de distintos factores que podrían influir en la polarización de la respuesta y que también podrían influenciar la sobreexpresión de alguna de estas moléculas. Como sabemos, en el modelo murino de cisticercosis se desarrollan respuestas altamente polarizadas (Terrazas et al, 1998), este fenómeno favorece el estudio de las moléculas B7-1 y B7-2 durante el desarrollo de la respuesta inmune; esto resulta de gran importancia, ya que hasta la fecha no hay investigaciones que hayan examinado la cinética de expresión de B7-1 y B7-2 durante la transición de un tipo de respuesta a otra *in vivo*. Los trabajos que existen sobre alteraciones de la expresión de estas moléculas en algunas enfermedades infecciosas han sido realizados *in vitro* y su efecto sobre la respuesta inmune no ha sido estudiado (Frosch et al, 1997; Vecchiarelli et al, 1998).

FALTA PAGINA

No.

33

MODELO EXPERIMENTAL

Taenia crassiceps

La cisticercosis es una enfermedad causada por el estadio larval de los céstodos de la familia Taeniidae que afecta a muchos mamíferos, que actúan como hospederos intermediarios, incluyendo al hombre. Los hospederos intermediarios adquieren las larvas (cisticercos) por la ingesta de huevos infecciosos procedentes del céstodo adulto (Villa y Kuhn, 1996)

La cisticercosis por *Taenia solium* representa un problema socioeconómico y de salud pública importante en Latinoamérica, Asia y Africa (Mahajan, 1982). En México, al igual que en otros países en vías de desarrollo, las condiciones que favorecen su desarrollo están presentes de manera permanente; mas del 40% de la carne de puerco que se consume en nuestro país proviene de sitios donde las condiciones de higiene son muy pobres, las inspecciones inadecuadas y donde las costumbres insalubres prevalecen (Mazón-Rubio, 1991; Valdez et al, 1994) El ciclo de vida de este parásito incluye una etapa larval que puede desarrollarse tanto en el cerdo como en el hombre y el ciclo se completa cuando el hombre ingiere carne de puerco infectada. Por lo tanto, la cisticercosis porcina, es indispensable para mantener el ciclo de vida. Esto, ofrece la posibilidad de interferir con este ciclo modificando la prevalencia de la cisticercosis porcina por medio de la vacunación (Valdez et al, 1994).

En las investigaciones enfocadas a reconocer los mecanismos inmunes de la cisticercosis se usa como modelo de investigación, la cisticercosis experimental murina por *Taenia*

crassiceps. El valor de este sistema se observa en la reactividad antigénica cruzada entre ambos céstodos (Ramos-Kuri et al, 1992), en el hecho de que los dos ciclos de vida son muy similares y la alta tasa de crecimiento de este parásito en la cavidad peritoneal de los ratones (Larralde et al., 1988, 1989).

Este modelo ha sido utilizado en el laboratorio ya que en el se puede estudiar la participación de factores inmunológicos, genéticos y sexuales asociados a la resistencia y susceptibilidad. Este modelo ha sido muy útil para el estudio de importantes factores biológicos asociados al desarrollo de la infección por *T. crassiceps*, tales como la expresión del MHC (Fragoso et al, 1998) o el microambiente hormonal existente durante la infección (Terrazas et al, 1994; Larralde et al. 1995)

En este caso el modelo experimental murino de cisticercosis por *T. crassiceps* fue utilizado no solo por su facilidad de manejo y alta similitud con la infección por cisticercos de *T. solium*, sino también por el hecho de que esta infección presenta durante sus etapas tempranas una respuesta inmune transitoria del tipo Th1 (caracterizada por altos niveles de IL-2, IFN- γ y anticuerpos del tipo IgG2a) asociada a una baja tasa de reproducción del parásito. Conforme la infección avanza, esta respuesta se va convirtiendo en una respuesta tipo Th2 mas permanente y energética (caracterizada por altos niveles de IL-4, IL-6, IL-10, y anticuerpos IgG2b e IgG1) que se asocia con una inmunosupresión generalizada y un incremento en la tasa de reproducción del parásito (Terrazas et al, 1998) El ciclo de vida de *T. crassiceps* de muestra en la figura 3

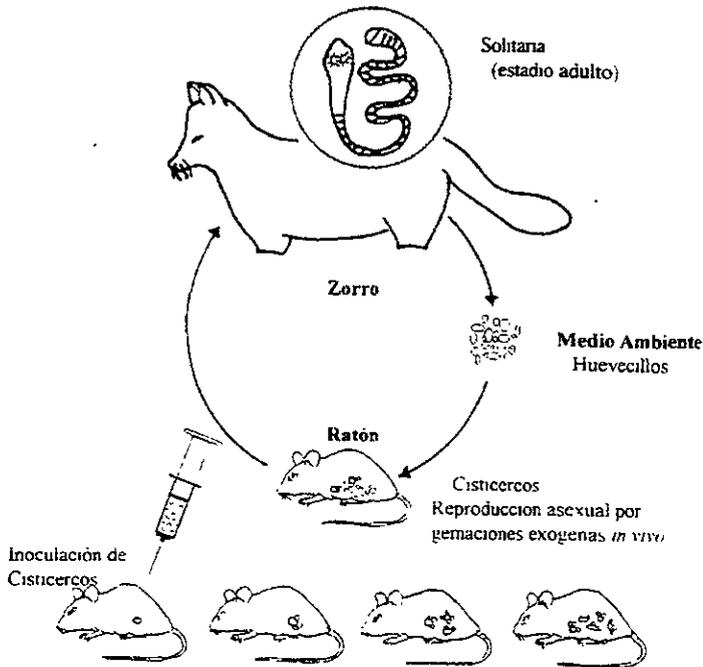


Fig 3 Se muestra el ciclo de vida natural de *T. crassiceps* así como la forma de generar la infección experimental en el laboratorio. El parásito es un Platyhelmintho cuyo estadio adulto se da en el intestino de la zorra roja europea y norteamericana. Los huevecillos son producidos en el intestino y liberados al medio en las heces fecales, los roedores adquieren la infección por medio de la ingesta. En ellos se desarrolla la etapa larval (*Cysticercus longicollis*) o cisticercos que se reproduce asexualmente por gemación. El ciclo se cierra cuando el ratón es consumido nuevamente por una zorra (Brusca y Brusca, 1990, Toledo, 1997). Este parásito puede ser utilizado con fines experimentales ya que puede mantenerse fácilmente en diferentes cepas de ratones por pases intraperitoneales (i.p.) usando cisticercos de tamaño menor a 2mm, sin gemas, provenientes de ratones con menos de 3 meses de infección.

JUST

Se ha comprobado tanto *in vitro* como *in vivo* que el ambiente de citocinas tipo Th1 o Th2 favorece la polarización de las células virgenes hacia alguno de los dos subtipos. Es importante considerar que las citocinas que inducen a las células diferenciadas y total o parcialmente activadas, favorecen la producción diferencial de estas citocinas. Actualmente se sabe que algunos factores como PGE2, que son producidos por las CPA, son importantes para la polarización de las células Th0 hacia Th1 o Th2, sin embargo, los mecanismos son prácticamente desconocidos.

Si consideramos que algunos de los factores que favorecen la polarización de la respuesta son derivados de las células presentadoras de antígeno, específicas de la polarización de inicio y mantenimiento de la expresión de las características de las respuestas tipo Th1 o Th2.

Existen antecedentes que apoyan la hipótesis de que la polarización de la membrana de los macrófagos sufre modificaciones dependiendo del estado de activación de las células. Estas modificaciones podrían ser uno de los factores que favorecen la inducción de la polarización de la respuesta (Keane-Myers et al, 1998).

Por lo anterior, resulta interesante estudiar la participación de los macrófagos en los mecanismos de regulación e inducción de la polarización de la respuesta inmune en una infección parasitaria.

Debido a que el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* presenta una respuesta altamente polarizada que en un principio se caracteriza por ser del tipo Th1 y conforme la infección se hace crónica se convierte en una respuesta tipo Th2, resulta atractivo el estudio de las modificaciones tanto de las moléculas de membrana como de otros productos generados por macrófagos en el desarrollo de la estimulación antigénica y la polarización de las células T CD4⁺ hacia Th1 y Th2.

OBJETIVOS

General

- Determinar y analizar la importancia de los cambios en el estado de activación de los macrófagos, en la polarización de la respuesta inmune de Th1 a Th2 en una infección por cisticercos de *T. crassiceps*

Particulares

- Determinar la producción de factores solubles (IL-6, IL-12, PGE2 y NO), secretados por macrófagos peritoneales obtenidos en diferentes tiempos de infección y relacionarlos con la carga parasitaria
- Analizar la expresión de moléculas coestimuladoras de membrana (B7-1 y B7-2) en macrófagos a diferentes tiempos de infección
- Determinar la capacidad general de los macrófagos con diferentes estados de activación para estimular la activación de los linfocitos T CD4⁺.

HIPOTESIS

Debido a que la activación de los linfocitos Th0 es resultado directo de la interacción de estos con células presentadoras de antígeno (CPA), las modificaciones que las CPA puedan sufrir como resultado de una infección crónica (hiperestimulación) podrían jugar un papel importante en los mecanismos de polarización que determinan el tipo de respuesta inmune que ha de desarrollarse durante una infección crónica.

METODOLOGIA

Animales. Se utilizaron ratones BALB/c hembras (susceptibles a *T. crassiceps*) de 6-8 semanas de edad.

