

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

UNAM  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

16

ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA  
A LA RESISTENCIA A LA CISTICERCOSIS  
MURINA POR *Taenia crassiceps*

TESIS

Que para obtener el grado académico de  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

presenta:

M en C. JOSE SERGIO LOPEZ BRIONES

Asesores: Dra. Edda L. Sciutto C.  
Dra. Gladis Fragoso G.



BIOMEDICAS

México D. F.

Junio, 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**El presente trabajo de investigación se realizó  
en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM,  
bajo la asesoría de las Doctoras Edda Sciutto C.  
y Gladis Fragoso González.**

## INDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>17</b>
<b>Material y Métodos.....</b>	<b>18</b>
<b>1. Cepas de ratones.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Parásitos e infección.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Obtención de antígeno vesicular del cisticerco de T. crassiceps (TcAg) .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Obtención de ratones quimeras.....</b>	<b>19</b>
<b>5. Ensayo de proliferación linfocitaria.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Anticuerpos monoclonales.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Obtención de suspensiones celulares y análisis citofluorométrico (FACS).....</b>	<b>21</b>
<b>8. Obtención de células mononucleares y condiciones de cultivo para los ensayos de apoptosis.....</b>	<b>22</b>
<b>9. Detección por citofluorometría de células apoptóticas a través de doble tinción con Annexina-V y Yoduro de propidio.....</b>	<b>23</b>
<b>10. Detección de apoptosis a través del análisis de fragmentación del ADN por electroforesis en geles de agarosa.....</b>	<b>24</b>
<b>11. Detección de citocinas por la técnica de ELISA.....</b>	<b>24</b>
<b>12. Detección de isotipos de anticuerpos por la técnica de ELISA.....</b>	<b>25</b>
<b>13. Análisis estadístico.....</b>	<b>26</b>
<b>Resutados . Resumen del artículo publicado: Las células CD4+TCR<math>\alpha\beta</math>+ están críticamente involucradas en el control de la cisticercosis murina en ratones C57BL/6J.....</b>	<b>27</b>

1. Artículo publicado.....	29
<b>Respuesta inmune diferencial entre ratones BALB/c resistentes y susceptibles a la infección por <i>T. crassiceps</i>.....</b>	<b>55</b>
1. Incremento de la resistencia en ratones quimeras.....	55
2. Proliferación de linfocitos T y producción de citocinas en ratones resistentes y susceptibles.....	56
3. Evaluación de las subpoblaciones celulares en esplenocitos de ratones BALB/cJ y BALB/cAnN, después de 6 días de infección.....	56
4. Determinación de las subpoblaciones de linfocitos que expresan un TCRv $\beta$ específico, después de 6 días de infección.....	57
<b>Inducción de apoptosis en esplenocitos de ratones BALB/cAnN infectados con cisticercos de <i>T. crassiceps</i>.....</b>	<b>64</b>
1. Los esplenocitos (CMN) de ratones infectados con cisticercos de <i>T. crassiceps</i> expresan fosfatidilserina en la superficie celular después de la estimulación in vitro con TcAg.....	64
2. Detección de la fragmentación de ADN.....	66
3. Determinación de la susceptibilidad a la apoptosis de las células CD4+, CD8+ y CD19+, inducida por la estimulación in vitro con TcAg.....	69
<b>Conclusiones.....</b>	<b>71</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>83</b>

## RESUMEN

El modelo experimental por *Taenia crassiceps* ha sido ampliamente utilizado para orientar el estudio de la parasitosis por *Taenia solium*. Si bien se ha avanzado en la descripción de la respuesta inmune inducida por el cisticerco de *T. crassiceps*, aún se desconocen los mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia/susceptibilidad a ésta parasitosis

En esta tesis, se describen células y moléculas del sistema inmune involucrados en el control de la cisticercosis murina. Los resultados principales indican que las células CD4<sup>+</sup> son fundamentales en la resistencia a la parasitosis, más predominantemente la subpoblación TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> que la TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>. La infección se desarrolla con mayor eficiencia en ratones BALB/cAnN (Qa-2-), induciendo una disminución de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, TCR $\alpha\beta$ , específicamente la subpoblación TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup>, modificaciones que no se observan en ratones naturalmente más resistentes, BALB/cJ (Qa-2+). También se reporta un fenómeno apoptótico inducido por la estimulación con antígenos del parásito, que afecta específicamente células CD4<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>, y se discute su relevancia en la interacción huésped - parásito.

Los resultados presentados en esta tesis permiten proponer algunos de los mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia/susceptibilidad a la cisticercosis por *T. crassiceps*.

# INTRODUCCIÓN

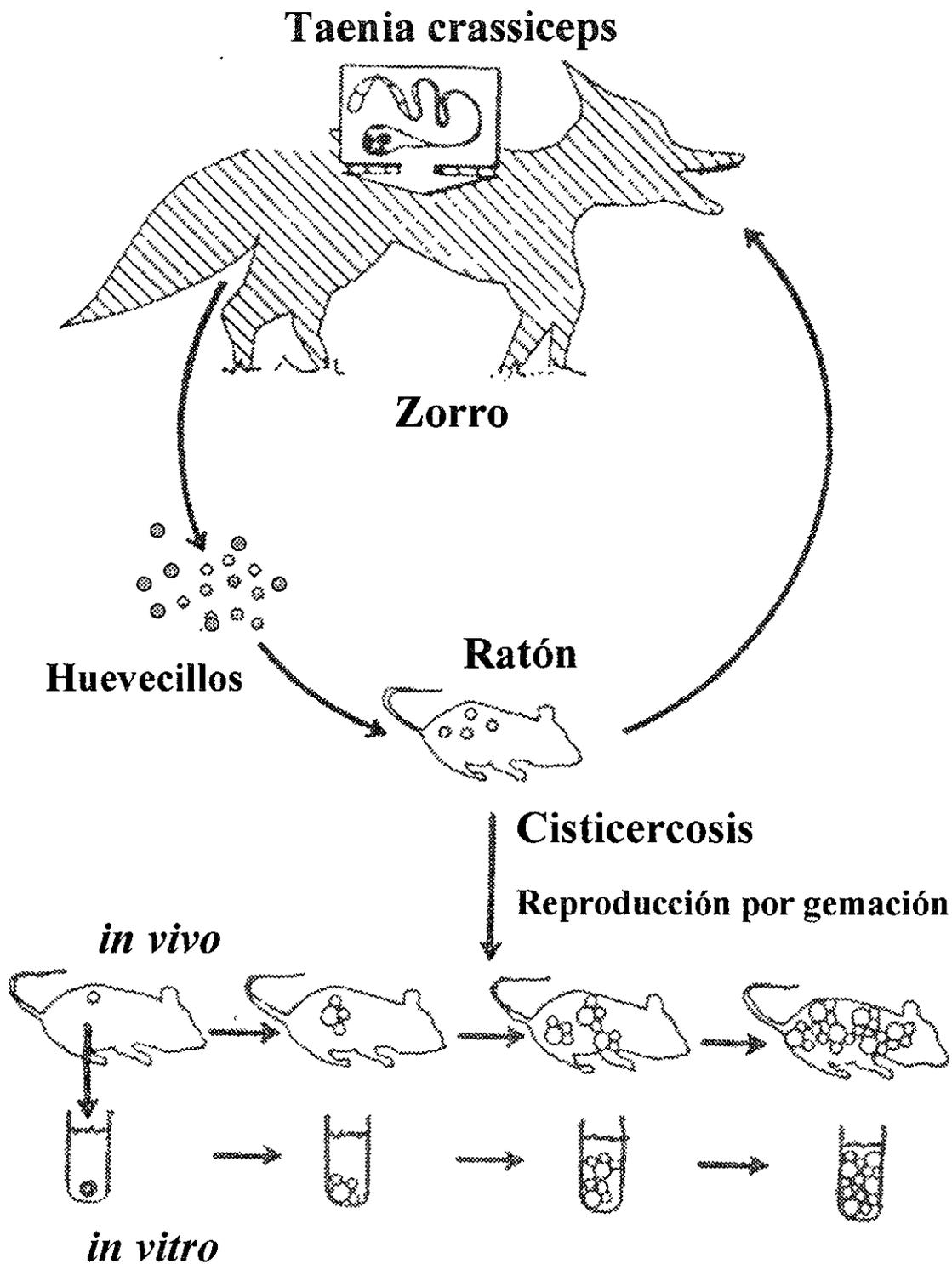
La cisticercosis causada por *Taenia solium* es una parasitosis que afecta a humanos y cerdos y es endémica en países en vías de desarrollo, donde prevalecen las condiciones que favorecen su transmisión, tales como: falta de higiene, fecalismo al aire libre, crianza rústica de cerdos y consumo de carne sin la inspección sanitaria adecuada.

Debido a la importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en México, ésta ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos (Shanley, et al., 1980), patológicos (Restrepo, et al., 1996; Sekhar, et al., 1997), inmunológicos (Wilms, et al., 1980; Rojas, et al., 1999; Cardona, et al., 1999; Arechavaleta, et al., 1998), genéticos (Huerta, et al., 2000; Fragoso, et al., 1996 y 1998; Sciutto, et al., 1995; Del Brutto, et al., 1991), así como en el diagnóstico (Shiguekawa, et al., 2000; Hernández, et al., 2000; Sciutto, et al., 1998), tratamiento (Del Brutto, et al., 2000; Gogna, et al., 1996; Singhi, et al., 2000; García Domínguez, et al., 1991; Huerta, et al., 2000) y prevención ( Malagón-Valdéz, et al., 1999). Considerando las dificultades económicas y experimentales, así como las limitaciones éticas implicadas en experimentación con cerdos o humanos, en los últimos años se ha utilizado la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps* como un modelo de cisticercosis con el cual orientar la investigación de la cisticercosis por *T. solium*.

*T. crassiceps* (Freeman, 1962) es un platelminto de la clase Cestoda, que se encuentra comúnmente en el intestino del zorro rojo de Europa y Norteamérica. Si bien el zorro es el hospedero más común, también se han encontrado en otros cánidos

como: coyotes y perros. El gusano mide aproximadamente 70 a 140 mm de largo y 2.4 mm de ancho. Presenta un escolex constituido por cuatro ventosas y un rostelo o corona formado por dos anillos de 32 a 36 ganchos rostelares. El gusano alcanza la edad madura después de seis semanas de haber ingresado en el intestino de cánidos (Freeman, 1962). El estado larvario de *T. crassiceps* es el *Cysticercus longicollis*, y sus hospederos son pequeños roedores, los cuales adquieren la infección al ingerir los huevos presentes en las heces de cánidos infectados. Los huevos pueden transformarse en cisticercos en los roedores localizándose preferencialmente en la cavidad pleural y tejido subcutáneo, y solo ocasionalmente en la cavidad peritoneal. El ciclo de vida se completa cuando un roedor infectado con cisticercos es ingerido por un cánido (Fig 1).

Existen diferentes variedades de *T. crassiceps* que se han reproducido a partir de aislados de animales naturalmente infectados: a) La cepa KBS que presenta anomalías en el escolex y es posible que no sea infectiva para cánidos; b) La cepa TOI obtenida por Freeman (1962) a partir de la infección natural de marmotas (*Marmota monax*); c) La cepa ERS, obtenida por una infección en ratas a partir de parásitos de ratón; d) La cepa HYG aislada a partir de ratones infectados con huevos de una taenia obtenida de una zorra; e) la cepa DEB, aislada de un ojo humano y f) La cepa ORF, usada comúnmente en nuestro laboratorio. Esta última es una variedad anormal debido a que raramente produce escolex, lo que se ha acentuado conforme la cepa se ha transferido de ratón en ratón (Dorais and Esch, 1969), por lo cual no es infectiva para su hospedero definitivo. Además, se ha determinado que esta cepa presenta aberraciones cromosómicas (Smith, et al., 1972).



**Fig. 1. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps***

Este parásito se reproduce rápidamente por gemación polar múltiple en la cavidad peritoneal de ratones, ofreciendo así una importante fuente de antígenos obtenidos en condiciones experimentales controladas. *T. crassiceps* presenta algunas similitudes con *T. solium*, con base en las cuales, se ha considerado como modelo experimental que permita intensificar el estudio de la cisticercosis por *T. solium*. Entre las similitudes más importantes figuran:

A) El ciclo de vida de *T. crassiceps* es similar al de *T. solium*, ambos parásitos tienen un huésped intermediario y un huésped definitivo en su ciclo de vida.

B) Los cisticercos, como las taenias de ambas especies presentan una estructura macroscópica similar, con algunas particularidades: los cisticercos y la taenia de *T. crassiceps* son mas pequeños. Los cisticercos se diferencian además por presentar la capacidad de reproducirse por gemación. Esta característica es la que permite cultivarlos en el laboratorio.

C) Existe una extensa similitud antigénica entre ambos parásitos. Esto pudiera permitir el reemplazo de los antígenos de *T. solium* por los de *T. crassiceps* con fines diagnósticos en cisticercosis humana, sin detrimento en la sensibilidad ni en la especificidad de los ensayos (Larralde, et al., 1989), con la ventaja de que los antígenos murinos pueden obtenerse en condiciones controladas y sistemáticas, lo que aumenta la reproducibilidad de los ensayos.

D) Los antígenos de *T. crassiceps* y de *T. solium*, inducen protección cruzada. Se ha observado que los antígenos de *T. crassiceps* son capaces de proteger contra la cisticercosis porcina y viceversa (Sciutto, et al., 1990; 1995).

Estas similitudes, aunadas a los bajos riesgos que implica la utilización del parásito murino en la salud humana, y la facilidad para reproducirlo en el laboratorio,

han estimulado el estudio de esta cisticercosis murina. Su mayor conocimiento ha permitido orientar y favorecer el estudio de la cisticercosis por *T. solium* tanto en el hombre como en el cerdo, especialmente en el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina.