Parásitos. Se utilizó el modelo experimental murino de *Taenia crassiceps*, cepa ORF (crecimiento rápido), los cuales han sido mantenidos por pases sucesivos en ratones BALB/c por inyecciones intraperitoneales

Infección por *T. crassiceps*. Los ratones fueron inoculados con 15 cisticercos de *T. crassiceps* por vía intraperitoneal (i.p.) con jeringa de 1ml para insulina y usando como vehículo 0.3-0.4 ml de PBS. Colateralmente a los grupos de ratones infectados, como controles se usaron ratones sanos de la misma edad y mantenidos en las mismas condiciones del bioterio.

Obtención de macrófagos peritoneales. Los macrófagos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones sanos y con 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección por el cisticercos de *T. crassiceps*. Brevemente, a los animales sanos se les inocularon i.p. 3 ml de medio de tioglicolato al 3%, estéril, para inducir la migración de macrófagos hacia la cavidad peritoneal, 4 días más tarde fueron sacrificados por dislocación cervical. Se les inyectaron 1 p.5 ml de solución de Hank's (Vitro) estéril fría, se procedió a la extracción de las células con una jeringa en condiciones de esterilidad. Estas células se lavaron dos veces con solución de Hank's y se lisaron los eritrocitos con un choque osmótico inducido con NH_4Cl estéril. Las células se contaron y se ajustaron a 1×10^6 cels./ml, posteriormente se sembró 1

ml de esta suspensión celular en placas de 24 pozos (para medir citocinas) (Costar) y de 96 pozos (para medir proliferación) (Costar), se incubaron 2 horas a 37°C y 5% de CO₂, transcurridas, se lavaron los cultivos con medio RPMI-1640 (Vitro) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 µg/ml de estreptomicina, 1% de aminoácidos esenciales, 25 mM de buffer Hepes y 0.5% de glutamina (Todo Gibco-BRL) para eliminar las células no adherentes. Se comprobó que las células adherentes se constituían en un 90% por macrófagos de acuerdo con la tinción de esterasa específica.

Los macrófagos de los animales infectados se obtuvieron de la forma anteriormente descrita, solo que para estos no se utilizó el medio de tioglicolato debido a que la misma presencia de cisticercos induce la migración de los macrófagos.

Detección de moléculas de membrana en macrófagos.

- Detección de B7-1 y B7-2 por FACS. Se analizó por citometría de flujo la presencia de las moléculas coestimuladoras de membrana B7-1 y B7-2 en los macrófagos peritoneales de los animales sanos así como de los ratones con 2, 4, 6, y 8 semanas de infección. Estos macrófagos se obtuvieron y ajustaron como se mencionó antes, se sembraron en placas de 24 pozos (Costar) se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO₂, posteriormente fueron retirados con un gendarme de plástico y se procesaron para su análisis por FACS. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti B7-1 y anti B7-2 IgG de rata anti-ratón (Pharmlngen) de acuerdo a las especificaciones de los productores. Como segundo anticuerpo se utilizó anti-IgG de rata marcado con FITC (Sigma), este último sirvió como control de pegado inespecífico, en la ausencia del primer anticuerpo

Obtención de linfocitos de bazo. Se utilizaron ratones sanos (sin infección) los cuales fueron inmunizados i.p. con 100 µg/ml de KLH 3 veces en 3 semanas (las primeras dos inmunizaciones se hicieron con adyuvante de Freund -Gibco BRL- 1:2 para potenciar el efecto, la tercera se hizo con PBS como vehículo) antes de ser sacrificados por dislocación cervical. En condiciones de esterilidad se obtuvo el bazo de los animales. Las células se obtuvieron por perfusión, inyectando 5 ml de solución de Hank's fría a través del bazo, los eritrocitos se eliminaron por choque osmótico inducido por NH₄Cl durante 3 minutos. Las células se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI-1640 suplementado. Se determinó el número total y la viabilidad celular por exclusión del colorante vital azul tripano en cámara de Neubauer para posteriormente separar la fracción de células T CD4⁺.

Obtención de las células T CD4⁺. A partir de las células obtenidas de bazo se procedió a separar las células T CD4⁺ de la siguiente manera: Se determinó el número total de células en la cámara de Neubauer y se lavaron con buffer de separación (PBS-BSA 3% y 2mM de EDTA). Cada 1x10⁷ células se resuspendieron en 90 µl de buffer de separación frío y se agregaron 10 µl de anticuerpos anti-CD4⁺ unidos a microesferas magnéticas (MACS-CD4⁺) y se incubaron de 15 a 20 minutos a 4°C. Se lavaron nuevamente con 10 veces su volumen. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 µl de buffer de separación. Inmediatamente después se pasó la suspensión celular por una columna sobre un separador magnético (VarioMACS), en donde se pegaron las células positivas CD4⁺, se dejaron eluir las células negativas. Antes de que terminara de eluir, se agregaron 500 µl de buffer de separación frío. Se repitió la operación 2 veces. Se quitó la columna del campo magnético y se colectaron las células en un tubo estéril agregando 500 µl de buffer de separación. Se

centrifugaron las células a 2500 rpm y se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI-1640. Finalmente se ajustaron a 1×10^6 cels/ml. Una alícuota se apartó para determinar la pureza de las $CD4^+$ por medio de un ensayo de inmunofluorescencia (FACS) con anticuerpo anti- $CD4^+$ marcado con FITC. Obteniéndose alrededor de 90% de células $CD4^+$.

Linfoproliferación *in vitro* de células T $CD4^+$. De la fracción obtenida de células $CD4^+$ se sembraron 100 μ l de cada muestra por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) previamente cubiertas con macrófagos provenientes de los diferentes grupos de ratones con diferentes tiempos de infección a los cuales se les estimuló 2 horas antes con 100 μ g/ml de KLH para que lo procesen y lo presenten, los cocultivos se incubaron a 37°C en 5% de CO_2 durante 5 días. Durante las últimas 18 horas de cultivo, las células fueron marcadas con 0.5 μ Ci de timidina tritada (3H -TDR) (New England Nuclear) en 10 μ l de medio RPMI-1640 suplementado. Posteriormente, las células se cosecharon en papel de fibra de vidrio (Wallac) y se procesaron para determinar la incorporación de radioactividad en las células estimuladas y basales. La capacidad de proliferación fue cuantificada por medio de la siguiente fórmula.

CPM de células estimuladas - CPM de células basales.

Detección y evaluación de citocinas. La producción de IL-6 e IL-12 se evaluaron en los sobrenadantes de los cultivos por medio de la técnica de ELISA-sandwich, utilizando placas de 96 pozos (EIA/RIA High Binding, Costar) sensibilizadas con 100 μ l de anticuerpo de captura (purified anti-mouse IL-6, IL-12 -Pharmingen-) diluido en buffer de bicarbonato pH 8.2 en una concentración de 2 μ g/ml. Se incubaron toda la noche a 4°C

Tras la incubación se lavaron dos veces con PBS-Tween 0.05% (PBS-T). Posteriormente se bloqueó con PBS-BSA 3% (100 μ l por pozo) y se incubó dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron dos veces con PBS-T y se puso la curva de interleucinas con citocinas recombinantes murinas (recombinant IL-6, IL-12 –Pharmingen-) comenzando con una concentración de 4000 pg/ml y diluyendo ocho veces (1.2). Se incubó toda la noche a 4°C. Tras la incubación se lavaron cuatro veces con PBS-T y se agregó el segundo anticuerpo biotinilado (biotin IL-6, IL-12 –Pharmingen-) diluido en PBS-BSA a una concentración de 1 μ g/ml y se agregaron 100 μ l por pozo. Se incubó a 37°C durante 1 hora tras la cuál se lavó seis veces con PBS-T. Se agregaron 100 μ l por pozo de estreptoavidina/peroxidasa diluida 1:4000 en PBS-BSA. Se incubó a 37°C por 30 minutos y se lavó ocho veces con PBS-T. Se reveló con sustrato ABTS (100 μ l por pozo) durante 30 minutos. Las placas fueron leídas a 405 nm en un lector de ELISA (Metertech S 960).

Inducción de factores solubles de macrófagos. Además de utilizar a los macrófagos como células presentadoras de antígeno y productoras de citocinas se analizaron también para ver si su perfil de activación presentaba alteraciones en los diferentes tiempos de infección, midiendo para ello la producción de diferentes factores como: Prostaglandina E2 (PGE2) y NO₂ como un indicador de la producción de óxido nítrico. Los macrófagos fueron tratados y sembrados como se describió anteriormente. Luego, fueron estimulados con 10 μ g/ml de lipopolisacárido (LPS) (Sigma) y 24 horas después se cosecharon los sobrenadantes para medir los niveles de los factores antes mencionados

Detección de óxido nítrico (NO₂) por reactivo de Greiss. La detección de óxido nítrico se realizó en todos los sobrenadantes de los macrófagos. El ensayo consistió en preparar dos soluciones por separado, solución A y solución B (Sol. A. 0.1% dihidrocloruro de naftildietilenediamina en agua destilada y Sol. B 5% de sulfanilamida en H₃PO₄ al 5%). Poco antes de realizar el ensayo, se mezclaron la solución A y B en igual volumen, para así obtener el reactivo de Greiss. En una placa de 96 pozos (Costar) se puso una curva de NaNO₂ como control y referencia para extrapolar concentraciones, se agregaron 100 µl en cada pozo por duplicado de cada una de las concentraciones (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.315, 0.0155 mM), para las muestras también se pusieron 100 µl del sobrenadante. Se agregaron a todos los pozos 70 µl del reactivo de Greiss. Se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. La reacción colorimétrica se detectó a 550 nm en un espectrofotómetro (Technika) (Migliorini et al, 1991)

Detección de PGE₂. En los mismos sobrenadantes del cultivo de los macrófagos se determinaron los niveles de PGE₂ por medio de un ensayo inmunoenzimático (Kit de Cayman Chemical) siguiendo las especificaciones de los productores.

Análisis estadístico. Las comparaciones entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante la U de Mann-Whitney. Se consideraron significativas las comparaciones cuyos valores de P fueran < 0.05.