La cisticercosis en el ratón es una parasitosis de tipo crónico, no mata a su huésped aún cuando continúa multiplicándose hasta que la carga parasitaria supera al peso del propio ratón después de meses de infección. A consecuencia de las infecciones crónicas, hay presencia de antígenos circulantes, estimulación antigénica continua, estados de inmunosupresión temporales y formación de complejos inmunes. En este tipo de parasitosis es característico la presencia de altos niveles de inmunoglobulinas, principalmente IgE (Ozeretskovskaia, 2000).

Con respecto a la respuesta inmune asociada a la cisticercosis murina, se sabe que cursa con altos niveles de eosinofilia y leucocitosis con una importante disminución de las células cebadas en el peritoneo de ratones inoculados con el parásito (Freeman, 1964). En ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps*, se ha mostrado que la infección crónica induce una forma de inmunosupresión, reflejada por una disminución de la capacidad proliferativa *in vitro* a concanavalina A o anticuerpos anti CD3 de células esplénicas provenientes de ratones infectados (Sciutto, et al., 1995). En estudios recientes se ha descrito que la parasitosis induce una respuesta inmunológica de tipo Th1 tempranamente después de la infección (7 días) cuando el crecimiento y reproducción de los parásitos es limitado. Esta respuesta Th1 se cambia progresivamente a una respuesta Th2 conforme aumenta la cantidad de parásitos en este compartimento y la infección se hace crónica (Terrazas, et al., 1998; Villa, et al., 1996). Con base en estas observaciones se ha propuesto que una respuesta

temprana de tipo Th1 es capaz de controlar el crecimiento de los parásitos, mientras que una respuesta tardía de tipo Th2 es compatible con la reproducción y permisividad para la reproducción del parásito. Otros reportes señalan que durante el curso de la infección participa una respuesta inmune mixta Th1/Th2 con producción de altos niveles de INF- $\gamma$  e IL-4 (Toenges, et al., 1999). Estas diferencias pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas al respecto de las cepas de ratones singénicos, dosis de desafío, tiempo y técnica de infección, etc. Es probable que tanto la respuesta inmune asociada a la parasitosis como la composición genética del hospedero jueguen un papel fundamental en la patología de esta enfermedad, aunque muchos de los mecanismos involucrados son aún desconocidos.

Otro factor importante que probablemente intervenga en la regulación de la respuesta inmune, son las hormonas sexuales. Ha sido mostrado que existe un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas-timo, que puede interactuar con elementos del sistema inmune (Grossman, 1985). En este sentido, se ha determinado que en la cisticercosis murina inducida por *T. crassiceps*, las hembras son más susceptibles a la infección que los machos (Huerta, et al., 1992) y que dentro de una misma cepa, existen también variaciones individuales en la resistencia a la parasitosis. Diferentes estudios realizados en nuestro laboratorio, han mostrado que estas diferencias en susceptibilidad son determinadas genéticamente (Sciutto, et al., 1991; Fragoso, et al., 1996). Los resultados obtenidos señalan que las cepas de fondo genético C57BL/6J son altamente resistentes a la parasitosis, mientras que las cepas que presentan un fondo genético BALB tienen diferentes grados de susceptibilidad. Las cepas congénitas recombinantes en H2 (BALB/K y BALB/B) resultaron más resistentes que la cepa BALB/cAnN, y dentro de las sublíneas de la cepa BALB/c, BALB/ByJ presentó

una susceptibilidad intermedia, mientras que BALB/cAnN resultó ser la más susceptible. Un resultado que orientó la búsqueda de factores genéticos involucrados en la resistencia fue el hallazgo de que la sublínea BALB/cJ resultó altamente resistente en términos de la cantidad de cisticercos obtenidos después de 30 días de infección (Tabla 1). Cabe señalar que el criterio de clasificar una cepa como resistente o susceptible se definió después de numerosos estudios de cinética de la parasitosis en diferentes cepas murinas, con base al número de cisticercos recuperados 30 días después de la infección intraperitoneal con 10 cisticercos/ratón. La mayor resistencia observada en BALB/cJ resultó de especial interés considerando que se ha reportado que esta cepa presenta solo algunas diferencias conocidas con respecto a las demás sublíneas BALB/c. Entre ellas se reportan que en BALBc/J hay mayores niveles de  $\alpha$ -fetoproteína en los animales adultos, niveles elevados de 3 enzimas que participan en la biosíntesis de catecolaminas; tirosina hidroxilasa, dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y feniletanolamina N-metil transferasa (probablemente asociadas con el comportamiento agresivo de esta cepa) y los genes funcionalmente activos que codifican para la proteína no clásica de histocompatibilidad (MHC clase Ib) denominada Qa-2 (Roderick, et al., 1985).

La proteína Qa-2 puede ser codificada por un conjunto de 4 genes de la subregión Qa (Q6, Q7, Q8 y Q9) y es expresada en nódulos linfoides, bazo, timo, médula ósea e hígado. Los mayores niveles de expresión se reportan en linfocitos T activados y en menor grado por linfocitos B y T inmaduros. En relación a

**TABLA 1. Resistance of BALB/c substrains and BALB H-2 congenic mice to infection to with *Taenia crassiceps* cisticerci.**

Strain	H2		* Parasite Load	
	Haplotype	Qa-2	Female	Male
BALB/cAnN	D	-	122.1 ± 8.07 <sup>a</sup>	30.29 ± 2.15 <sup>b</sup>
BALB/cByJ	D	-	31.1 ± 4.80 <sup>b</sup>	4.46 ± 1.84 <sup>c</sup>
BALB/cJ	D	+	10.2 ± 2.98 <sup>c</sup>	0.39 ± 0.16 <sup>e</sup>
BALB/B	B	+	23.7 ± 3.76 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.27 <sup>e</sup>
BALB/K	K	-	27.7 ± 5.49 <sup>b</sup>	0 <sup>e</sup>

\* Mean number ± Standard error of the number of cysticerci recovered 30 days after challenge with 10 parasites/mouse.

a, b, c, d, e data labeled with the same letter are not significant different from each other, whereas those with different letters are significantly different (P < 0.01).

(Tomado de Fragoso, et al, Parasitology, 1996).

su estructura, ésta glicoproteína presenta 3 dominios globulares tipo inmunoglobulina, (cadena  $\alpha$ ) la cual está asociada a una molécula de  $\beta$ 2-microglobulina y como todos los antígenos no clásicos, exhibe un polimorfismo extremadamente bajo (Stroynowski, 1995).

Considerando a Qa-2 como un probable candidato relacionado con la resistencia a la cisticercosis murina, se observó en retrocruzas de F1 (BALB/cAnNxBALB/cJ) x BALB/cAnN que la expresión de Qa-2 se asociaba a una menor cantidad de parásitos. La asociación entre Qa-2 y la resistencia se confirmó a través de la transferencia del gene Q9 (Fragoso, et al., 1998).

La asociación de esta proteína con una función en la capacidad de controlar la extensión de esta parasitosis resulta de especial interés, considerando que aún no existen funciones claramente establecidas y asociadas a Qa-2. Entre las observaciones realizadas al respecto de esta proteína figuran las siguientes: se ha reportado que puede ser sintetizada como una molécula anclada a la membrana celular (40kDa) y en forma soluble (39 kDa). La capacidad de liberarla utilizando fosfolipasa C, indica la presencia de un anclaje transmembranal de tipo glicolipídico (específicamente fosfatidil- inositol). La forma soluble de Qa-2 se incrementa después de estimular los linfocitos T con mitógenos, tales como la concanavalina A. Cada uno de los genes que codifican esta proteína (Q6, Q7, Q8 y Q9), son muy similares entre si y pueden originar tanto la forma soluble como la anclada a la membrana. Sin embargo, la mayor parte de la proteína Qa-2 expresada en la superficie membranal es codificada por los genes Q7 y Q9 (Mellor, et al , 1985; Stroynowski, et al. , 1987).

En relación a su función, existen evidencias que sugieren que esta proteína pudiera tener funciones inmunológicas. Estudios realizados con la forma soluble de

Qa-2, han mostrado que esta molécula es capaz de unirse a un grupo de 200 péptidos pequeños de aproximadamente 9 aminoácidos, derivados de proteínas intracelulares, lo que sugiere que como otras moléculas clase I, Qa-2 podría funcionar como molécula presentadora de antígenos sintetizados endógenamente (Tabaczewski, et al., 1997; Joyce, et al., 1994). Por otro lado, se ha encontrado que a través de Qa-2 se pueden inducir señales de activación cuando células Qa-2<sup>+</sup> son estimuladas con anticuerpos dirigidos específicamente contra el dominio  $\alpha 3$  de la proteína Qa-2. Sin embargo, la proliferación inducida a través de Qa-2 requiere de una señal secundaria, producida por un anticuerpo entrecruzador y/o por sustancias mitogénicas como el PMA (Phorbol 12 myristate 13 acetate). Este proceso solo se ha observado en la estimulación de células purificadas CD4<sup>+</sup> pero no en células CD8<sup>+</sup> (Hahn, et al., 1992). Cuando células Qa-2<sup>+</sup> y Qa-2<sup>-</sup> son específicamente estimuladas a través de la molécula CD3, se induce proliferación en ambas poblaciones, sugiriendo que Qa-2 tiene un papel secundario en la activación, después de una primera estimulación por el complejo CD3/TCR (Hahn and Soloski, 1989). Sin embargo, Amiyaran, et al. (1995) utilizando anticuerpos dirigidos hacia las porciones  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  de Qa-2 y contra otras porciones del MCH clase I, observaron un efecto inhibitorio sobre la estimulación inducida a través del CD3. Esto sugiere que las secuencias lipoproteicas transmembranales y citoplasmáticas (fosfatidil-inositol) de la proteína Qa-2 no son necesarias para producir un efecto de activación o inhibición celular, siendo los dominios extracelulares los más importantes en la generación de señales para inducir efectos biológicos. Adicionalmente, existen reportes en los que se ha descrito que la molécula Qa-2 es la misma proteína codificada por el gen Ped, la cual tiene un papel funcional muy importante durante la etapa embrionaria en el ratón (Warner, et al., 1998; McElhinny, et al., 2000).

Considerando que, la proteína Qa-2 es capaz de unir y presentar péptidos a las células T, como lo hacen las moléculas clásicas del MHC, que se pueden inducir señales de activación a través de esta molécula, que Qa-2 está asociada a la resistencia a la parasitosis y que se expresa tempranamente durante el desarrollo embrionario, consideramos que las diferencias en susceptibilidad o resistencia a la cisticercosis por *T. crassiceps* puedan ser resultado de la capacidad de Qa-2 para influir en ciertas funciones inmunológicas, tales como eventos de selección linfocitaria o quizá funcionando como una molécula co-estimuladora.

En esta tesis se evalúan estas posibilidades estudiando la respuesta inmune inducida por la cisticercosis en una cepa susceptible (BALB/cAnN, Qa-2<sup>-</sup>) y otra relativamente resistente (BALB/cJ, Qa-2<sup>+</sup>) y se determinan cuales son los componentes críticos de la respuesta inmune para el control de la parasitosis por *T. crassiceps* a través del uso de ratones Knock out.

Los resultados obtenidos en este estudio podrian ser de utilidad para orientar el estudio de los mecanismos inmunológicos involucrados en la resistencia y/o susceptibilidad a la cisticercosis por *T. solium*, así, como en el desarrollo de nuevas estrategias para el control de esta enfermedad.

## **OBJETIVO**

1. ESTUDIAR LOS MECANISMOS INMUNOLÓGICOS ASOCIADOS A LA RESISTENCIA / SUSCEPTIBILIDAD A LA CISTICERCOSIS MURINA.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

1. Determinar la importancia de diferentes moléculas del sistema inmunológico en la parasitosis, utilizando ratones "knock out" con fondo genético B6.
2. Determinar las subpoblaciones de linfocitos T que participan en la respuesta inmunológica en contra del parásito en las cepas Qa-2<sup>+</sup> y Qa2<sup>-</sup>, en ratones con fondo genético BALB/c
3. Determinar los isotipos inmunoglobulinas y citocinas que participan en la respuesta inmunológica en contra del parásito.
4. Determinar la importancia de las células Qa-2<sup>+</sup> en la resistencia a la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, a través de la creación de ratones quimeras.
5. Determinar si un proceso de muerte celular (Apoptosis) está involucrado en la susceptibilidad a la parasitosis por *T. crassiceps*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ratones**

Se utilizaron 2 cepas de ratones diferentes en su grado de susceptibilidad a la infección por *Taenia crassiceps*, BALB/cAnN (AnN, susceptible) y BALB/cJ (Jax, resistente). Los "stocks" originales fueron donados por Michael Bevan (Seattle University) y por el National Institute for Medical Research, Animal Center, London England, respectivamente. Ambas cepas han sido mantenidas en nuestro Instituto.

### **Parásitos e Infección**

La cepa ORF de *T. crassiceps* (Zeder, 1800) (Rudolphi 1810), aislada por Freeman (Freeman, 1962) y suministrada por B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) ha sido mantenida por pasajes intraperitoneales seriados en ratones hembra BALB/cAnN durante 12 años el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los parásitos utilizados para la infección se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones con una infección de 60 días, lavados 3 veces con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Se seleccionaron los parásitos con un diámetro de aproximadamente 10mm y se utilizaron 10 por ratón en todos los experimentos de infección. En algunos experimentos se utilizaron tanto ratones de 6 días, como de 30 días de infección.

### **Obtención de antígenos totales del cisticerco de *Taenia crassiceps* (TcAg)**

Los antígenos solubles de cisticercos de *T. crassiceps*, se obtuvieron según el siguiente protocolo; los cisticercos se extrajeron del peritoneo de ratones hembras infectadas durante 1-2 meses, se lavaron 5 veces con PBS frío (4°C) Después, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 25,000 rpm por 60 min. a 4 °C. El

sobrenadante se recuperó, se esterilizó por filtración a través de un filtro millipore (poro de 2µm), y se determinó la concentración de proteína utilizando la técnica de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Se prepararon alícuotas y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **Obtención de ratones quimeras**

Para la obtención de las quimeras, se irradiaron ratones hembras BALB/cAnN (Qa-2<sup>+</sup>) y BALB/cJ (Qa-2<sup>-</sup>), con una dosis subletal única de 800 Rads con una fuente de <sup>137</sup>Cs. (Gammacell 1000 Elite Nordion International Inc., con una dosis central de 4.05Gy / min), los cuales sirvieron como receptores. Para la reconstitución celular, las células de médula ósea fueron obtenidas de la tibia y peroné de ratones sanos (donadores) de las mismas cepas de ratones, se lavaron 3 veces con PBS a 4°C y se ajustaron a una densidad de 1 x 10<sup>6</sup> células / ml. Los ratones irradiados fueron reconstituídos inmediatamente, inyectándoles por vía intravenosa (vena coxígea) 2-5 x 10<sup>6</sup> células de médula ósea, resuspendidas en 0.2ml de PBS. Los ratones reconstituídos se dejaron reposar por 25 días y después se infectaron por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Después de 30 días de la infección, los ratones se sangraron y se verificó la efectividad de la reconstitución celular por análisis de citometría de flujo, determinando la presencia de la proteína Qa-2. A los 60 días de infección los ratones se sacrificaron y se determinó la carga parasitaria en cada ratón. Todos los ratones recibieron pretratamiento con antibiótico (2 mg/ml sulfato de neomicina, Sigma) durante todo el experimento en el agua del bebedero, desde 10 días antes de comenzar el experimento. Se hicieron las siguientes quimeras: cJ→cJ, AnN→AnN and cJ→AnN (Donador→Receptor).

## Ensayo de Proliferación

Se obtuvieron esplenocitos de ratones al sexto día de la infección y de sus controles no infectados. Las células se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, Md), suplementado con L-glutamina (0.2 mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM), aminoácidos no esenciales (0.01 mM), penicilina (100 U / ml), estreptomycin (100 µg / ml) y Suero Bovino Fetal 10 % (FBS). Las células se estimularon con Concanavalina A (5 µg / ml) o antígenos totales de *T. crassiceps* (10 µg / ml). Se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, en microplacas de fondo plano, a una concentración final de 2 x 10<sup>5</sup> células/ 200 µl de volumen final. Después de 72 hr, se añadió 1 µCi por pozo [methyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (Amersham, Life, Science, U. K.), después de 18 h se cosecharon y las cuentas por minuto (cpm) se cuantificaron en un contador de centelleo [1205 β-plate liquid scintillation counter (Wallac Oy, 20101 Turku 10, Finland)]. Todos los ensayos se realizaron por triplicado de cada una de las muestras individuales provenientes de grupos de 3-4 ratones por grupo. Los datos se expresan como la media ± error estándar de las cuentas por minuto (cpm) de cada grupo experimental. Los sobrenadantes de los cultivos celulares se colectaron después de 72 h de estimulación. bajo condiciones estériles para la determinación de citocinas (IL-2, IFNγ, IL-4 e IL-10) por la técnica de ELISA, utilizando un kit comercial, y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes (PharMingen, San Diego, Ca).

## **Anticuerpos monoclonales**

Los siguientes anticuerpos monoclonales biotinilados utilizados fueron: anti-TCR V $\beta$ 2 (B20.6), V $\beta$ 3 (KJ25), V $\beta$ 4 (KT4), V $\beta$ 5.1, 5.2 (MR9-4), V $\beta$ 6 (RR4-7), V $\beta$ 7 (TR310), V $\beta$ 8 (F23.1), V $\beta$ 9 (MR10-2), V $\beta$ 10<sup>b</sup> (B21.5), V $\beta$ 11 (RR3-15), V $\beta$ 12 (MR11-1), V $\beta$ 13 (MR12-3) y V $\beta$ 14 (14-2), los cuales fueron donados por la Dra. Marcia A. Blackman del St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA. El conjugado de estreptoavidina-Quantun Red<sup>TM</sup> fue utilizado para revelar los anticuerpos biotinilados. Los anticuerpos anti-CD4 PE (RM4-5), anti-CD8 FITC (53-6.7), anti-CD3 CyChrome(clone 145-2C11), anti-TCR $\gamma\delta$  FITC (GL3) y anti-TCR $\alpha\beta$  FITC(H57-597) fueron adquiridos en Becton Dickinson (San José, Cal.).

## **Obtención de la suspensión celular y análisis citofluorométrico (FACS)**

Las células esplénicas de ratones BALB/c susceptibles y resistentes se cosecharon después de ser cultivadas durante 3 días en medio (RPMI) o antígenos del cisticerco de *Taenia crassiceps*. La expresión de CD8 y CD4 se determinó a través de la tinción con anticuerpos anti-CD8 PE o anti-CD4 FITC respectivamente. Al mismo tiempo, se tiñeron células con el anticuerpo control del mismo isotipo, para determinar la tinción inespecífica en las células. Brevemente, las células fueron lavadas con PBS conteniendo 10% de suero bovino fetal inactivado y azida de sodio (0.02 %), después se incubaron con el anticuerpo correspondiente a 4°C, 30 min. Posteriormente, las células se lavaron y se resuspendieron en una solución isotónica conteniendo formaldehído al 3 %. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Los resultados se expresaron como porcentaje de células positivas. En todos los experimentos, se usaron células de

ratones no infectados y de infectados durante 6 días. Para determinar el efecto *in vivo* en la distribución de las células que expresan un determinado tipo de TCR V $\beta$ , los esplenocitos se obtuvieron a los 6 días de infección y se tiñeron como se indicó anteriormente. Para el análisis de las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> se adquirieron 10,000 eventos. Los resultados fueron reportados como porcentaje de células teñidas. Para evaluar la reconstitución celular en las quimeras y del fenómeno en sí, se utilizaron anticuerpos biotinilados anti-Qa-2, y el conjugado de estreptoavidina-Quantun Red™ para revelar los anticuerpos biotinilados.

### **Obtención de las células y condiciones de cultivo para los ensayos de apoptosis**

Los esplenocitos de ratones no infectados e infectados de 30 días se obtuvieron asépticamente y se maceraron en 3 ml de medio de cultivo RPMI 1640 frío (4°C). Se preparó una suspensión celular a través de aspirar y expulsar varias veces, utilizando primero una jeringa con una aguja del no. 23 y después una del no. 26. Las células mononucleares (CMN) fueron purificadas por centrifugación, utilizando un gradiente de densidad con Ficoll-Histopaque (Sigma, Diagnostics Inc., St Louis, MO, USA). Las CMN se lavaron 3 veces con PBS frío (4°C), se contaron y se ajustó la densidad celular a  $1 \times 10^6$  células / ml, después se cultivaron en frascos de cultivo (10 ml / frasco), se incubaron en ausencia o presencia de antígenos de *T. crassiceps* (10  $\mu$ g / ml) a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células se utilizaron para detectar apoptosis por distintas técnicas.

## **Detección por citofluorometría de células apoptóticas a través de la tinción con Annexina-V y Yoduro de propidio**

Se realizaron dobles marcajes con Annexina-V y yoduro de propidio, de acuerdo a la técnica sugerida por el proveedor del Kit (Roche Molecular Biochemical, USA), con pequeñas modificaciones. La Annexina-V es una proteína con alta afinidad por la fosfatidilserina, la cual es ampliamente utilizada para detectar células en apoptosis. En este estudio, utilizamos la Annexina-V recombinante acoplada a FITC (Roche Molecular Biochemical, USA) para determinar la apoptosis en CMN de ratones BALB/cAnN no infectados e infectados (30 días), después de la estimulación *in vitro* con antígenos de *T. crassiceps*. Brevemente, las CMN ( $1-2 \times 10^6$  células/ml) se lavaron 3 veces con PBS frío (4°C) y se resuspendieron en 200  $\mu$ l de una solución de pegado comercial (Roche Molecular Biochemical, USA) conteniendo 2  $\mu$ l de Annexina-V (FITC). Se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Antes del análisis por citometría de flujo se añadió 1  $\mu$ l de yoduro de propidio, para descartar las células que mueren por necrosis. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo (FACScan Becton Dickinson, Palo Alto, Calif.). Para determinar el fenotipo de las células en apoptosis, se realizaron dobles tinciones, utilizando 1  $\mu$ g / 100  $\mu$ l /  $10^6$  células de cada uno de los siguientes anticuerpos anti ratón; anti-CD8 PE (57-6.7), anti-CD4 CyChrome (GK1.5) y anti CD19 PE (1D3) (PharMingen, San Diego, Calif.) y la Annexina-V FITC. Un mínimo de 10,000 células de cada muestra fueron analizadas

## **Detección de apoptosis a través del análisis de la fragmentación de ADN por electroforesis en gel de agarosa**

La fragmentación de ADN ha sido utilizado como un marcador bioquímico de apoptosis, debido a que una vez que las células han fragmentado su ADN, están destinadas a morir, y no hay mecanismos de rescate para eliminar la señal apoptótica. En este estudio se utilizó esta técnica para evaluar el fenómeno de apoptosis. El ADN total de las células fue extraído utilizando el siguiente protocolo; después del período de estimulación, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 500µl de una solución de lisis que contiene: 50 mM Tris-HCl, pH=8.0, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0.5% SDS y 0.5 mg / ml de proteinasa K ( Boehringer-Mannheim) y se incubó a 50°C durante 2h. Después, se realizó una extracción de fenol/cloroformo, seguida por una precipitación con etanol. El ADN fue disuelto en una solución de Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) y un tratamiento con ARNasa fue realizado para eliminar el ARN. Las muestras de ADN fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% y se corrió a 5 V/cm durante 4h, después se visualizó con una tinción con bromuro de etidio.

## **Detección de citocinas por la técnica de ELISA**

Se utilizaron microplacas para ELISA (Nunc-Immuno™ Plate, Maxisorp™ Surface), las cuales se sensibilizaron con 1.5 µg / ml de las siguientes citocinas: IFN-γ, IL-2, IL-4, e IL-10. Las citocinas se diluyeron en una solución amortiguadora de carbonatos (pH=9.6), se colocaron 100 µl por pozo y las placas se incubaron a 4°C durante 24h. Después, las placas se lavaron con una PBS conteniendo Tween-20 al 0.3 %, y se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución de PBS-albumina sérica bovina

(BSA) al 1% durante 60 min. Las muestras de sobrenadantes de cultivo celulares y diluciones de concentraciones conocidas de interleucinas recombinates se añadieron y se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. Enseguida las placas se lavaron y se añadieron los anticuerpos anti-interleucinas biotinilados (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, e IL-10), se incubaron 30 min. Las reacciones positivas fueron detectadas usando el conjugado de estreptoavidina-peroxidasa (1:2000) durante 30 min a temperatura ambiente. El TMB (3,5'-5,5'-Tetramethylbenzidine) fue utilizado como sustrato (Sigma, 5mg/ml). La reacción de color fue detenida utilizando 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.2 N ) y los valores de absorbancia fueron evaluados a 450 nm en un lector de ELISA (Human GmbH, Humareader, Model 2106).

### **Detección de Isotipos de anticuerpos por la técnica de ELISA**

Los títulos de distintos isotipos de anticuerpos fueron evaluados en el suero de animales infectados y no infectados por la técnica de ELISA, utilizando TcAg como fuente de antígeno. Brevemente, las placas de ELISA se sensibilizaron con 100  $\mu$ l por pozo de TcAg (1 $\mu$ g/ml), durante toda la noche a 4°C. Se lavaron con PBS-Tween-20 (0.3%) y se bloquearon los sitios inespecíficos con PBS-BSA (1%). El suero diluido 1:100 en PBS-Tween fue añadido (100  $\mu$ l/pozo) e incubado 60 min a 37°C. Las inmunoglobulinas (Igs) fueron detectadas utilizando 100  $\mu$ l anti-Igs biotinilados (biotin-conjugated anti-IgG, anti-IgE, anti-IgM, anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, Sigma Chemical Co. St Louis, MO) diluidos 1:2000 e incubados durante 45 min a 37 °C. las reacciones positivas fueron detectadas utilizando estreptoavidina-peroxidasa (1:2000) durante 30 min at 37 °C. El TMB (3,5'-5,5'-Tetramethylbenzidine) fue utilizado como sustrato

(Sigma, 5 mg / ml). ). La reacción de color fue detenida utilizando 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.2 N ) y los valores de absorbancia fueron evaluados a 450 nm en un lector de ELISA (Human GmbH, Humareader, Model 2106).

### **Análisis estadístico**

Las pruebas no-paramétricas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis fueron usadas para la comparación estadística de la carga parasitaria entre grupos de ratones. Para los ensayos de citometria de flujo y proliferación linfocitaria, se realizó la prueba para muestras no-apareadas de Welch´s-test (prueba alternativa de *t*-test). Para los experimentos de apoptosis, se hicieron comparaciones estadísticas entre el grupo control y el experimental, utilizando la prueba de *t*-student, una  $P < 0.05$  ó menor fue considerada significativa.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando en programa computacional de GraphPad (InStat Software Program, GraphPad, San Diego, Cal.).

## RESULTADOS I.

### Resumen del artículo publicado: Las células CD4+TCR $\alpha\beta$ están críticamente involucradas en el control de la cisticercosis murina, en ratones C57BL/6J.