RESULTADOS

Cinética del crecimiento parasitario. Con el fin de demostrar la cronicidad de la infección causada por *T. crassiceps* y tratar de establecer una relación entre la actividad de los macrófagos y la intensidad de la parasitemia, se contó el número de cisticercos alojados en la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones sacrificados, a diferentes tiempos ; a las 2, 4, 6, 8 y 12 semanas después de la infección. Dicho conteo fue realizado post-mortem por medio de un lavado peritoneal (Figura 4)

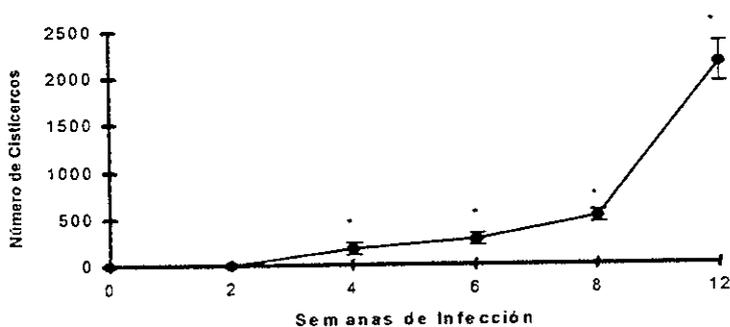


Figura 4. Cinética de la parasitemia por *T. crassiceps* en ratones de diferentes tiempos de infección (0, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas) Los datos que se ilustran representan el promedio \pm ES de al menos 9 ratones por grupo en cada punto de la cinética. * $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente

Los resultados de la cinética muestran un periodo de bajo crecimiento parasitario que abarca las primeras 2 semanas, sin embargo a partir de la cuarta semana se observa un ligero aumento en el crecimiento parasitario. En este tiempo el organismo presenta una cierta resistencia al parásito (menor número de cisticercos) Sin embargo la carga parasitaria continúa incrementándose hacia niveles estadísticamente significativos

(semanas 6 y 8 $p < 0.05$), de manera que el crecimiento parasitario a las 8 semanas se encuentra en niveles por encima de 500 cisticercos por ratón. Sin embargo, el crecimiento parasitario aumenta de manera considerable a partir de la octava semana ($p < 0.05$) llegando a niveles mayores de 2000 cisticercos después de 12 semanas de infección ($p < 0.05$), es en este tiempo en el que se observa una clara susceptibilidad de los ratones al parásito ya que muestran un incremento drástico no solo en el número de parásitos alojados en la cavidad peritoneal sino también en la tasa de crecimiento de estos. A partir de estos resultados se sugiere que los macrófagos obtenidos de cada uno de los diferentes tiempos de la infección podrían presentar un fenotipo y una funcionalidad diferente.

Expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. Se analizó la expresión de moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2 en la membrana de macrófagos extraídos de ratones no infectados y con diferentes tiempos de infección (2, 4, 6, 8 y 12 semanas) con el fin de determinar el efecto de la infección crónica por el cisticercos de *T. crassiceps* en la expresión de dichas moléculas. Para esto se obtuvieron células de la cavidad peritoneal de ratones con diferentes tiempos de infección. Se incubaron durante 2 horas para posteriormente obtener solo las células adheridas ($M\phi$) que tras un período de 24 horas de incubación sin estímulo *in vitro* fueron despegadas de la placa y marcadas con anticuerpos específicos para su análisis por citometría de flujo (FACS-Scan).

Los resultados de este análisis se presentan en la figura 5

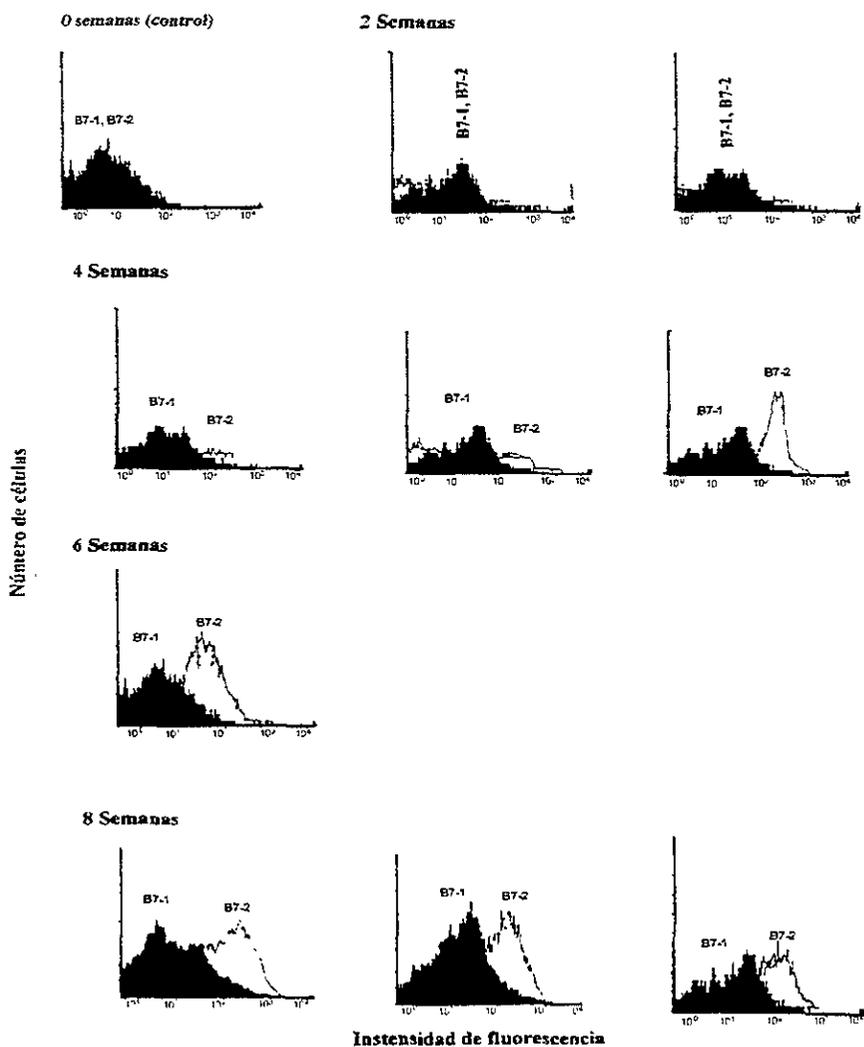


Figura 5. Expresión de las moléculas coestimuladoras B7-1 v B7-2 en Mφ peritoneales sin estimular obtenidos de ratones sanos y con 2, 4, 6 y 8 semanas de infección con el cisticerco de *T. crassiceps*. Las mediciones se hicieron por medio de un análisis de citometría de flujo (FACS-Scan). Cada histograma representa 1 individuo.

La figura 5 muestra los histogramas para las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, la molécula coestimuladora B7-1 no presentó cambios significativos en su expresión a lo largo de la parasitemia ya que su expresión en la membrana de los macrófagos se mantuvo constante en todos los tiempos de infección. Por otro lado, la molécula coestimuladora B7-2 mantiene sus niveles de expresión basales en la infección temprana hasta la cuarta semana de infección, sin embargo a partir de la semana 6 B7-2 presentó cambios importantes, no solo con respecto a las infecciones tempranas sino también con respecto a la expresión de B7-1, los cambios se registraron de manera clara en macrófagos extraídos de ratones con 6 semanas de infección en los que B7-2 mostró una sobreexpresión en la membrana de esas células. Esta sobreexpresión de B7-2 se observó mas claramente en las infecciones mas avanzadas. En macrófagos provenientes de ratones con 8 y 12 semanas de infección se observó un claro incremento en la intensidad de fluorescencia (desplazamiento del histograma hacia la derecha. La curva indica una expresión mucho mayor que la observada en ratones sanos y ratones con infecciones tempranas (2 y 4 semanas). Este desplazamiento es bastante grande tomando en cuenta que la escala es una escala logarítmica y por lo tanto cada grado del eje de las abscisas es exponencialmente mayor que el anterior. El incremento en la expresión de B7-2 fue de 4 a 7 veces mayor en los macrófagos de infecciones avanzadas, que aquellos obtenidos de los animales sanos o de poco tiempo de infección.

Producción *in vitro* de citocinas (IL-6 e IL-12) por macrófagos peritoneales. Para establecer el patrón de citocinas producidas por los macrófagos peritoneales obtenidos de

ratones sanos y con diferentes tiempos de infección y relacionarlas con el estado de activación de los macrófagos, se realizaron cultivos celulares de macrófagos obtenidos de ratones sanos y con 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección. En todos los casos fueron estimulados con LPS y se obtuvieron los sobrenadantes a las 48 horas a los cuales se les determinó la concentración de cada una de estas citocinas por medio de la técnica de ELISA-Sandwich.

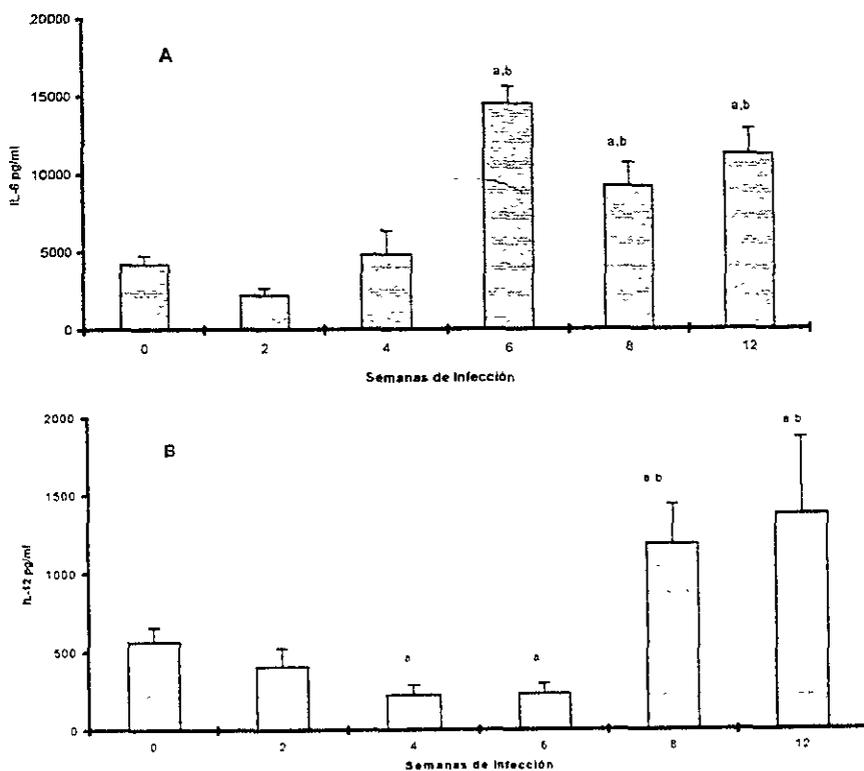


Figura 6. Producción *in vitro* de IL-6 (A) e IL-12 (B) en macrófagos estimulados con LPS provenientes de ratones BALB/c sanos y con diferentes tiempos de infección (2, 4, 6, 8 y 12 semanas). Las barras representan el promedio y el ES de al menos 9 animales por grupo. a = $p < 0.05$ con respecto a los macrófagos provenientes de ratones sanos (0), b = $p < 0.05$ con respecto al resto de los grupos.

FALTA PAGINA

No.

52

De acuerdo a los resultados obtenidos en la figura 6A, se observó que la producción de IL-6 en respuesta a LPS fue alta incluso en macrófagos provenientes de animales sanos (control), donde se observaron concentraciones de hasta 5000 pg/ml. este mismo nivel de respuesta se observó durante los tiempos cortos de infección (2 y 4 semanas), sin embargo esta producción se incrementó de manera significativa a partir de la sexta semana de infección y este incremento se mantuvo hasta las infecciones crónicas (8 y 12 semanas) siendo la diferencia de estas estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con respecto al control y a las etapas tempranas de la infección.

En el caso de la IL-12 se observó que, al igual que la IL-6, hay una producción diferencial de dicha citocina. En la figura 6B se observan niveles basales bajos en macrófagos procedentes de ratones sin infección, que se mantienen similares cuando la infección lleva 2 semanas, sin embargo observamos un claro decremento en la producción de esta citocina hacia las 4 y 6 semanas de infección, llegando a niveles por debajo de los animales sanos ($p < 0.05$), posteriormente se observó un aumento muy significativo en los niveles de IL-12 a partir de la semana 8 que se mantiene incluso hasta la semana 12 ($p < 0.05$ con respecto al control, a las 2 y a las 4 semanas de infección)

Cabe destacar que, temporalmente, ambas citocinas se comportan de manera similar, donde las etapas tempranas de la infección, los macrófagos, presentan niveles basales, característicamente bajos, de producción en respuesta a un estímulo, sin embargo es importante destacar que los niveles de IL-12 disminuyen significativamente en macrófagos de ratones con 4 y 6 semanas de infección. Por el contrario la IL-6 muestra

niveles basales similares a los observados en etapas tempranas de la infección, los cuales se incrementan hasta las infecciones de 6 semanas.

Producción *in vitro* de Oxido Nítrico por macrófagos peritoneales. El NO es un importante microbicida secretado rápidamente por macrófagos y algunas otras células tras un estímulo antigénico en presencia de IFN- γ . Para evaluar el efecto de una infección crónica sobre la capacidad de los macrófagos para responder inespecíficamente se midió la producción *in vitro* de NO por macrófagos peritoneales obtenidos de ratones no infectados y con 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección, estimulados con LPS. Dicha determinación fue realizada por el método de Greiss. Los resultados se muestran en la figura 7

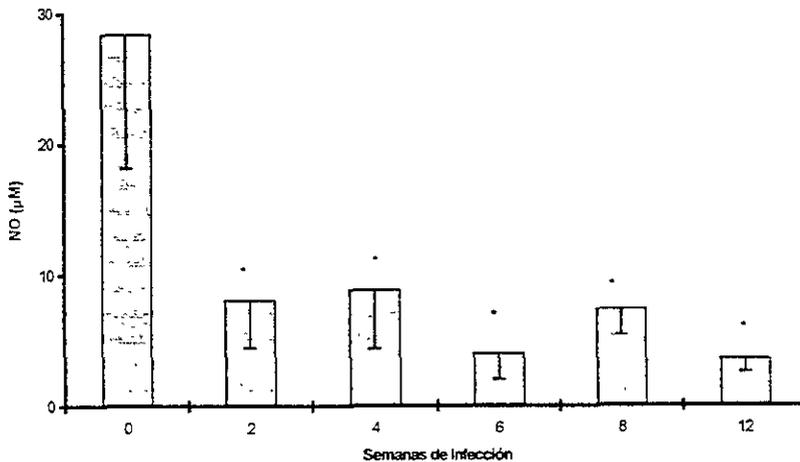


Figura 7 Producción *in vitro* de NO por macrófagos peritoneales extraídos de ratones no infectados (0) y con 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección en respuesta a LPS. La concentración se midió en relación directa con la concentración de nitratos en sobrenadantes por medio de reactivo de Greiss. Las barras muestran el promedio y el ES de al menos 9 animales por grupo. * $p < 0.05$ con respecto a ratones sin infección (0)

Los resultados obtenidos para la producción *in vitro* de NO muestran una producción basal de aproximadamente 30 μM en ratones no infectados, esta producción disminuye rápida y significativamente con respecto al los ratones no infectados ($p < 0.05$) a partir de las 2 semanas de infección donde ya se observa un decremento de hasta tres veces del valor de los animales sanos. Esta disminución en la producción de NO se mantiene a partir de ese momento y durante todo el curso de la infección, mostrando valores significativamente bajos, con respecto a los ratones sanos ($p < 0.05$), en la concentración de dicha molécula para los macrófagos obtenidos de ratones con 4, 6 y 8 semanas de infección. Como podemos ver los resultados alcanzan los niveles mas bajos en la producción de NO en la semana 12 ($p < 0.05$), justamente cuando se alcanza el nivel mas alto de crecimiento parasitario.

Producción de Prostaglandina E2. Para determinar si realmente existe una inhibición de la actividad macrofágica inducida por la infección crónica del cisticerco de *T. crassiceps* se midió la producción de prostaglandina E2, que es un producto característico de procesos celulares inhibitorios y que además ha sido postulada como un factor importante para la inhibición de la respuesta tipo Th1 favoreciendo la diferenciación hacia una respuesta tipo Th2. Esto se hizo en los sobrenadantes obtenidos de cultivos de macrófagos estimulados con LPS provenientes de ratones sanos y con 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección. La detección de PGE-2 se realizó por medio de un ensayo inmunoenzimático. Los resultados se muestran en la figura 8.

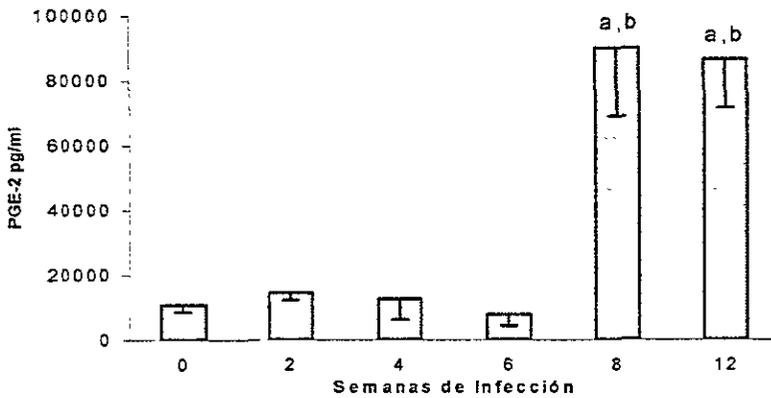


Figura 8 Producción *in vitro* de Prostaglandina E2 por macrófagos estimulados con LPS extraídos de ratones sanos y con 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección. La concentración de PGE2 en sobrenadantes de cultivo se midió por medio de un ensayo inmunoenzimático (Kit de Cayman Chemical). Las barras representan el promedio y ES de al menos 3 animales por grupo. a = $p < 0.05$ con respecto al control. b = $p < 0.05$ con respecto al resto de los grupos.

Los resultados de la producción de PGE2 fueron bastante claros, se detectaron niveles bajos en macrófagos extraídos de ratones sanos (menos de 20000 pg/ml), esta producción se mantuvo constante en los cultivos de macrófagos provenientes de ratones en tiempos cortos de la infección (2, 4 y 6 semanas), en cambio las infecciones más avanzadas (8 y 12 semanas) mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) con respecto tanto a los ratones sin infección como a ratones de 2, 4 y 6 semanas de infección.

Linfoproliferación *in vitro*. Con la finalidad de evaluar el efecto del cambio diferencial en el estado de activación de los macrófagos, inducido por la infección crónica con el cisticercos de *T. crassiceps*, sobre el estado general de la respuesta inmune, se analizó la capacidad de los macrófagos obtenidos en los diferentes tiempos de infección para activar

a linfocitos T CD4⁺ “vírgenes”, se realizó un ensayo de linfoproliferación *in vitro* que consistió en realizar cocultivos de macrófagos peritoneales obtenidos de ratones en diferentes tiempos de infección (0, 2, 4, 6 y 12 semanas) y linfocitos T CD4⁺ provenientes de ratones sanos previamente inmunizados con KLH. Los macrófagos fueron sembrados y estimulados con KLH, como antígeno, con el fin de que fuera este presentado a las células Th, promoviendo su activación. La proliferación fue medida 5 días después como resultado de la incorporación de [³H]-TdR, la cual fue agregada a los cocultivos tras 4 días de incubación. Los resultados obtenidos se observan en la figura 9.