La cisticercosis por *T. crassiceps* es una parasitosis que se desarrolla principalmente en el peritoneo de ratones BALB/cAnN y en menor grado en ratones C57BL/6J. Recientemente, se ha descrito que es probable que un mecanismo inmunológico mediado por células T, esté involucrado en la resistencia en contra de esta parasitosis. Con el objetivo de tratar de identificar cuales son las células involucradas en la resistencia a la cisticercosis por *T. crassiceps*, utilizamos ratones C57BL/6J modificados genéticamente (Knock out mice), deficientes en distintas moléculas de importancia inmunológica como: CD4, CD8, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$  y RAG-1. Los resultados de este trabajo nos muestran que después de 30 días de infección se observa un porcentaje de mortalidad en deficientes en: CD4 $^{-/-}$  (57.2%), TCR $\beta$  $^{-/-}$  (42.9%), RAG-1 $^{-/-}$  (42.9%) y en menor grado en TCR $\alpha$  $^{-/-}$  (28.6%). Interesantemente, en los ratones BALB/cAnN y Silvestres (Wild Type, WT), ni en los ratones deficientes en CD8 y TCR $\delta$  se observó este fenómeno. En los ratones que presentaron mortalidad, también se observó una mayor carga parasitaria, en comparación con los ratones silvestres. Para evaluar la reactividad inmunológica en contra del parásito, se realizaron experimentos de proliferación in vitro de las células esplénicas de los ratones genéticamente deficientes, e infectados por 30 días, en los cuales se observó que las células de los ratones CD8 $^{-/-}$ , TCR $\delta$  $^{-/-}$  y WT infectados presentan una respuesta proliferativa antígeno específica mayor que los ratones no infectados y que los otros ratones deficientes CD4 $^{-/-}$ , RAG $^{-/-}$ , TCR $\alpha$  $^{-/-}$  TCR $\beta$  $^{-/-}$  y RAG-1 $^{-/-}$ .

Al evaluar la producción de citocinas en sobrenadantes de esplenocitos estimulados con antígenos de *T. crassiceps*, los niveles de citocinas T1 (IL-2, INF $\gamma$ ) y T2 (IL-10, IL-10) se incrementan en esplenocitos de ratones WT infectados mientras los ratones deficientes en CD8 $^{-/-}$  y TCR $\delta^{-/-}$ , mostraron el mismo patrón de producción de citocinas que los WT pero en menores niveles. Mientras tanto, en los ratones TCR $\alpha^{-/-}$ , TCR $\beta^{-/-}$  y CD4 $^{-/-}$  no hay aumento significativo de IL-4, aunque aquellos TCR $\alpha^{-/-}$  y CD4 $^{-/-}$  mostraron aumento en los niveles de IL-2, aunque en menores niveles que el raton WT infectado. Interesantemente, en los ratones CD4 $^{-/-}$ , TCR $\alpha^{-/-}$ , TCR $\beta^{-/-}$  y RAG-1 $^{-/-}$  que resultaron con un importante índice de mortalidad, no se detectó producción de anticuerpos IgG ni IgM, mientras que en los ratones CD8 $^{-/-}$ , TCR $\delta^{-/-}$  y WT infectados si hubo una importante producción de estos anticuerpos. En conclusión, las células CD4 $^{+}$  TCR  $\alpha\beta^{+}$  son las más importantes en la inducción de la protección en contra de la parasitosis por *T. crassiceps*, participando en el control de la cantidad de parásitos que se recuperan después de 30 días de infección, así como en la sobrevivencia. Mientras que las células CD8 $^{+}$  y las células TCR $\gamma\delta^{+}$  parecen estar involucradas solo en el control de la cantidad de parásitos, y no tener un papel importante en el fenómeno de sobrevivencia a la parasitosis. Además la ausencia de las células CD4 $^{+}$  o TCR $\alpha\beta^{+}$  altera la viabilidad de los ratones (fenómeno no antes visto). Aunque no se sabe con certeza cual es la causa de la mortalidad en estos ratones inmunodeficientes, si es bien conocido que el parásito es capaz de liberar productos biológicos que alteran la respuesta inmune e incluso inducir la muerte celular, por lo que es posible que estos productos secretados por el parásito afecten a diferentes células y tejidos, de manera que se pueda inducir la muerte en estos ratones inmunodeficientes. También es posible

que estos productos liberados por el parásito puedan ser neutralizados por los anticuerpos producidos por los ratones inmunodeficientes. Sin embargo, los ratones que presentaron un índice de mortalidad importante, no producen anticuerpos. Un hallazgo importante, es el que en estos ratones C57BL/6J inmunodeficientes una respuesta de tipo T2 parece ser la que está involucrada en la resistencia a la parasitosis. Los resultados presentados en este trabajo, ayudarán a establecer el papel de la respuesta inmunológica en el control de la infección por *T. crassiceps*.

**Parasitology  
Research**

Form 3

**Springer**

(Date)

13.02.2001

To

**Dra Edda Sciutto**

**Inst. de Investigaciones Biomedicas**

**Apartdo Postal 70228**

**Ciudad Universitaria**

**Apardado Postal 70228**

**04510 Mexico D.F**

Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your contribution

**Author(s): Sergio López-Briones et al. Me -254-00**

**Titel: CD4+ $\alpha\beta$  T cells critically involved in the control of experimental murine cysticercosis in C57BL/6J mice**

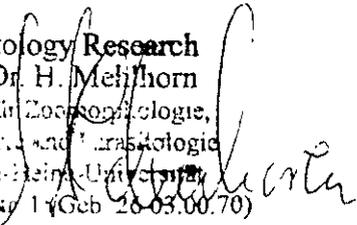
has been accepted for publication in *Parasitology Research*.

Your manuscript will go through the normal copy-editing process. If the corrections are extensive, the paper will be returned to you for outstanding questions to be resolved and if necessary for you to have the paper retyped.

Sincerely Yours

(Prof. Dr. H. Mehlhorn)

**Parasitology Research**  
**Prof. Dr. H. Mehlhorn**  
Institut für Zoophysikologie,  
Zellbiologie und Parasitologie  
Heinrich-Heine-Universität  
Universitätstr. 1 (Geb. 28-03.00.70)  
D-40225 Düsseldorf, Germany



## ARTICULO PUBLICADO.

Sergio López-Briones<sup>1</sup>, Mark J. Soloski<sup>2</sup>, Rafael Bojalil<sup>3</sup>, Gladis Fragoso<sup>1</sup> and Edda Sciutto<sup>1\*</sup>.

**CD4<sup>+</sup> TCRαβ T cells are critically involved in the control of experimental murine cysticercosis in C57BL/6J mice.**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, AP 70228, México, D.F., C.P. 04510, México<sup>1</sup>, Department of Medicine, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, M.D., 21205, USA<sup>2</sup>, and Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chavez”, Juan Badiano 1, Tlalpan, C.P. 14080, México, D.F., México<sup>3</sup>.

Running Title: T cells in murine cysticercosis.

\*Correponding author. Mailing address: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, México, D.F., C P. 04510, México. Phone: (525) 622-38-18. Fax (525) 622-33-69. E-mail address: [edda@servidor.unam.mx](mailto:edda@servidor.unam.mx)

Keywords: Cysticercosis, T cell receptors, Cytokines, Gene disrupted mice.

Abbreviations used in this paper: wild type, WT; *Taenia crassiceps* cysticercal antigens, *TcAg*, Gene Disrupted Mice, GDM.

**Abstract** Taenia crassiceps cysticerci develops in the peritoneal cavity of BALB/cAnN and, to a lesser extent, of C57BL/6J mice. The mechanisms involved in the immunity to this murine cysticercosis seem to be mainly mediated by T cells. To further insight into the mechanisms of cysticercal immunity, the susceptibility of mice deficient in different immunologically relevant genes was compared to that of the respective wild type (WT). Mice were classified according to the parasite load and survival after infection: highly susceptible (HS), with an increased parasite load and mortality rate ( $CD4^{-/-}$ ,  $TCR\alpha^{-/-}$ ,  $TCR\beta^{-/-}$ ,  $RAG1^{-/-}$ ), susceptible (S), with only increased parasite load ( $TCR\delta^{-/-}$ , BALB/cAnN), and relatively resistant (RR), with lower number of parasites ( $CD8^{-/-}$ , WT). Neither specific proliferative response nor Th2 cytokine or antibody responses were observed in HS mice. These data strongly suggest that  $CD4^{+}TCR\alpha\beta^{+}$  T cells have a critical role in the control of T. crassiceps murine cysticercosis

## Introduction

Taenia crassiceps cysticerci cause a chronic infection in laboratory animals such as mice (Freeman, 1962 and Smith et al. 1972) and rats (Blair et al. 1976). It can be experimentally maintained in the peritoneal cavity of mice, where cysticerci reproduce by budding, and where they can be harvested and individually counted to estimate how susceptible different strains are (Sciutto et al. 1991; Fragoso et al. 1996). T. crassiceps cysticercosis has been used as a suitable experimental model to study the participation of immunologic (Robinson et al. 1997; Terrazas et al. 1999 and Tonjes et al. 1999), genetic (Sciutto et al. 1991; Fragoso et al. 1996, 1998) and gender (Bojalil et al. 1993; Larralde et al. 1995) factors involved in resistance. The initial characterization of parasite restrictive immunity to T. crassiceps cysticercosis revealed the relevance of T cells (Hermanek et al. 1989; Sciutto et al. 1995), compared to the bulk of antibodies which do not clearly control the infection (Villa et al. 1996). More recently, evidence of an early Th1 response concomitant with a limited parasite growth, which progressively switched to a more permissive Th2 response has been reported (Terrazas et al. 1998). Efforts have also been made to determine the role of TCR $\gamma\delta^+$  cells in the resistance to T. crassiceps infection (Tonjes et al. 1999). To further insight into the mechanisms of cysticercal immunity, we studied the immunological profile and resistance of different C57BL/6J gene disrupted mice (GDM). Specifically, we evaluated the role of CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$  and TCR $\gamma\delta$  in the control of the establishment and/or progression of the parasitosis.

## Materials and methods

### Mice

The following GDM strains on a C57BL/6J genetic background, and C57BL/6J WT of 6 to 8 weeks of age were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME): CD4<sup>-/-</sup> (C57BL/6-Cd4<sup>tm1Mak</sup>), CD8<sup>-/-</sup> (C57BL/6-Cd8a<sup>tm1Mak</sup>), TCRα<sup>-/-</sup> (C57BL/6J-Tcra<sup>tm1Mom</sup>), TCRβ<sup>-/-</sup> (C57BL/6J-Tcrb<sup>tm1Mom</sup>) TCRδ<sup>-/-</sup> (C57BL/6J-Tcrd<sup>tm1Mom</sup>) and RAG1<sup>-/-</sup> (C57BL/6J-Rag1<sup>tm1Mom</sup>). Female BALB/cAnN mice were obtained from The National Cancer Institute (Frederick, MD). C57BL/6J WT (relative resistant) and BALB/cAnN (comparatively susceptible), which have been extensively tested (Sciutto et al. 1991; Fragoso et al. 1996) in their susceptibility to T. crassiceps were included in each experiment as controls. All mice were housed at The Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, MD) animal facilities in microisolators supplied with sterile food and water under pathogen-free conditions

### Parasites and Infection

The ORF strain of Taenia crassiceps (Zeder 1800) Rudolphi 1810, isolated by Freeman, 1962 and supplied by B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany), has been maintained by serial intraperitoneal passage in BALB/cAnN female mice for 15 years, at the Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM. Parasites for infection were harvested from the peritoneal cavity of mice, 1 to 2 months after inoculation of 10 cysticerci per mouse. Parasites were obtained under sterile conditions and tested for the presence of bacterial and fungi contaminants. Groups of 7 to 8 mice were injected intraperitoneally with 10 small (2 mm in diameter), non-budding T. crassiceps larvae suspended in phosphate-buffered saline (PBS). Thirty days after

infection, mice were sacrificed and cysts inside the peritoneal cavity were counted. The spleen of each mouse was removed to obtain splenocytes for proliferation assays.

### **Preparation of *Taenia crassiceps* cysticercal antigens (TcAg)**

Soluble antigens were recovered from *T. crassiceps* cysticerci by the procedure described by Toledo et al. 1999. Briefly, cysticerci recovered 1-2 months after infection were collected and extensively washed in ice-cold PBS. Cysticerci were then suspended in a minimal amount of buffer and centrifuged at 25,000 rpm for 60 min at 4 °C. The supernatant, which included the mixture of soluble *T. crassiceps* antigens (TcAg), was recovered. Supernatants were filter-sterilized and protein concentration was determined by the Lowry assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Aliquots were stored at -20 °C until use.

### **Proliferation assays**

Thirty days after infection spleen cells were obtained and cultured in RPMI-1640 supplemented with L-glutamine (0.2 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), fungizone (0.25 µg/ml), non-essential amino acids (0.01 mM), 2-mercaptoethanol (0.05 mM) and fetal bovine serum (10%). Cells were cultured in supplemented medium in the absence or presence of TcAg (10 µg/ml) or concanavalin A (5 µg/ml) at 37°C in CO<sub>2</sub> humidified atmosphere, in 96-well flat-bottomed microtiter plates (200 µl/well at a concentration of 1 x 10<sup>6</sup> cells/ml). After 72 h, cultured cells were either pulsed (1 µCi per well) for 18h with [*methyl*-<sup>3</sup>H] thymidine (Amersham Life Science, Little Chalfont, England), or centrifuged and the supernatants collected, aliquoted and stored at -20 °C to measure cytokines. Pulsed cells were harvested and the incorporated label was measured by counting in a Model 1205 β-plate spectrometer (Wallac) All assays were performed by triplicate in all mice that survived after 30 days of infection

### **Assessment of cytokine production in infected mice**

Previously described ELISA protocols (Terrazas et al. 1999) were used to measure the following cytokines: IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, and IL-10 in culture supernatants from TcAg stimulated spleen cells of infected and non-infected WT mice, as well as from infected GDM. All monoclonal antibodies and recombinant cytokines were from Pharmingen (San Diego, CA).