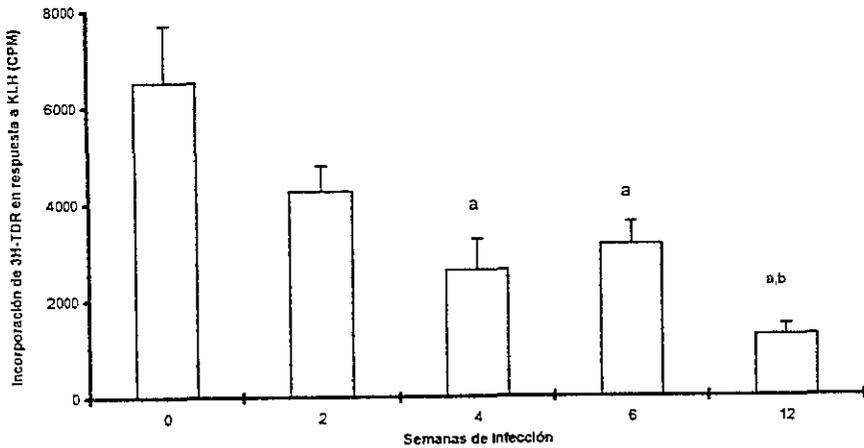


Figura 9. La respuesta proliferativa de linfocitos T CD4⁺ estimulados con KLH presentado *in vitro* por macrófagos peritoneales extraídos de ratones sanos y en diferentes tiempos de infección (2, 4, 6 y 12 semanas). La tasa de proliferación se evaluó por incorporación de [³H] TdR. Las barras representan el promedio y el ES de al menos 9 animales por grupo. a = p < 0.05 con respecto a los macrófagos provenientes de ratones sanos o control (0), b = p < 0.05 con respecto al resto de los grupos.

La figura 9 muestra que la linfoproliferación fue negativamente afectada por la cronicidad de la infección, esta disminución se observó claramente a partir de las infecciones de 4 semanas que mostraron un decremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) con respecto al grupo control (0 semanas), esta disminución en la capacidad de proliferación de los linfocitos T CD4⁺ es de más del 50% (menos de 3000 cpm), este mismo patrón de comportamiento se mantuvo en la sexta semana de infección, correlacionando ambos resultados con una etapa de lento pero constante incremento en el número de parásitos como se observa en la figura 1. Este decremento en la linfoproliferación alcanzó sus niveles más bajos en la infección más avanzada (12 semanas) que muestra niveles de incorporación por debajo de las 1500 cpm (75% menos que los animales sanos), siendo este resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$) no solo con respecto al control sino también con respecto a los tiempos de infección cortos. Es importante señalar este fenómeno ya que correlaciona de manera importante con la carga parasitaria de los ratones de este mismo tiempo de infección, pues es justamente en este tiempo en el que la carga parasitaria se dispara drásticamente como puede observarse en la figura 4. Puede observarse que existe una relación inversa entre los datos obtenidos para la carga parasitaria (figura 4) y los arrojados por la linfoproliferación (figura 9), donde a medida que se incrementa el número de parásitos, la capacidad de los macrófagos de inducir una activación en las células Th disminuye en una razón muy similar.

DISCUSION

Existen diversos factores que pueden alterar una respuesta inmune polarizandola hacia Th1 o Th2 , modificando así el curso de una infección. Estos factores son múltiples y algunos desconocidos, sin embargo existen algunos que estan bien descritos, estos son : naturaleza del antígeno (Wrath et al, 1989 ; DeMagistris et al, 1992 ; Kumar et al, 1995), dosis antigénica (Valderrama, 1999), vía de entrada del antígeno (Van den Eertweg et al, 1992), microambiente de citocinas (Afonso et al, 1994 ; Magram et al, 1996), células presentadoras de antígeno (Gajewsky et al, 1991 ; Rissoan et al, 1999) y moléculas coestimuladoras (June et al, 1994 : Lenschow et al, 1996). Esta serie de factores juegan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta inmune y por lo tanto en la susceptibilidad o resistencia a cualquier tipo de reto inmunológico.

Dos de estos factores, las células presentadoras de antígeno y las moléculas coestimuladoras se encuentran íntimamente ligados debido a que ambos se asocian al momento de inducir la activación del linfocito Th, a través de la presentación directa del antígeno en el MHC así como la secreción de citocinas y otros factores. Por otro lado, las moléculas coestimuladoras presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno son indispensables para el correcto procesamiento de la señal activadora en el linfocito Th.

Por lo anterior, este trabajo se enfocó a realizar un amplio análisis del efecto de una infección crónica causada por el cisticerco de *T. crassiceps* sobre la activación general de

los macrófagos peritoneales y la expresión de sus moléculas coestimuladoras. En la cisticercosis experimental murina causada por *T. crassiceps* se sabe que existe una respuesta inmune polarizada, la cuál va de Th1 en etapas tempranas hacia una tipo Th2 en etapas mas avanzadas de la infección (Terrazas, 1998). Por eso se buscó relacionar estos cambios inmunológicos, el tiempo de infección y la carga parasitaria con posibles alteraciones en el estado general de activación de los macrófagos.

Para realizar este análisis se tomaron en cuenta varios parámetros considerados importantes marcadores de la actividad de los macrófagos así como de su capacidad para inducir cambios en el desarrollo de una respuesta inmune. Estos parámetros fueron : La producción de las citocinas IL-12 e IL-6 inductoras de respuestas tipo Th1 y Th2 respectivamente (Romagnani, 1997), la expresión de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2, la producción de óxido nítrico como marcador de la actividad microbicida del macrófago, la producción de prostaglandina E2 como un factor característico de una señal inhibidora de la activación celular y la capacidad para inducir linfoproliferación como una señal de la habilidad de los macrófagos para activar a las células T CD4⁺.

A partir de los resultados obtenidos, se puede apreciar que efectivamente existen alteraciones muy importantes sobre el estado general de la activación de los macrófagos como resultado de la cronicidad de la infección con el cisticercos de *T. crassiceps*. Dichas alteraciones se dan a distintos niveles, desde los puramente morfológicos, en los cuales se destaca la mayor expansión de las células obtenidas de ratones de infecciones tardías (8 y 12 semanas) y una morfología menos expandida para los macrófagos provenientes de ratones sanos y con infecciones tempranas (2 y 4 semanas) (datos no mostrados). Esta

observación concuerda con observaciones anteriores donde se describen cambios morfológicos de los macrófagos cuando estos son cultivados en presencia o ausencia de IL-13, que ha sido previamente descrita como una citocina característica de una respuesta tipo Th2 (Doherty et al, 1993). Existen diferencias también a nivel funcional en la producción diferencial de citocinas, expresión de moléculas coestimuladoras de membrana, producción de factores microbicidas, producción de factores inhibidores de la actividad celular y finalmente como resultado de todo lo anterior, alteraciones en la capacidad para activar a linfocitos T CD4⁺.

La cinética de la parasitemia observada en la figura 4 muestra el aumento en el número de cisticercos registrados para cada uno de los tiempos de infección, estos datos muestran un aumento lento pero constante durante las primeras semanas de infección (2, 4 y 6) lo cual nos indica una etapa de “control de la enfermedad” dentro de ciertos límites, esto debido a la presencia de una respuesta tipo Th1 protectora que cambia posteriormente hacia una Th2 facilitadora (Terrazas et al, 1998) Por lo anterior, se podría inferir que los macrófagos obtenidos de estos tiempos de infección serán macrófagos provenientes de una respuesta inmune protectora y con capacidad de inducir una respuesta tipo Th1 o mixta. Por otro lado los ratones de infecciones crónicas (8 y 12 semanas) muestran niveles altos de crecimiento parasitario, en especial cabe destacar el importante aumento observado entre la octava y duodécima semanas. A partir de esto, cabría pensar que los macrófagos que sean extraídos de ratones con estas características provendrán de una respuesta inmune mas facilitadora del establecimiento parasitario y que por lo tanto tengan un perfil de activación acorde al que presentarían dentro de un microambiente tipo Th2.

Los efectos de la infección sobre la expresión de moléculas coestimuladoras B7-2 (Figura 5) en la membrana de los macrófagos son muy claros, se caracterizan por una sobreexpresión de estas moléculas en macrófagos extraídos de ratones con infecciones avanzadas (6, 8 y 12 semanas), esto indica una posible alteración en las funciones del macrófago como célula presentadora de antígeno, que podría también influir en el desarrollo general de una respuesta inmune, como resultado de la cronicidad de la infección, debido a que las moléculas coestimuladoras son importantes reguladores para la correcta presentación del antígeno de parte de la célula presentadora hacia las células T $CD4^+$, tienen un papel fundamental en esta interacción tanto para la activación de la célula T como también para la polarización de la misma hacia alguna de las dos subpoblaciones características (Th1 o Th2) Aunque faltan realizar algunos estudios para poder hacer una aseveración, puede especularse con base en estos resultados que las moléculas coestimuladoras B7 (en este caso B7-2) se regulan de manera diferencial, resultando en una señal importante, en particular para la activación y polarización de las subpoblaciones de linfocitos Th y en general para el desarrollo de la respuesta inmune. Esto ha sido postulado ya en diversos estudios en los que se analiza el papel de estas moléculas en la polarización y desarrollo de la respuesta inmune (Nicholson y Kuchroo, 1996 ; Lenschow et al, 1996), muchos de estos estudios establecen relaciones directas entre la sobreexpresión de alguna o ambas moléculas y la activación de alguna de las dos subpoblaciones de linfocitos Th (Keane-Myers et al, 1998) Sin embargo el modelo utilizado en este trabajo permite relacionar de manera mas precisa el momento en que se da el cambio en la expresión de estas moléculas con el "momento inmunológico" que presenta el organismo, esto debido a

los estudios previos realizados con respecto a los tiempos en que se desarrollan los dos tipos de respuesta (Th1 y Th2) en el modelo de la cisticercosis murina (Terrazas et al, 1998).

Con respecto a la producción de citocinas observada en la figura 6, existen también diferencias importantes aunque no tan claras como las observadas para la expresión de moléculas coestimuladoras. Existe un claro aumento en la producción tanto de IL-6 como de IL-12 conforme la infección se hace crónica. En cuanto a la producción de IL-6 (figura 6A) hay una clara diferencia entre los macrófagos extraídos del peritoneo de ratones con infecciones avanzadas (6, 8 y 12 semanas) y aquellos provenientes de ratones sanos y de infecciones tempranas (2 y 4 semanas). Esto concuerda con los reportes de la literatura (Thomson, 1992) donde se describe a la IL-6 como una citocina característica de una respuesta tipo Th2, que en el caso de la cisticercosis murina se presenta a partir de la cuarta semana con la respuesta mixta y continua hasta el término de la infección (Terrazas et al, 1998). Así, los macrófagos peritoneales de ratones con infecciones avanzadas, efectivamente producen niveles mas altos de IL-6 y por lo tanto podrían contribuir al desarrollo de un microambiente de citocinas tipo Th2, que, como se ha comprobado en diversos trabajos (Romagnani, 1997) influye de manera importante para el desarrollo de una respuesta tipo Th2. Es importante también destacar que esta contribución de los macrófagos al desarrollo de una respuesta tipo Th2 por medio de la alta producción de IL-6 correlaciona de manera importante con los datos mostrados en la figura 4 donde se observa que la carga parasitaria tiene su mayor incremento entre la octava y duodécima semanas, cuando según lo reportado en la literatura (Terrazas et al, 1998) ya existe una respuesta tipo

Th2 bien establecida. Por todo lo anterior es posible que la cronicidad de la infección con el cisticerco de *T. crassiceps* provoque un incremento en el patrón de IL-6 producida por los macrófagos que puede caracterizarlos no solo como una importante fuente de esta citocina sino también como inductores de una respuesta tipo Th2.

Los resultados mostrados en la figura 6B indican que, al igual que la IL-6, la IL-12 muestra cambios en su patrón de producción dependiendo del tiempo de infección del que provengan. En este caso los cambios se dan desde la cuarta semana donde hay una disminución significativa en la producción de IL-12, con respecto a los macrófagos normales y los de las primeras dos semanas de infección, la cual se mantiene hasta la semana 6, esto puede mostrar la existencia de un período corto de inhibición de dicha citocina justo en los tiempos que reporta la literatura como de repuesta mixta en el modelo murino de cisticercosis, es decir, al momento donde disminuye la respuesta tipo Th1 y se incrementan las concentraciones de citocinas tipo Th2 (Terrazas et al, 1998). Es importante destacar que la IL-12 es una citocina muy importante para el inicio de la respuesta tipo Th1 en etapas muy tempranas de una infección (Romagnani, 1997), los datos de la figura 3B muestran que los macrófagos provenientes de ratones sanos y de 2 semanas de infección, es decir cuando se inicia la respuesta tipo Th1, estimulados con LPS muestran concentraciones relativamente altas de IL-12 en comparación con las observadas para 4 y 6 semanas. Sin embargo, los macrófagos provenientes de ratones con infecciones de 8 y 12 semanas estimulados con LPS aumentan de manera considerable su producción de IL-12, no obstante en este tiempo la respuesta Th2 ya se encuentra bien establecida. La IL-12 podría ya no constituir un factor importante en la polarización de las subpoblaciones de

células Th debido a las mayores concentraciones de IL-6 y por lo tanto no hay necesidad para inhibir su producción. O bien podría indicar solo una hiperactivación de estas células ante el estímulo antigénico constante que implica la infección crónica. Sin embargo quedan aun por definirse los factores que promueven este comportamiento en una citocina, que al ser inductora de una respuesta Th1, no debería aumentar en macrófagos extraídos de ratones donde se ha caracterizado una respuesta tipo Th2.

El NO constituye un importante factor de ataque inespecífico en contra de patógenos que invaden el organismo, una de sus principales fuentes de producción se encuentra en los macrófagos que son las células que participan en las primeras interacciones patógeno-hospedero. Por su misma inespecificidad, el NO se caracteriza por ser un recurso poco confiable. Esto por su agresividad no solo contra elementos ajenos al organismo sino también contra elementos propios. Por esto, los resultados observados en la figura 7 muestran que la producción basal de NO observada en macrófagos extraídos de ratones sanos estimulados con LPS disminuye considerablemente incluso 2 semanas después del inicio de la infección y continúa en niveles bajos a lo largo de la misma como resultado, probablemente, de mecanismos de regulación negativa que actúan de manera rápida y eficiente y que, una vez establecida la infección, solo permiten secreciones limitadas de dicho factor para evitar daños importantes al propio hospedero. Sin embargo, esta disminución en la producción de NO podría afectar la susceptibilidad a patógenos intracelulares como se ha reportado recientemente (Rodríguez et al, 1999).

Estos mecanismos de inhibición del NO podrían ser múltiples, sin embargo el más conocido y estudiado es el ejercido por el L-NMMA que actúa directamente sobre la

enzima Oxido Nítrico Sintetasa inhibiendo su acción (Liew y Cox, 1991). A pesar de lo anterior no es posible establecer específicamente cual es el mecanismo que establece dicha inhibición en el caso de la infección con el cisticerco de *T. crassiceps*. Lo que si queda claro es que existe una disminución significativa en los niveles de producción del NO en macrófagos, esto como resultado directo de la cronicidad de la infección. Lo anterior implica la existencia de una regulación diferencial, no solo en los factores de señalización (moléculas coestimuladoras y citocinas), sino también en la capacidad microbicida de los macrófagos a lo largo de la infección. Los resultados en la producción de NO en macrófagos estimulados con LPS correlacionan además con la imposibilidad del organismo para montar y mantener una respuesta capaz, no solo de eliminar al parásito, sino de controlar el crecimiento parasitario como se puede observar en la figura 4.

La prostaglandina E-2 (PGE-2) se ha caracterizado, de manera general, como un importante inductor de señales de inhibición celular por su capacidad para inducir la producción intracelular de cAMP que constituye un importante regulador negativo de ciertos eventos celulares (Phipps et al. 1991). De manera mas específica, se ha demostrado que la PGE-2 es muy importante para el desarrollo de los eventos de regulación de la respuesta inmune, se sabe por ejemplo que esta molécula es capaz de inhibir la producción tanto de IL-2 como de IFN- γ (inductores de la respuesta tipo Th1), así como de estimular la producción de IgE, IgG1 e IL-5 (productos de una respuesta tipo Th2) (Phipps et al, 1991 , Kapsenberg et al, 1998). Por otro lado se ha demostrado que la PGE-2 es capaz de inhibir de manera importante la capacidad linfoproliferativa de las células T CD4⁺ (Terrazas et al, 1999). Los resultados obtenidos en este trabajo (Figura 8) muestran un aumento

significativo en la producción *in vitro* de PGE-2 en macrófagos estimulados con LPS provenientes de infecciones avanzadas (8 y 12 semanas). Esto indica que, como se había mencionado antes, existe una regulación diferencial en la producción de diversos factores como resultado de la infección crónica que podrían asociarse a los estados inmunológicos previamente reportados (Villa y Khun, 1996 ; Terrazas, 1999) En este caso, aun mas claro que los anteriores, los macrófagos de infecciones crónicas presentaron un incremento en la producción de PGE-2 probablemente con el fin de inducir tanto señales de inhibición a otras células como a ellos mismos, así como para inducir y mantener señales de activación para regular el desarrollo de la respuesta inmune. Lo anterior puede correlacionarse de manera importante no solo con la carga parasitaria observada en la figura 4 sino también con la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras B7-2 (Figura 5) y con el incremento claro en la producción de IL-6 (Figura 6A), este último relacionado con lo mencionado anteriormente sobre la capacidad de la PGE-2 para inducir y mantener una inhibición sobre la subpoblación de células Th1 y por lo tanto incrementar la actividad de la subpoblación de células Th2. La capacidad inhibitoria de la PGE-2 también puede ser correlacionada con los resultados obtenidos para linfoproliferación (Figura 9), donde los macrófagos provenientes de infecciones de 12 semanas, en los cuales al ser estimulados con LPS existe el mas alto nivel en la producción de PGE-2, muestran una marcada disminución en la capacidad de inducir la proliferación de células T CD4⁺. Estos datos pueden asociarse con trabajos anteriores, donde se ha reconocido a la PGE-2 como un inhibidor de la respuesta proliferativa. Además recientemente se ha demostrado la participación de la PGE-2 en la susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps* (Terrazas et al, 1999). Aquí se demuestra que

los macrófagos peritoneales son una importante fuente de este factor lo cual puede relacionarse con la inducción y mantenimiento de las respuestas Th1 o Th2 y la susceptibilidad al cisticerco.