### **Isotype antibodies detection by ELISA**

Antibody titers in the sera of infected animals were assessed by indirect ELISA using TcAg as the source of antigen. The technique was essentially that described by Terrazas et al. 1998, with minor modifications. Briefly, after incubation of 100  $\mu$ l per well of TcAg (1  $\mu$ g/ml) overnight at 4°C, the wells were washed and incubated with 100  $\mu$ l of mouse sera diluted in PBS-Tween 1:100 for 60 min at 37°C. Antibodies were detected with 100  $\mu$ l of the biotinylated anti-Igs (biotin-conjugated anti-IgG, anti IgE, anti-IgM, anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, Sigma Chemical Co. St Louis, MO) diluted to optimum concentration (1:2000) and incubated for 45 min at 37 °C. Bound anti-isotypes were detected using streptoavidin-peroxidase (1:2000) during 30 min at 37 °C. TMB (3,5'-5,5'-Tetramethylbenzidine) was used as substrate (Sigma, 5mg/ml). The color reaction was stopped using 50  $\mu$ l of 0.2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and absorbance values were measured at 450 nm in an ELISA reader (Human GmbH, Humareader, Model 2106)

### **Statistical analysis.**

The statistical significance of number of cysticerci was calculated with the non-parametrical Mann Whitney U-test. The statistical significance of the difference between mean values of OD in ELISA and <sup>3</sup>H-TdR incorporation in cell proliferation assays was obtained with the Welch's unpaired test. Statistical analyses were performed with the INSTAT program (Graph Pad, San Diego, CA). Differences were considered significant when P values were less than 0.05.

## Results

### Mortality of Taenia crassiceps infected RAG-1<sup>-/-</sup>, CD4<sup>-/-</sup>, TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> and

#### TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> Gene Disrupted Mice

To examine the role of different T cell subsets in controlling cysticercosis infection, T cell deficient and WT mice were infected and survival of infection was calculated every day during 30 days. As Fig. 1 shows, at day 21 of infection RAG-1<sup>-/-</sup>, CD4<sup>-/-</sup>, TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> and TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> mice displayed significant mortality. At the end of the experiment (day 30), 57.2 % of CD4<sup>-/-</sup> and RAG-1<sup>-/-</sup>, 42.9 % of TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> and 28.6 % of TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> had died. None of the other mice (TCR $\delta$ <sup>-/-</sup>, CD8<sup>-/-</sup>, BALB/cAnN and WT infected mice) died before day 30 of infection. These findings indicate that the absence of CD4, TCR $\alpha$  or TCR $\beta$  molecules can lead to a lethal T. crassiceps infection.

#### Increased parasite load in CD4<sup>-/-</sup>, TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> and TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> Gene Disrupted Mice

In surviving mice, the parasite load at day 30 of infection was determined in two independent experiments. Fig 2 shows the individual number of cysticerci recovered from the peritoneal cavity. Variations in parasite load among experiments have been attributed to differences in the infectivity of each inoculated parasite, and to the specific experimental conditions of each host. Considering this, Fig 2 (A and B) included the respective WT control as well as the innate susceptible BALB/cAnN mice. As shown in Fig 2A, mice with homozygous disruption of CD4, TCR $\beta$ , TCR $\delta$  or TCR $\alpha$  genes exhibited a significantly higher number of cysticerci than the C57BL/6J WT mice. The parasite load recovered in TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> ( $195 \pm 41.9$ ) mice was similar to that observed in TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> ( $292.29 \pm 31.99$ ) and was statistically higher than in the WT ( $97 \pm 58.06$ ) strain. Parasite load in TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> ( $499.20 \pm 32.60$ ) and CD4<sup>-/-</sup> ( $547 \pm 85.11$ ) GDM did not

statistically differ ( $P > 0.05$ ) from that determined in susceptible BALB/cAnN mice ( $566.60 \pm 53.57$ ) (Fig. 2A). Fig. 2B shows that RAG-1<sup>-/-</sup> ( $433.33 \pm 47.41$ ), did not statistically differ to respective BALB/cAnN mice ( $545.28 \pm 62.65$ ). Interestingly, the number of cysticerci recovered from CD8<sup>-/-</sup> ( $32.72 \pm 24.23$ ) GDM was not significantly different to that obtained from C57BL/6J WT mice ( $86.57 \pm 38.62$ ). These findings suggest that CD4<sup>+</sup>/TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T cells, but not CD8<sup>+</sup> T cells, are the main effectors in the control of the T. crassiceps infection.

### **Proliferative response of splenocytes induced by T. crassiceps antigens**

To investigate the immune reactivity against T. crassiceps, in infected WT and GDM, the proliferation of their splenocytes in response to TcAg was assessed. As expected infected WT mice displayed an increased proliferative response to TcAg (Fig.3). By contrast, no significant increased proliferative response to TcAg was observed in HS (CD4<sup>-/-</sup>, TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> and RAG-1<sup>-/-</sup>) as well as in non-infected WT mice. On the other hand a significant rise in the proliferative response to TcAg was observed in splenocytes from S TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> (Fig. 3A) and RR CD8<sup>-/-</sup> (Fig. 3B). Interestingly, cells from infected mice, mainly those from WT, TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> and CD8<sup>-/-</sup> showed a significant proliferation in the absence of stimulus. Finally, all infected WT and GDM showed an increased proliferative response to concanavalin A, except TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> in which no proliferative response was observed (data not shown)

### **Cytokine production**

In order to determine the profile of cytokine production in spleen cells from T. crassiceps infected GDM and WT mice, the levels of IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- $\gamma$  were measured by ELISA in cell culture supernatants from TcAg stimulated splenocytes. Infection of WT mice

induced a general increase in cytokines production; up to 10 times of the Th1 cytokines IL-2 and IFN- $\gamma$  and Th2 cytokine IL-10 as well as smaller but significant increase in the Th2 cytokine IL-4 (Fig 4). Similarly, CD8<sup>-/-</sup> mice exhibited high levels in Th1 cytokines (IL-2 and INF- $\gamma$ ) and even higher levels of Th2 (IL-4, and IL-10) cytokines than infected WT mice. TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> mice also had similar levels of Th1 cytokines and IL-10 as infected WT mice, but they exhibited low levels in IL-4 similar as those of non-infected mice. In TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> and CD4<sup>-/-</sup> mice no increase in IL-4 cytokine was detected with respect to infected WT mice. Interestingly, CD4<sup>-/-</sup> and TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup> GDM showed a slight increase in IL-2 similar or in a lesser extent than WT infected mice.

### **Antibody production**

In order to assess the possible role of humoral immune response in T. crassiceps infection the specific antibodies (IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgM, IgE) produced by GDM and WT mice after 30 days of infection were determined by ELISA. Fig. 5 shows that neither IgG nor IgM anticysticercal antibodies were detected in the HS CD4<sup>-/-</sup>, TCR $\alpha$ <sup>-/-</sup>, TCR $\beta$ <sup>-/-</sup> and RAG-1<sup>-/-</sup> GDM. By contrast, increased levels of IgG, IgM, and IgG<sub>1</sub> antibodies were found in the resistant WT and CD8<sup>-/-</sup> mice, as well as in the TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> mice, albeit to a lesser extent. Almost no IgG<sub>2a</sub> and only low levels of IgE were observed in all infected GDM and WT mice (data not shown).

## Discussion

This study clearly establishes the relevance of certain T cell subsets in the control of experimental murine cysticercosis and in the survival of the host. In fact, RAG1<sup>-/-</sup> mice, which have no mature T or B cells owing to their inability to initiate TCR VDJ gene rearrangement (Yeung et al. 1993), exhibited high susceptible (HS) phenotype. Our results also show that the absence of CD4<sup>+</sup> or TCRαβ<sup>+</sup> cells dramatically alters the host response to Taenia crassiceps infection. CD4<sup>+</sup> and TCRαβ<sup>+</sup> are not only involved in controlling the parasite load after the intraperitoneal infection with T. crassiceps cysticerci, but their absence leads to significant mortality (28 to 57%). A phenomenon that is not observed in the innate susceptible mice at day 30 of infection. It is very likely that death is caused by T. crassiceps infection, considering that mice were maintained in pathogen-free conditions, where no opportunistic infection occurs. Thus, two different parameters are proposed here to classify mice according to their susceptibility to T. crassiceps infection: survival and parasite load 30 days after infection. Considering this, CD4<sup>-/-</sup>, TCRα<sup>-/-</sup>, TCRβ<sup>-/-</sup> and RAG1<sup>-/-</sup> mice were classified as HS, TCRδ<sup>-/-</sup> and BALB/cAnN mice, susceptible (S) and CD8<sup>-/-</sup> and C57BL/6J strains relatively resistant (RR). Interestingly, mortality was observed in those GDM that were unable to develop an antigen-specific cellular response and antibody production. Although the cause of mice death remains to be determined, it seems evident that this phenomenon is not related to parasite load, since BALB/cAnN mice showed a high number of cysticerci but not mortality. In addition we have not observed significant mortality in hundreds of heavily infected mice of different strains (Sciutto et al. 1991) It is possible that *T. crassiceps* release different toxic soluble factors that are not neutralized in the HS strain mice. In this regard, it has been previously reported that cestodes release products which down-regulate the host response (Arechavaleta et al 1988, Spolski et al. 2000) and kill T cells *in vitro* (Molinari et al 2000, O'connell et al 2000) Thus, it is possible

that these soluble factors affect different cells and tissues, accounting for mice death. It is also feasible that those parasite products can only be neutralized by immunocompetent hosts likely through the antibodies response. In agreement with this hypothesis,  $CD4^{-/-}$ ,  $TCR\alpha^{-/-}$ ,  $TCR\beta^{-/-}$  GDM develop a similar parasite load than susceptible BALB/cAnN mice, but in contrast they do not develop a significant antibody response after infection. Further studies are needed to confirm the relevance of neutralizing antibodies in host survival.

Results also show that  $TCR\gamma\delta^{+}$  cells do not play a crucial role in mechanisms leading to mortality but contribute to the control of parasite growth at 30 days of infection. Similar experiments have been done by Toenjes et al. 1999, who showed no differences between  $TCR\delta^{-/-}$  KO mice and the respective WT mice in their parasite load later during infection (52 days). These differences are not unexpected since it has been previously reported that mice strains that exhibit differences in susceptibility early during infection became equally susceptible later, harboring a high number of parasites.

The high parasite load observed in  $TCR\beta^{-/-}$  with respect to that seen in  $TCR\alpha^{-/-}$  GDM is of interest. It has been described that thymocyte differentiation in  $TCR\beta^{-/-}$  is quite different than in  $TCR\alpha^{-/-}$  GDM (Dianda et al. 1996). In fact,  $TCR\beta$  gene rearrangement or expression is critical for the differentiation of  $CD4^{-}CD8^{-}$  thymocytes to  $CD4^{+}CD8^{+}$ , while  $TCR\alpha$  seems to be irrelevant in this process (Mombaerts et al. 1992). Thus, differences in the recovered parasite load among these mice could be due to  $CD4^{+}CD8^{-}TCR\beta^{+}$  cells that are able to migrate to the periphery in the  $TCR\alpha^{-/-}$  mice. These  $CD4^{+}CD8^{-}TCR\alpha^{-}\beta^{+}$  cells show many of the physiologic characteristics of conventional T lymphocytes and may limit the severity of viral infections, perhaps via cytokine-mediated effector mechanisms (Eichelenberger et al. 1995). In addition,  $CD4^{+}CD8^{-}$  T cells, highly represented in  $TCR\alpha^{-/-}$  mice

have revealed to maintain effector functions (Sasahara et al. 1994; Nam et al. 2000), and could also be involved in the control of the parasitosis. Although in  $\text{TRC}\beta^{-/-}$  GDM,  $\text{TCR}\gamma\delta$  could be available, these cells can not control the parasitosis by themselves.

Another finding that merits comments is that, with the exception of  $\text{TCR}\beta^{-/-}$  and  $\text{RAG-1}^{-/-}$ , all mice tested exhibited increased Th1 (IL-2/INF $\gamma$ ) cytokines levels. On the other hand, Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) are importantly increased in the RR (WT and  $\text{CD8}^{-/-}$  mice), lightly increased in the susceptible  $\text{TCR}\delta^{-/-}$  GDM and almost not modified in the HS ( $\text{CD4}^{-/-}$ ,  $\text{TCR}\beta^{-/-}$ ,  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  mice), all compared to non-infected mice. These results suggest that in these C57BL/6J GDM the absence of a Th2 type response is associated to conditions of maximum susceptibility 30 days after infection. In contrast to these results, in BALB/cAnN mice it has been shown that at 30 days of infection a Th2 response which progress with an important increment in the parasite load (Terrazas et al. 1999). On the basis of these results, it has been proposed that the Th2 response is inefficient in controlling the parasite growth. It is possible that the different genetic background (B6) of mice employed in these studies accounts for these differences. Considering these results, further studies will be necessary to further elucidate the relevance of cytokine profile in the control of the parasitosis.

It should be emphasized that  $\text{CD8}^{-/-}$  GDM were as resistant as WT mice and induced a similar immunological profile in terms of cytokines, antibody and levels of specific TcAg splenocyte proliferation. These data clearly demonstrate that  $\text{CD8}^{+}$  cells do not play a dominant role in controlling the parasite load and survival of mice.

In summary, our study demonstrates the importance of  $\text{CD4}^{+}\text{TCR}\alpha\beta^{+}$  as well as the relative role of  $\text{TCR}\gamma\delta^{+}$  cells in controlling the infection by *T. crassiceps* cysticerci. These findings help to establish the role of the immune response in controlling *T. crassiceps* infection.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was partially supported by DGAPA (212798), CONACyT (G25955m), and Fundación Miguel Alemán. The authors thank Isabel Perez Montfort for English revision. The authors want to thanks Dr. Roberto González Amaro and Dr. Guillermo Alfaro for carefully revision of this manuscript.