Probablemente, como resultado de todo lo anterior, los macrófagos extraídos de ratones con diferentes tiempos de infección presentaron diferente capacidad para inducir la proliferación específica *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ obtenidos de ratones sanos inmunizados con KLH. Los resultados observados en la figura 9 muestran marcadas diferencias en la respuesta proliferativa de las células Th, a un estímulo antigénico presentado por macrófagos provenientes de diferentes tiempos de infección, es decir, los macrófagos provenientes de ratones con mayor tiempo de infección tienen una menor capacidad de inducir la proliferación de células T CD4⁺ que los macrófagos provenientes de ratones sanos o con tiempos de infección cortos. Estos resultados se tornan más impactantes si se toma en cuenta que la única variable de este experimento es el tiempo de infección del cual son obtenidos los macrófagos que funcionan como APC y no el de los linfocitos T CD4⁺. Esta disminución en la capacidad de inducir linfoproliferación sugiere la existencia de uno o varios cambios en el estado de activación de los macrófagos inducidos por el efecto crónico de la cisticercosis. Estos resultados también sugieren una correlación con el aumento observado en la carga parasitaria, debido a la posible existencia de una inmunosupresión local o a la secreción de factores del propio parásito que pudieran inducir cambios en el estado general de activación de los macrófagos, que a su vez facilita el establecimiento y crecimiento del parásito.

Finalmente, dentro del contexto de la polarización de la respuesta inmune, recientemente ha sido descrita la posible existencia de APC (principalmente células dendríticas) que específicamente inducen la polarización de la respuesta hacia Th1, llamadas DC1, mientras que otras inducen una respuesta tipo Th2, conocidas como DC2 (Rissoan et al, 1999), estas “diferentes” poblaciones de APC presentan diferentes patrones de citocinas y diferentes marcadores de membrana, sin embargo estos resultados han sido obtenidos únicamente *in vitro* por lo que el desarrollo específico de cada una es aún desconocido. Los resultados obtenidos en esta tesis apoyan la existencia de estas diferentes poblaciones de APC, pero contrario a que existen *per se*, nuestros datos indican que este tipo de células pueden ser inducibles (al menos en este modelo experimental) y claramente definidas. por ejemplo los macrófagos provenientes de animales sanos o de infecciones tempranas expresarán niveles normales de B7-1 y B7-2, producción normal de IL-12 y bajos niveles de IL-6 y PGE-2. a su vez inducirán una buena respuesta proliferativa en linfocitos T CD4⁺. En cambio aquellos macrófagos obtenidos de infecciones crónicas presentarán alta expresión de B7-2, altos niveles de IL-6 y PGE-2 asociados a una baja respuesta proliferativa en linfocitos T CD4⁺. Estas diferencias morfológicas, fenotípicas y funcionales de los macrófagos pueden asociarse con la respuesta inmune predominante al momento de extraerlos de hospederos infectados (Th1 en infecciones de corto tiempo ; Th2 en infecciones crónicas), indicando la posible existencia *in vivo* de APC inductoras de Th1 e inductoras de Th2, pero que pueden ser moduladas por la persistencia de un estímulo antigénico.

ESTA TESIS NO PUEDE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

La manera en que se lleva a cabo la polarización de la respuesta inmune ha sido un tema de intensa investigación en los últimos diez años, esto ha generado diversas opiniones acerca del o los mecanismos mas importantes para el desarrollo de dicho fenómeno. Este comportamiento de la respuesta inmune tiene profundas implicaciones en la salud de los individuos, pues una respuesta que no es regulada adecuadamente puede generar o facilitar el desarrollo de patologías. Por lo anterior, la importancia de este trabajo radica en la posibilidad de conocer de manera mas profunda el comportamiento de uno de los mecanismos capaces de regular la respuesta inmune durante el desarrollo de una infección *in vivo*. Este mecanismo, el estado de activación de las células presentadoras de antígeno, había sido estudiado anteriormente, sin embargo solo se habían analizado factores aislados del mismo, en el presente trabajo se buscó analizar de manera integral su conducta en el desarrollo de la respuesta inmune. Esto con el fin de evaluar su importancia y de ser posible utilizar el conocimiento obtenido para su aplicación en el desarrollo de métodos tanto profilácticos como de aplicación en enfermedades ya desarrolladas. El conocimiento adquirido a partir de este trabajo nos permitirá modular el desarrollo de la respuesta inmune por medio de la modificación de uno o varios parámetros propios de la activación de las células presentadoras de antígeno con el fin de polarizar la respuesta inmune hacia alguno de los dos tipos (Th1 o Th2) según sea el requerimiento de la patología.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente :

- El estado general de activación de los macrófagos se altera como resultado directo de la cronicidad de la infección en el modelo murino de cisticercosis, lo que sugiere una importante correlación entre estos y la regulación de la respuesta inmune
- La molécula coestimuladora B7-2 se sobreexpresa en la membrana de los macrófagos conforme la infección se torna crónica.
- La producción *in vitro* de citocinas (IL-12 e IL-6) por macrófagos estimulados con LPS se altera conforme avanza la infección.
- La actividad microbicida de los macrófagos caracterizada por la producción *in vitro* de NO disminuye desde etapas tempranas de la infección.
- La inhibición celular y la inducción de la respuesta inmune tipo Th2 mediadas por la producción PGE-2 se incrementa en macrófagos de infecciones crónicas.
- La capacidad de los macrófagos para inducir linfoproliferación disminuye conforme la cisticercosis se hace crónica

BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y J.S. Pober. 1997 **Cellular and Molecular Immunology**. Saunders. U.S.A. 494pp.
- Afonso, L.C., Scharon, T.M., Vieira, L.Q., Wysocka, M., Trinchieri, G. y P. Scott. 1994. **The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major***. *Science*. 263:235-37.
- Agrewala, J.N., Suvas, S., Verma, R.K. y G.C. Mishra. 1998. **Differential effect of anti-B7-1 and anti-M150 antibodies in restricting the delivery of costimulatory signals from B cells to macrophages**. *J. Immunol.* 1067-77
- Amiri, P., Locksley, R.M., Parslow, T.G., Sadick, M., Rector, E., Ritter, D., McKerrow, J.H. 1992. **TNF- α restores granulomas and induces parasite egg laying in schistosome infected SCID mice**. *Nature*. 356:604-7
- Bancroft, A.J., Else, K.J. y R.K. Grencis. 1994. **Low -level infection with *Trichuris muris* significantly affects the polarization of the CD4 response**. *Eur. J. Immunol.* 24:3113-18
- Bretscher, P.A., Wei, G., Menon, J.N. y O H. Bielefeldt. 1992. **Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major***. *Science*. 257:539-42.
- Brodsky, F.M. y L. Guargliardi. 1991. **The cell biology of antigen processing and presentation**. *Ann. Rev. Immunol.* 9:707-44.
- Celada, A. y C. Nathan. 1994 **Macrophage activation revisited**. *Immunol. Today*. 15:100-02
- Constaant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A, Pasqualini, T y K Bottomly 1995. **Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4⁺ T cells** *J Exp Med.* 182:1591-96
- Chaturvedi, P., Yu, Q, Southwood, S., Sette, A. y B. Singh. 1996 **Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells**. *Int Immunol* 8 745-55.
- Chen, Y, Inobe, J, Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V K. y H L. Weiner. 1995. **Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance**. *Nature*. 376.177-80.

- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobel, J., Hafler, D.A. y H.L. Weiner. 1994. **Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: supression of autoimmune encephalomyelitis.** *Science.* 265:1237-40.
- David, P. y M.D. Huston 1997. **The biology of the immune system.** *JAMA.* 278:22
- De-Magistris, M.T., Alexander, J., Coggeshall, M., Altman, A., Gaete, F.C., Grey, H.M. y A. Sette. 1992 **Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor.** *Cell.* 68:625-34.
- Dubey, C., Croft, M y S.L. Swain. 1996. **Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor vs. Costimulatory signals.** *Immunol.* 72:508-13
- Else, K.J. y R.K. Grencis. 1991. **Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential cytokine production during acute or chronic infection.** *Immunol.* 72:508-13
- Evavold, B.D. y P.M. Allen. 1991. **Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand** *Science.* 252:1308-10
- Fearon, D.T y R.M. Locksley. 1996. **The instructive role of innate immunity in the acquired immune response.** *Science.* 272:50-3
- Fraser, J.D. Irving, B.A., Crabtree, G R. y A. Weiss. 1991. *Science.* 251:313-16
- Frosch, S., Kuntzlin, D. y B Fleischer. 1997. **Infection with *Trypanosoma cruzi* selectively upregulates B7-2 molecules on macrophages and enhances their costimulatory activity.** *Inf. & Imm.* 65:971-77
- Gajewsky, F.T., Pinnas, M , Wong, T. y W.F. Fitch 1991. **Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen presenting cell populations.** *J Immunol.* 146:1750-58.
- Gause, W C , Mitro, V., Via, C., Linsley, P., Urban, J F., Greenwald, J. 1998 **Do effector and memory cells also need B7 ligand costimulatory signals?** *J. Immunol.* 159:1055-58
- Gessner, A., Blum, H. Y M. Rollingoff. 1993 **Differential regulation of IL-9 expression, after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice.** *Immunol.* 189:419-35