## REFERENCES.

- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P (1988) A Taenia solium metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84: 117-122
- Blair LS, Campell WC (1976) The rat (*Rattus norvegicus*) as laboratory host for the metacestode of Taenia crassiceps. *J Parasitol* 62: 163-164.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C (1993) Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (Taenia crassiceps). *J Parasitol* 79: 384-389.
- Dianda L, Gulbranson-Judge A, Pao W, Hayday AC, MacLennan IC, Owen NJ (1996) Germinal center formation in mice lacking alpha beta T cells. *Eur J Immunol* 26: 1603-1607.
- Eichelenberger M, McMickle A, Blackman M, Mombaerts P, Tonegawa S, Doherty PC (1995) Functional analysis of the TCR $\alpha$ - $\beta$ <sup>+</sup> cells that accumulate in the Pneumonic lung of influenza virus infected TCR- $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 154: 1569-1576.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciutto E (1998) Increased Resistance to Taenia crassiceps Murine Cysticercosis in Qa-2 Transgenic Mice. *Infect Immun* 66. 760-764.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T, Sciutto E (1996) Genetic control of susceptibility to Taenia crassiceps cysticercosis. *Parasitology* 112: 119-124.
- Freeman RS (1962) Studies on the biology of Taenia crassiceps (Zender, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool* 40: 969-990.
- Hermanek J, Prokopic J (1989) Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with Taenia crassiceps (Zeder, 1800) in ICR mice *Folia Parasitol (Praha)* 36: 331-340
- Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC (1995) Sex hormone changes

- induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine Taenia crassiceps cysticercosis. *J Steroid Biochem Molec Biol* 52: 575-580.
- Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio MV, Baing S, Tato P (2000) Taenia solium: A cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol* 94: 133-142.
- Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Lacomini J, Iohara S, Lafaille JJ, Wang L, Ichikawa Y, Jaenisch R, Hooper ML, Tonogawa S (1992) Mutations in T cell antigen receptor genes  $\alpha$  and  $\beta$  block thymocyte development at different stages. *Nature* 360: 225-231.
- Nam KH, Akari H, Terao K, Shibata H, Kamura S, Yoshikawa Y (2000) Peripheral blood extrathymic CD4(+)CD8(+) T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4(+)CD8(+) T cells in cynomolgus monkeys. *Int Immunol* 12: 1095-1103.
- O'connell KM, Rogan MT (2000) Apoptosis in human Jurkat T cells after culture with live Taenia crassiceps cysticerci in vitro. *Parasitology* 120: 649-655.
- Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White AC Jr (1997) Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 65: 2925-2931.
- Sasahara T, Tamauchi H, Ikewaki N, Kubota K (1994) Unique properties of a cytotoxic CD4+CD8+ intraepithelial T cell line established from the mouse intestinal epithelium. *Microbiol Immunol* 38: 191-199.
- Sciutto E, Fragoso G, Baca M, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E (1995) Depressed T cell proliferation associated with susceptibility to experimental Taenia crassiceps infection. *Infect Immun* 63: 2277-2281
- Sciutto E, Fragoso G, Diaz ML, Valdez F, Montoya RM, Gozensky T, Lomeli C, Larralde C (1991) Murine Taenia crassiceps cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 77: 243-246

- Smith KJ, Esch GW, Kuhn RE (1972) Growth and development of larval Taenia crassiceps (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *Int J Parasitol* 2: 261-263.
- Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE (2000) Parasite-secreted products regulated the host response to larval Taenia crassiceps. *Parasite Immunol* 22: 297-305.
- Terrazas LI, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo R, Larralde C (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by Taenia crassiceps. *Parasitol Res* 85: 135-141.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (Taenia crassiceps). *J Parasitol* 84: 74-81.
- Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE (1999) The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval Taenia crassiceps is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 118: 623-633.
- Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn KE (1999) Gamma delta T cells do not play a major role in controlling infection in experimental cysticercosis. *Parasitology* 119: 413-418.
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Kubli-Garfias C, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E (1999) Towards a Taenia solium cysticercosis vaccine: an epitope shared by Taenia crassiceps and Taenia solium protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 67: 2522-2530.
- Villa OF, Kuhn RE (1996) Mice infected with the larval of Taenia crassiceps exhibit a Th-2 immune response with concomitant anergy and down regulation of Th-1 associated phenomena. *Parasitology* 112: 561-570.

Yeung RSM, Penninger J, Mak TW (1993) Genetically modified animals and immunodeficiency. *Curr Opin Immunol* 5: 585-594.

## FIGURE LEGENDS.

Fig 1. C57BL/6J GDM and WT mice were challenged with 10 cysticerci of Taenia crassiceps and observed daily. Mice surviving 30 days after infection were determined.

Fig 2. Individual number of parasites recovered from infected mice 30 days after intraperitoneal infection with 10 T. crassiceps cysticerci. The bars represent mean parasite number for each experimental group. The number of cysticerci found in GDM was statistically higher than in WT mice (\*P < 0.05), except for CD8<sup>+/+</sup>.

Fig 3. Splenocytes from T. crassiceps infected mice were stimulated *in vitro* with TcAg (10µg/ml). The bars represent mean ± standard deviation (cpm) of 3 to 7 individual mice without (□) or with TcAg (■). The proliferative response of cells from non-infected WT mice was also included. \* Indicates significantly higher values in the absence of TcAg *in vitro*, (P < 0.05) in the same group of mice.

Fig 4. TcAg – stimulated cytokine production by spleen cells from infected mice determined in the collected culture supernatants obtained 48h-post stimulation, (measured by ELISA). Bars represent mean ± SE for 3 to 7 mice per group. Data are representative of two different experiments performed in duplicate. \* Indicates the values for GDM infected mice significantly different from values of infected WT mice (P < 0.05).

Fig 5. Level of specific T. crassiceps IgG, IgM, and IgG<sub>1</sub> isotypes measured by ELISA using TcAg as source of antigen. Bars represent mean  $\pm$  SE for 3 to 7 mice per group at day 30 of infection. Data are representative of two experiments performed in duplicate. \*Indicates levels statistically higher than in WT mice ( $P < 0.05$ ).

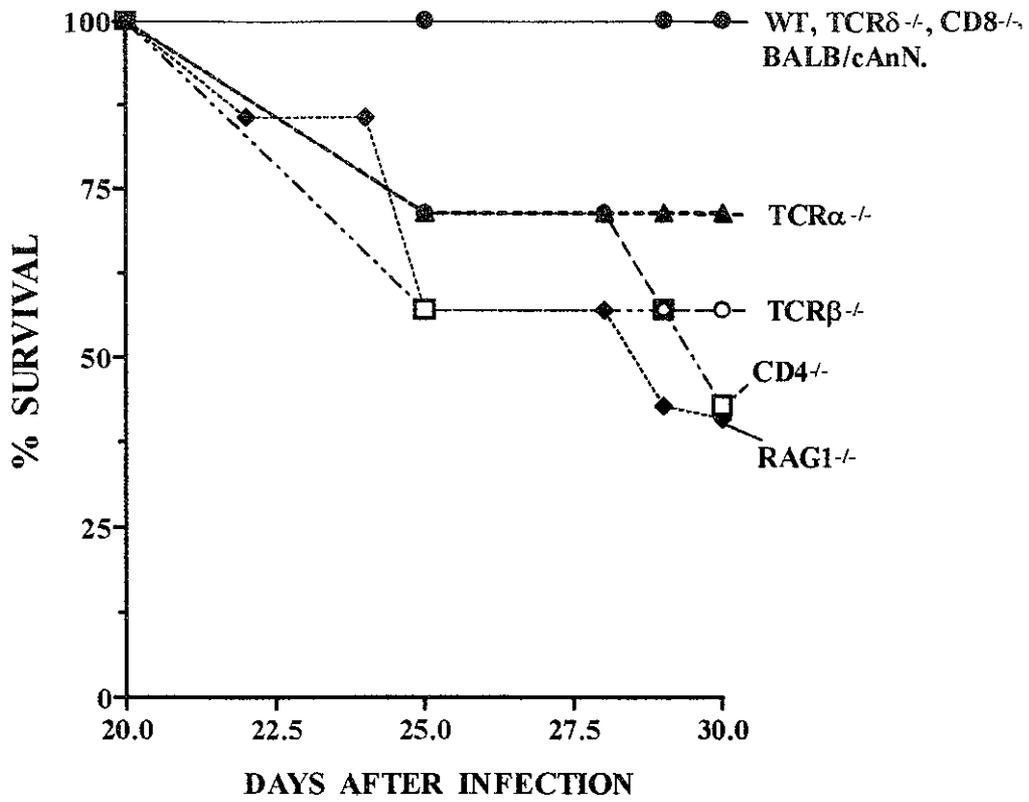


Fig. 1

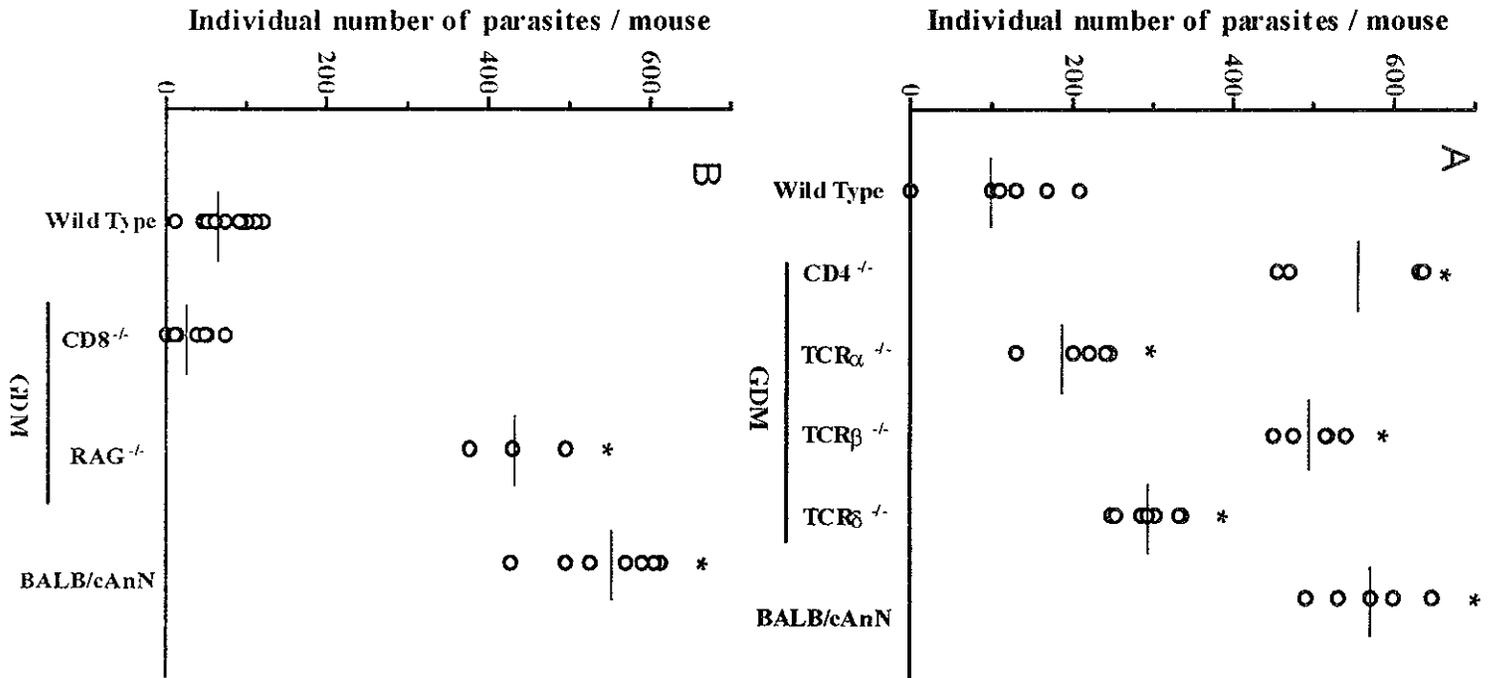


Fig. 2



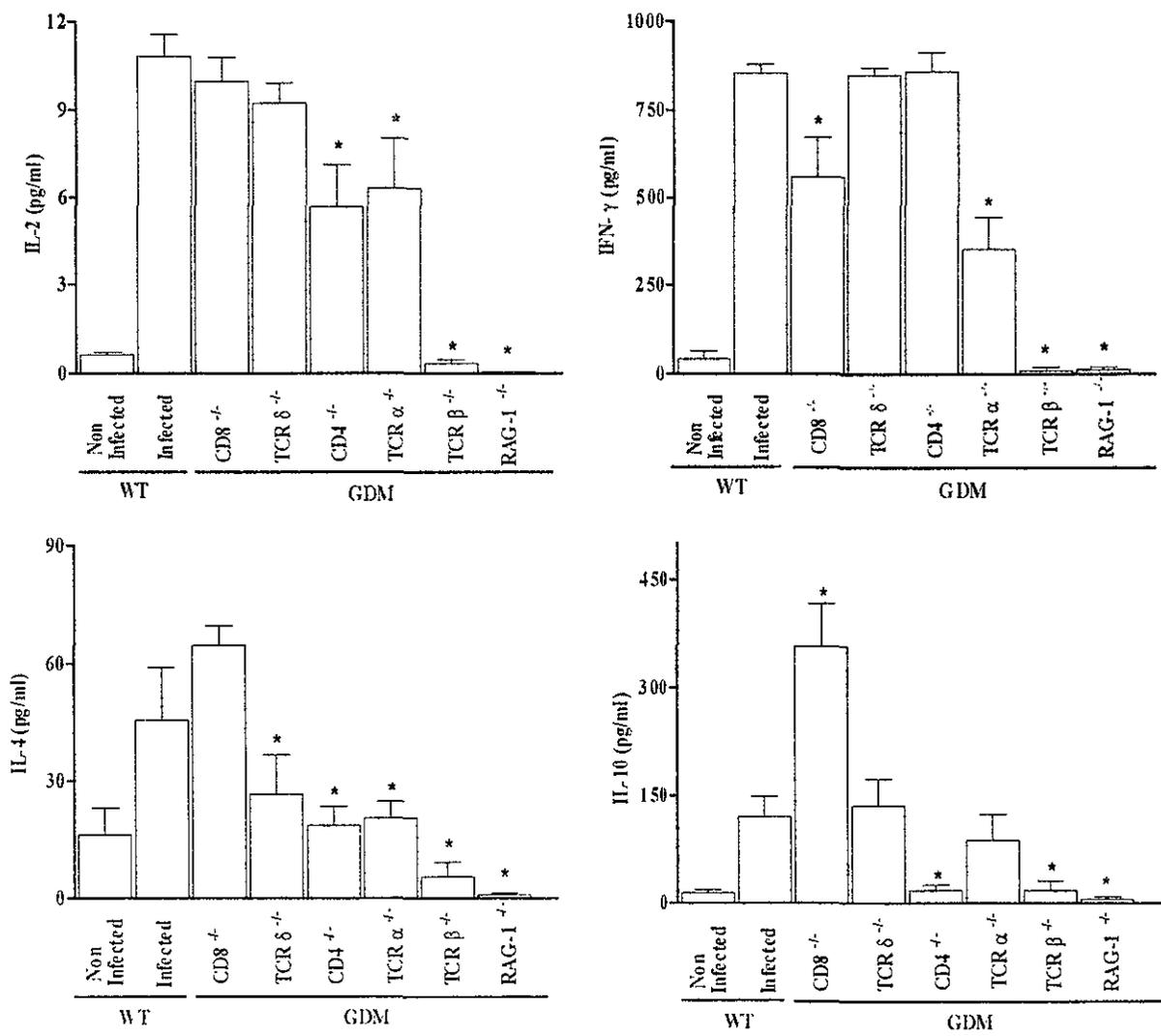
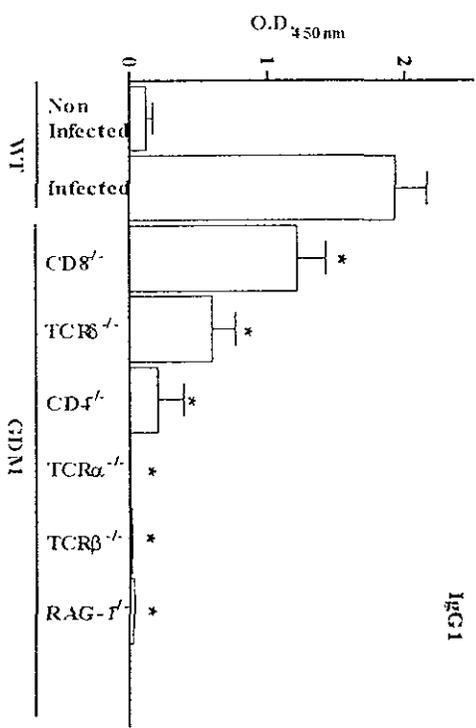
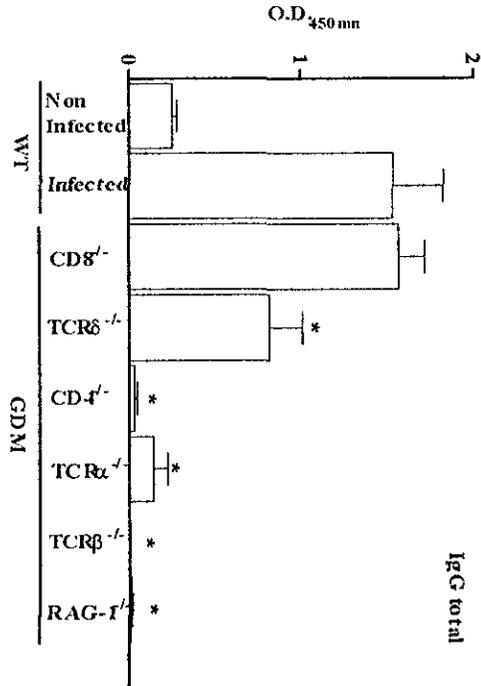


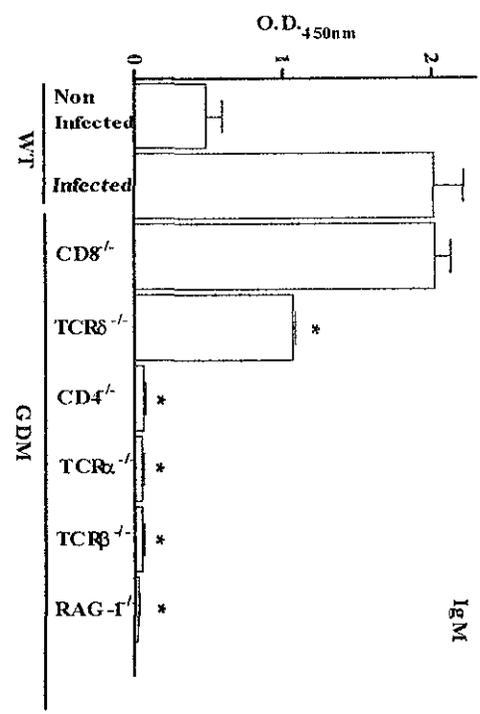
Fig. 4.



IgG1



IgG total



IgM

Fig. 5.

## RESPUESTA INMUNE DIFERENCIAL ENTRE RATONES BALB/c RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A LA INFECCIÓN POR *T. crassiceps*.

### Incremento de la resistencia en ratones quimeras.

Para determinar si las células de médula ósea de ratones resistentes BALB/cJ son capaces de conferir resistencia en contra de la parasitosis por *T. crassiceps*, se crearon ratones quimeras (histocompatibles) por irradiación, utilizando ratones BALB/cJ como donadores y BALB/cAnN como receptores. Como controles, se irradiaron ratones BALB/cJ y BALB/cAnN y se reconstituyeron con células de médula ósea provenientes de ratones BALB/cJ y BALB/cAnN respectivamente. La Figura 1 muestra el quimerismo en ratones BALB/cAnN irradiados y reconstituidos con células de BALB/cJ determinado por un análisis citofluorométrico (FACS), después de 30 días de infección. Como se muestra en la Figura 1C, el 28.6% de células CD3<sup>+</sup> Qa2<sup>+</sup> fueron encontradas en los ratones reconstituidos cJ→AnN, contra 36.7% encontradas en la quimera cJ→cJ (Fig. 1B) ó 2.6% en AnN→AnN (Fig, 1A). Esto nos indica que las células de médula ósea del ratón donador, efectivamente lograron instalarse, y madurar en los ratones receptores irradiados. Los ratones quimera se infectaron y después de 60 días de infección, se sacrificaron y se evaluó la carga parasitaria en cada uno de las quimeras, la Figura 2 muestra el promedio de la carga parasitaria en cada grupos de quimeras. Las quimeras cJ→AnN exhiben una menor carga parasitaria en comparación con la quimera AnN→AnN ( $P < 0.05$ ), pero no difiere de las quimeras cJ→cJ ( $P > 0.05$ ).

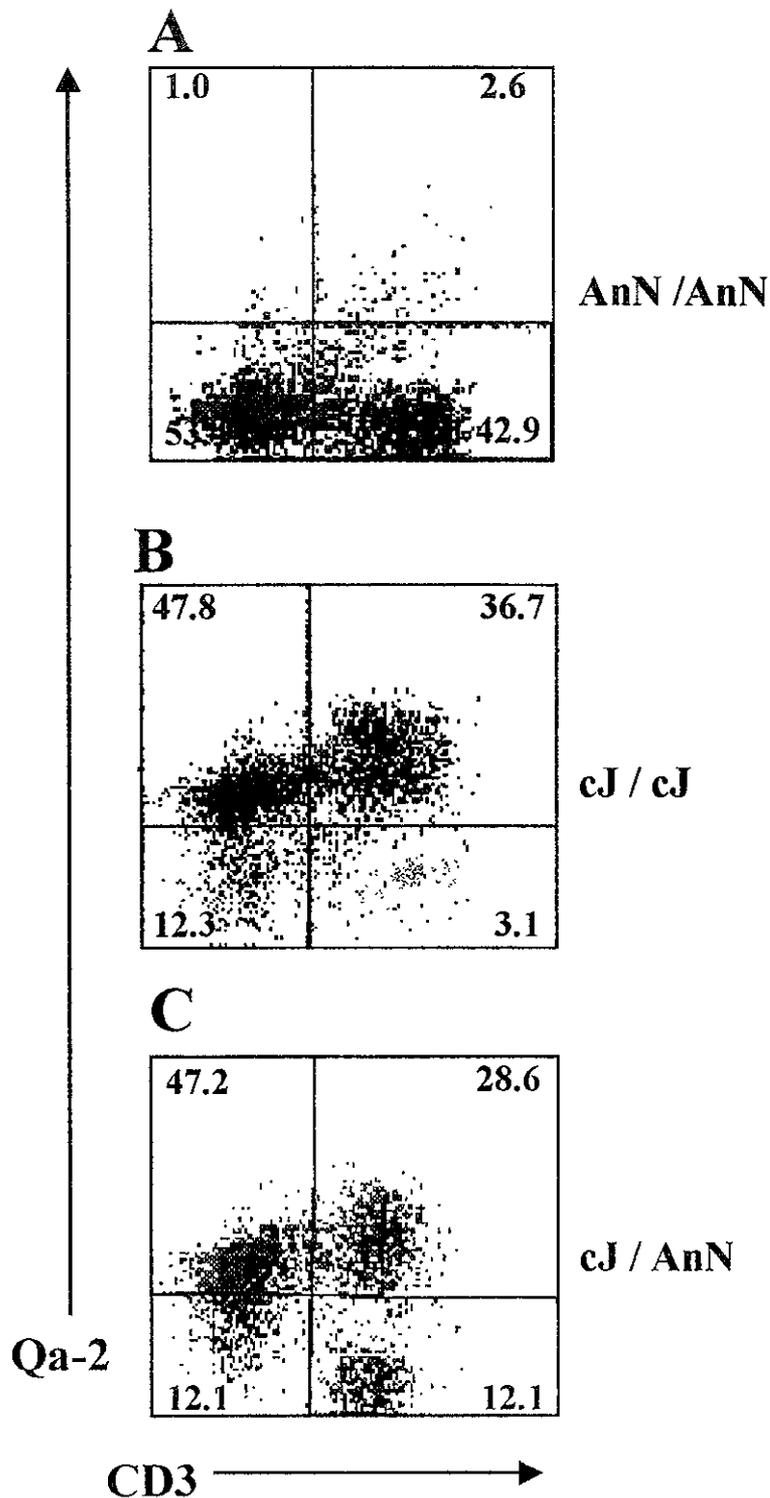


Figura 1. Determinación del quimerismo, utilizando linfocitos de sangre periférica de ratones irradiados y reconstituidos con células de médula ósea. La expresión de Qa-2 y CD3 fue evaluada por citometría de flujo en los siguientes quimeras: A, AnN/AnN; B, cJ/cJ y C, cJ/AnN.

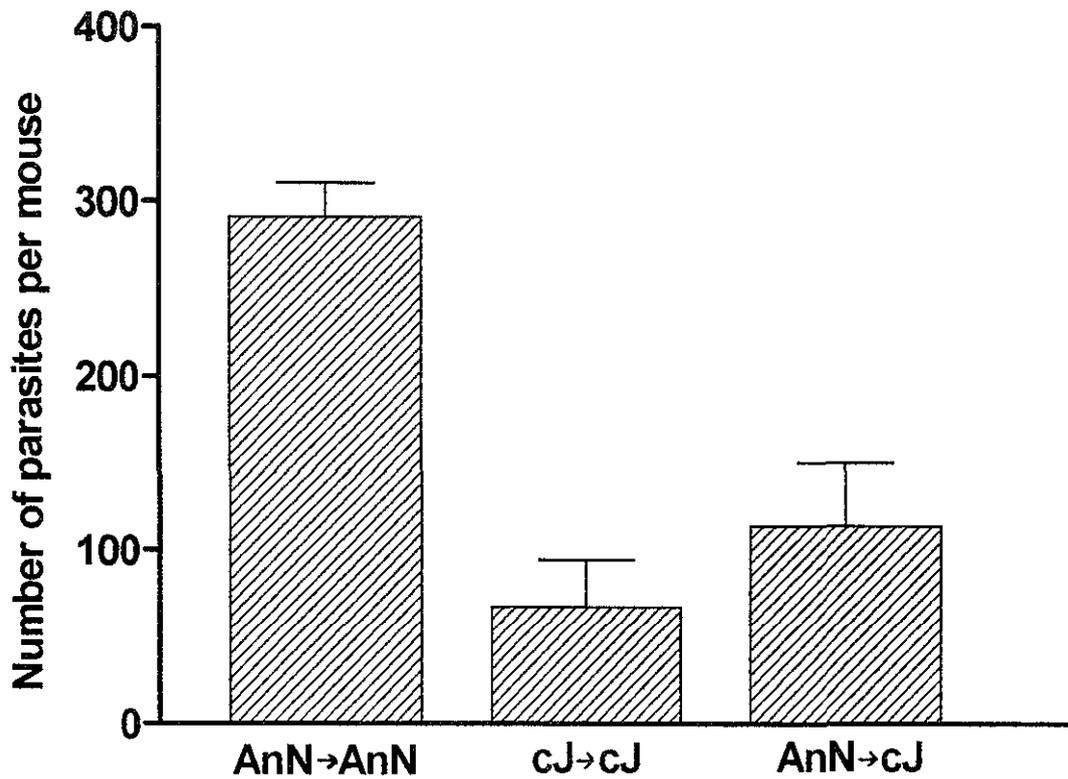


Figura 2 Evaluación de la carga parasitaria en ratones quimeras después de 60 días de infección con cisticercos de *T. crassiceps*. Las barras representan la media aritmética  $\pm$  la desviación estándar del número de parásitos obtenidos de grupos de 5-8 ratones (cJ→AnN) y controles (cJ→cJ, AnN→AnN). Diferencias significativas fueron encontradas entre las quimeras AnN→AnN y cJ→cJ ( $p < 0.01$ ), y entre AnN→AnN y cJ→AnN ( $p < 0.05$ ).