- Godfrey, D.I. y A. Zlotnik. 1993. **Control points in early T cell development.** *Immunol. Today.* 11(14): 547-53.
- Gorczynz, M.R. 1995. **Regulation of IFN- γ and IL-10 synthesis *in vivo*, as well as continous antigen exposure, is associated with tolerance to murine skin allografts.** *Cell Immunol.* 160:224-31.
- Granger, D.L., Perfect, J.R., Durack, D.T. 1986. *J. Immunol.* 137:693-701.
- Greenwald, R.J., Lu, P., Halvorson, M J., Xhou, X., Chen, S , Madden, K.B., Perrin, P.J., Morris. S.C., Finkelman, F.D., Peach, R., Linsley P.S., Urban, J.F., Gause, W.C. 1997 **Effects of blocking B7-1 and B7-2 interactions during a type 2 *in vivo* immune response.** *J. Immunol.* 158.4088-96
- Grecnis, R.K., Huntner, L. y K.J. Else. 1991. **Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes.** *Immunol.* 74:329-32.
- Gupta, S. 1988. **Cytokines: Molecular and Biological Characteristics.** *Scand J Rheum.* 76:189-201
- Harding. F.A., McArthur, J G., Gross, J.A., Raulet, D H , Allison, J.P. 1992. **CD-28 mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones.** *Nature.* 356:607-9
- Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. 1987. *Science.* 235:473-76.
- Hosken, N.A., Shibuya, K , Heath, A.W., Murphy, K.M. y A.O O'Garra. 1995. **The effect of antigen dose on CD4⁺ T cells.** *J Exp Med.* 182 1591-96.
- June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M. y C.B. Thompson 1994. **The B7 and CD28 receptor families.** *Immunol. Today.* 15:321-31
- Kapsenberg, M.L., Hilkens, C M., Wierenga, E.A , Kalinski, P. 1998 **The role of APC in regulation of allergen sepcific T cell responses.** *Curr. Op. Immunol.* 11:1593-8
- Keane-Myers, A., Gause, W C , Finkelman, F.D., Xhou, X., Willis-Karp, M 1998. **Development of murine allergic asthma is dependent upon B7-2 costimulation.** *J. Immunol.* 160:1036-46
- Kemp, M. Kurtzhals, J a . Kharamzi, A y T G Theander. 1993. **Interferon-gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infections.** *Immunol Cell Biol.* 71:583-7.

- Kishimoto, T., Taga, T., y S. Akira. 1994. **Cytokine Signal Transduction.** *Cell.* 76:253-262.
- Kumar, V., Bhardwaj, V., Soares, L., Alexander, J., Sette, A. y E. Sercarz. 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.* 92:9510-14.
- Larralde, C., Sciutto, E., Grun, J., Diaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. 1988. **Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*: Influence of sex, MHC and vaccination.** *In: Cell function and disease.* Plenum Press. New York. 325-332 p.
- Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.L., Govezensky, T., Coltorti, E. 1989. **Deciphering western blots of tapeworm antigen reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:282-90
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, L.I., Govezensky, T y M. Romano. 1995. **Sex hormone changes by the parasite lead to feminization of the male host in murine cysticercosis.** *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.* 52:575-81
- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. y J A. Bluestone. 1996. **CD28/B7 system of T cell costimulation.** *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-58
- Lewin, B. 1995. **Genes V** 5th ed. Oxford Press. USA. 1272 pp.
- Lewis, D y G. Harriman. 1996. **Cells and tissues of the immune system.** *In: Clinical immunology principles and practice.* Mosby-Year USA 1 15-38
- Liew, F Y, y F.E.G Cox. 1991. **Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide.** *Immunol. Today.*
- Magram, J., Connaughton, S.E. y R W Rajeev. 1996. **IL-12 deficient mice are defective in IFN- γ production and type 1 cytokine responses.** *Immunity.* 4:471-81.
- Mahajan, R.C 1982 **Geographical distribution of human cysticercosis.** *In* **Cysticercosis present state of knowledge and perspectives.** Academic Press. New York 39-46 p.
- Martin, D.I. , Slim, J.G. y G.J. Sole. 1995 **CD4⁺ lymphocyte count in african patients co-infected with HIV and tuberculosis.** *JAIDS Hum Retroviro.* 8 386-91.

- Mazón-Rubio, J. 1991 **La porcicultura mexicana ante el TLC.** *Desarrollo Porcícola*. 32:13-6
- Migliorini, P., Corradin, G., Corradin, S.B. 1991. **Macrophage NO₂- production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- γ .** *J. Immunol. Meth* 139:107-14
- Miralles, G.D., Stoeckle, M.Y., McDermont, D.F., Finkelman, I.D. y H.W. Murray. 1994. **Th1 and Th2 cell associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis.** *Inf & Immun.* 62:1058-63.
- Mitchell, J. 1991. **Macrophages revisited.** *Immunol. Today.* 12:115-18.
- Nicholson, L.B., Geer, J.M., Sobel, R.A., Lees, M.A. y V.K. Kuchroo. 1995. **An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Immunity.* 3:397-405
- Nicholson, B.L. y K.V. Kuchroo. 1996. **Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease.** *Curr Op Immunol.* 8:837-42.
- Pearce, E.J. y S.L. Reiner. 1995. **Induction of Th2 responses in infectious diseases.** *Curr Op Immunol.* 7:497-504.
- Pearlman, E., Kazura, W.J., Hazlett, E.F. y H.W. Boom. 1993. **Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 responses.** *J Immunol.* 151:4857-64.
- Phipps, R.P., Stein, S.H. y R.L. Roper. 1991. **A new view of prostaglandin E regulation of the immune response.** *Immunol. Today.* 12:349-52
- Pond, L., Wasson, D.L. y C.E. Hayes. 1989. **Evidence for differential induction of helper T cell subsets during *Trichinella spiralis* infection.** *J. Immunol.* 143:4232-37
- Pritchard, D.I. 1995 **The survival strategies of hookworms.** *Parasitol. Today.* 11:255-59
- Ramos-Kuri, M., Montoya, R.M., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L., Sciuotto, E., Sotelo, J., Larraalde, C. 1992. **Immunodiagnosis of neurocysticercosis** *Arch. Neurol.* 49:633-36
- Reiner, S.L., Zheng, S., Wang, Z., Stowring, L. y R.M. Locksley 1994. ***Leishmania* promastigotes evade IL-12 induction by macrophages and stimulate a broad range**

- of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J Exp Med.* 179:447-56.
- Rincón, M., Anguota, J., Nakumara, T., Fikrig, E., Flavell, R.A. 1997. **IL-6 directs the differentiation of IL-4 producing CD4⁺ T cells.** *J. Exp. Med.* 185:467-69
 - Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal-Malefyt, R., Liu, Y.J. 1999. **Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.** *Science.* 283.1183-6
 - Rodriguez, M., Terrazas, L.I., Márquez, R., Bojalil, R. 1999. **Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection.** *Parasite Immunol.* 21:177-85
 - Roitt, I. 1998. **Immunology.** 4th ed. Mosby. USA. 2815 pp.
 - Romagnani, S., 1998. **The Th1/Th2 paradigm in disease.** Chapman and Hall. USA. 241 pp.
 - Rudd, C.E., Janssen, O., daSilva, A., Raab, M. y K.V.S. Prasad. 1994. **Two-step TCR/CD4-CD4 and CD28 signaling in T cells: SH2/SH3 domains protein tyrosine and lipid kinases.** *Immunol. Today.* 15:225-34
 - Scharz, D G., Oettinger, M.A. , Schlissel, M S 1992. **V(D)J recombination.** *Ann. Rev. Immunol.* 10:359-83.
 - 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.
 - Seder, R.A y G G. LeGross. 1995. **The functional role of CD8⁺ T helper type 2 cells.** *J. Exp. Med.* 181.5-7
 - Sloan-Lancaster, J., Evavold. B.D y P.M. Allen. 1993 **Induction of T cell anergy by altered T cell receptor ligand on live antigen presenting cells.** *Nature.* 363:156-9.
 - Smilek, D., Wrath, D.C , Hodgkinson, S., Dwivedy, S., Steinman, L. y H.O. McDevitt 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. E.U A* 88:9633-37.
 - Stevenson, M.M y F. Tam. 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

- Sittes, D.P. 1996. **Inmunología básica y clínica**. 8ª ed. El Manual Moderno. México. 1099pp.
- Tauber, B. 1994. **The fagocytic system**. *Immunol. Today*. 15
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T. y C. Larralde. **A role for 17- β -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis**. *J. Parasitol.* 80:363-68
- Terrazas, L.I. 1998. **Interacciones Inmunoendócrinas en la Cisticercosis Experimental Murina: Mecanismos de Colonización Parasitaria**. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. U.N.A.M.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Morales, J., Govezensky, T. y C Larralde. 1998. **Shift from an early protective Th1 response, to a late permissive Th2 response to a murine extracellular parasite**. Submitted for publication.
- Thomson, H. 1992. **The cytokine handbook**. USA.
- Trincheri, G. 1989. **Biology of natural killer cells** *Adv. Immunol.* 47:187-376.
- Valderrama, H. 1999. **Mecanismos de polarización de la respuesta inmune: Descripción inmunológica del efecto de la dosis antigénica en el modelo murino de cisticercosis**. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. U.N.A.M. 88 pp
- Valdez, F., Hernandez, T., Govezensky, T., Fragoso, G. y E. Scuitto. 1994. **Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity**. *J. Parasitol.* 80:931-36.
- Vecchiarelli, A., Monari, C., Retini, C., Pietrella, D., Palazzetti, B., Pitzurra, L., Cassadevall, A. 1998 **Cryptococcus neoformans differently regulates B7-1 and B7-2 expression on human monocytes**. *Eur. J. Immunol.* 177:347-54
- Villa, O.F. y R.E Kuhn 1996. **Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant energy and downregulation of Th1 associated phenomena**. *Parasitology*. 112:561-70
- Watts, C. 1997 **Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules** *Ann. Rev. Immunol.* 15 561-70
- Wauben, M.H., Boog, C.J., Van der Zee, R., Joosten, I., Schhief, A. y W. Van Eden. 1992 **Disease inhibition by major histocompatibility complex binding peptide analogues of disease-associated epitopes: more than blocking alone**. *J Exp Med.* 176:667-77

- Wraith, D.C., McDevitt, H.O., Steinman, L. y H. Acha-Orbea. 1989. **Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide mediated immunotherapy.** *Cell.* 59:247-55.