## **Proliferación de linfocitos T y producción de citocinas en ratones resistentes y susceptibles.**

Debido a que los resultados mostrados anteriormente (Fig. 1), y previas evidencias que indican la relevancia de las células T en la resistencia a la cisticercosis por *T. crassiceps*, evaluamos la respuesta celular in vitro de los ratones BALB/cJ y BALB/cAnN. Una inhibición de la respuesta a Con A fue observada en esplenocitos de ratones BALB/cAnN después de 6 días de infección, comprobando lo previamente reportado (Sciutto et al., 1995). En contraste, los ratones BALB/cJ, muestran una respuesta proliferativa con Con A, semejante a los ratones no infectados de ambas cepas (datos no mostrados). Interesantemente, la respuesta proliferativa específica con TcAg es mayor en ratones infectados BALB/cJ que en BALB/cAnN (Tabla I).

Con respecto a los niveles de citocinas producidas en los sobrenadantes de las células cultivadas y estimuladas específicamente con TcAg, se observó un incremento en la producción de IL-2 en ratones BALB/cJ ( $P=0.08$ ), mientras que niveles semejantes de las citocinas; IL-4, IL-10 e  $INF\gamma$  ( $P>0.05$ ) se detectaron en ambas cepas después de 6 días de infección (Tabla I). En sobrenadantes de células estimuladas con Con A, se detectaron niveles elevados de IL-2 e  $INF\gamma$ , tanto en BALB/cAnN como en BALB/cJ parasitados.

## **Evaluación de las subpoblaciones celulares en esplenocitos de ratones BALB/cJ y BALB/cAnN después de 6 días de infección.**

Para determinar si existe una subpoblación de linfocitos T que se activa específicamente durante la infección, evaluamos las subpoblaciones celulares  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $TCR\alpha\beta^+$  y  $TCR\gamma\delta^+$  por citometría de flujo. Los esplenocitos de ratones

**Tabla I. Estimulación *In vitro* de esplenocitos de ratones BALB/cAnN and BALB/cJ infectados durante 6 días con cisticercos de *Taenia crassiceps* y determinación de citocinas en sobrenadantes de cultivo.**

Cepa de ratón:	estímulo					
<u>BALB/cAnN</u>	con:	IS	IL-2	IFN $\gamma$	IL-4	IL-10
<i>No infectado</i>	ConA	65.40 $\pm$	139.4 $\pm$ 34.15	62.05 $\pm$ 7.44	60.1 $\pm$ 10.3	97.6 $\pm$ 18.9
	TcAg	1.08 $\pm$	15.7 $\pm$ 5.8	29.3 $\pm$ 7.8	27.4 $\pm$ 4.1	79.6 $\pm$ 12.7
<i>Infectado</i>	ConA	27.24 $\pm$	247.5 $\pm$ 21.9*	118.9 $\pm$ 23.25*	100.9 $\pm$ 20.9	128.5 $\pm$ 7.2
	TcAg	2.1 $\pm$ **	12.5 $\pm$ 5.0	29.9 $\pm$ 3.7	43.1 $\pm$ 20.4	113.2 $\pm$ 7.5
<u>BALB/cJ</u>						
<i>No infectado</i>	ConA	18.7 $\pm$	107.01 $\pm$ 16.2	51.4 $\pm$ 7.22	73.7 $\pm$ 17.3	95.7 $\pm$ 3.5
	TcAg	1.04 $\pm$	15.9 $\pm$ 4.2	23.1 $\pm$ 8.2	27.7 $\pm$ 3.2	107.7 $\pm$ 1.3
<i>Infectado</i>	ConA	13.5 $\pm$	244.9 $\pm$ 16.9*	205.7 $\pm$ 7.4*	163.6 $\pm$ 82.5*	103.3 $\pm$ 36.9
	TcAg	4.6 $\pm$ **	25.1 $\pm$ 5.7*	29.6 $\pm$ 5.3	83.6 $\pm$ 51.1	88.4 $\pm$ 17.3

Los datos muestran el índice de estimulación (IS)  $\pm$  desviación estándar de 3 ratones individuales, y las concentraciones (pg/ml)  $\pm$  desviación estándar de IL-2, INF-, IL-4 e IL-10. IS = cpm infectado/ cpm no infectado. (\*)  $P < 0.05$  ó (\*\*)  $P < 0.01$  por la prueba de ANOVA. Para comparar las muestras de ratones infectados con respecto a no infectados, se utilizó la prueba de Turkey.

BALB/cAnN infectados, muestran una pequeña pero significativa disminución en las subpoblaciones celulares CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y TCRαβ<sup>+</sup>, con respecto al ratón no infectado, mientras que estas mismas subpoblaciones no se modifican en la cepa BALB/cJ (Tabla II). La subpoblación celular de linfocitos TCRγδ<sup>+</sup>, no se modifica con la infección en los ratones BALB/cAnN (2.0 ± 0.6) y BALB/cJ (2.6 ± 0.5).

### **Determinación de las subpoblaciones de linfocitos T que expresan un TCR Vβ específico, después de 6 días de infección.**

Considerando la disminución en la subpoblación de células T TCRαβ<sup>+</sup> observada (Tabla II), se decidió evaluar si esta disminución era consecuencia de una cierta población de células que expresan un TCR Vβ específico, utilizamos un grupo de 13 anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de distintos TCR Vβ, los cuales cubren aproximadamente el 75% de la población total de células entre TCRαβ<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Las Tablas III y IV muestran las frecuencias de distribución de las 13 subpoblaciones Vβs entre CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> respectivamente, en esplenocitos de ratones resistentes y susceptibles, a los 6 días de infección. Interesantemente, se observó una disminución en el porcentaje de las subpoblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> ambos Vβ2<sup>+</sup>, en los esplenocitos de ratones BALB/cAnN (susceptibles) infectados, también se encontró una disminución en las subpoblaciones Vβ5, 7 y 9 CD4<sup>+</sup> pero de menor magnitud. El repertorio de las subpoblaciones de células T Vβ's, de ratones BALB/cJ no se modificó con la infección (Tablas III y IV). Finalmente, en la Figura 3 mostramos la reducción de las subpoblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que expresan el TCR Vβ2, en ratones BALB/cAnN a los 6 días de infección, detectado por citometría de flujo.

**Tabla II.** Porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos T, evaluados en esplenocitos de ratones resistentes y susceptibles infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps* durante 6 días.

	CD4+	CD8+	TCR $\alpha\beta$
<b>BALB/cAnN</b>			
No infectados	34.9 $\pm$ 0.7	16.5 $\pm$ 1.1	54.4 $\pm$ 0.15
Infectados	31.02 $\pm$ 2.5*	13.6 $\pm$ 0.8*	46.2 $\pm$ 0.70*
<b>BALB/cJ</b>			
No infectados	32.5 $\pm$ 1.7	15.4 $\pm$ 0.9	56.7 $\pm$ 0.80
Infectados	33.8 $\pm$ 1.2	16.3 $\pm$ 1.2	54.4 $\pm$ 1.30

Los datos representan la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de 3 a 5 ratones analizados individualmente. \*Diferencias entre ratones infectados y no infectados son diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ).

**Tabla III. Expresión diferencial de distintos TCRV $\beta$  en células CD4+, en esplenocitos de ratones susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (BALB/cJ) después de 6 días de infección con cisticercos de *Taenia crassiceps*.**

	BALB/cAnN		BALB/cJ	
	<u>No infectado</u>	<u>Infectado</u>	<u>No infectado</u>	<u>Infectado</u>
Porcentaje de células V $\beta$ + del total de células CD4+				
V $\beta$ 2	8.1 $\pm$ 0.4	3.3 $\pm$ 3.1*	7.5 $\pm$ 0.8	8.2 $\pm$ 0.6
V $\beta$ 3	3.1 $\pm$ 1.4	2.7 $\pm$ 1.5	3.0 $\pm$ 0.6	3.9 $\pm$ 0.7
V $\beta$ 4	7.0 $\pm$ 0.5	7.6 $\pm$ 0.9	7.6 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 1.5
V $\beta$ 5	1.3 $\pm$ 0.3	<b>0.3<math>\pm</math>0.05*</b>	1.3 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.05
V $\beta$ 6	11.3 $\pm$ 0.8	10.7 $\pm$ 0.7	11.3 $\pm$ 0.9	10.8 $\pm$ 0.9
V $\beta$ 7	2.8 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.4*	2.5 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 1.3
V $\beta$ 8	30.9 $\pm$ 1.9	29.9 $\pm$ 1.9	30.0 $\pm$ 1.9	29.9 $\pm$ 1.9
V $\beta$ 9	2.7 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.3*	2.9 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.7
V $\beta$ 10	6.7 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.8	6.9 $\pm$ 0.5	6.6 $\pm$ 0.6
V $\beta$ 11	2.4 $\pm$ 0.9	1.4 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 1.0
V $\beta$ 12	1.8 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.5	2.6 $\pm$ 1.1	1.6 $\pm$ 0.4
V $\beta$ 13	3.5 $\pm$ 0.3	2.6 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 1.3	3.2 $\pm$ 0.5
V $\beta$ 14	11.4 $\pm$ 2.1	9.4 $\pm$ 1.3	10.9 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.7

Los datos muestran la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de 3-5 ratones por grupo. Los resultados fueron calculados como en % de células con anti-CD4.

\*Diferencias entre ratones infectados y no infectados son significativas estadísticamente (P<0.05)

**Tabla IV. Expresión diferencial de distintos TCRV $\beta$  en células CD8+, en esplenocitos de ratones susceptibles (BALB/cAnN) y resistentes (BALB/cJ) después de 6 días de infección con cisticercos de *Taenia crassiceps*.**

	BALB/cAnN		BALB/cJ	
	<u>No infectado</u>	<u>Infectado</u>	<u>No infectado</u>	<u>Infectado</u>
Porcentaje de células V $\beta$ + del total de células CD8+				
V $\beta$ 2	8.7 $\pm$ 1.1	<b>4.4<math>\pm</math>0.5*</b>	8.2 $\pm$ 0.01	8.3 $\pm$ 0.6
V $\beta$ 3	3.6 $\pm$ 1.8	2.9 $\pm$ 1.2	3.8 $\pm$ 1.4	4.3 $\pm$ 0.6
V $\beta$ 4	8.2 $\pm$ 1.1	8.0 $\pm$ 0.4	7.2 $\pm$ 0.6	7.7 $\pm$ 1.8
V $\beta$ 5	1.9 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.8	2.9 $\pm$ 1.2
V $\beta$ 6	10.5 $\pm$ 2.4	9.9 $\pm$ 0.7	9.7 $\pm$ 1.4	10.9 $\pm$ 1.6
V $\beta$ 7	2.7 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 0.6	3.0 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 1.5
V $\beta$ 8	40.8 $\pm$ 4.0	38.4 $\pm$ 2.9	37.9 $\pm$ 3.0	34.1 $\pm$ 3.7
V $\beta$ 9	3.2 $\pm$ 0.8	3.3 $\pm$ 0.9	4.2 $\pm$ 1.3	3.8 $\pm$ 1.3
V $\beta$ 10	7.2 $\pm$ 0.5	7.2 $\pm$ 1.0	6.5 $\pm$ 1.4	6.7 $\pm$ 0.4
V $\beta$ 11	3.0 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.7	3.6 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 1.6
V $\beta$ 12	3.0 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 1.8	4.5 $\pm$ 1.6	4.4 $\pm$ 1.5
V $\beta$ 13	6.8 $\pm$ 0.7	6.1 $\pm$ 1.1	6.4 $\pm$ 1.6	6.1 $\pm$ 1.7
V $\beta$ 14	6.4 $\pm$ 1.2	5.4 $\pm$ 1.8	5.9 $\pm$ 1.0	7.6 $\pm$ 1.9

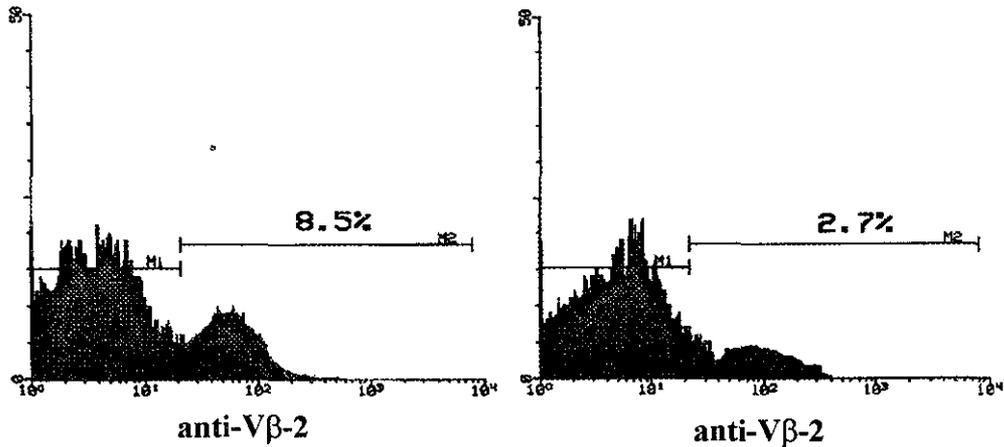
Los datos muestran la media aritmética  $\pm$  desviación estándar de 3-5 ratones por grupo. Los resultados fueron calculados como en % de células con anti-CD8.

\*Diferencias entre ratones infectados y no infectados son significativas estadísticamente (P<0.05).

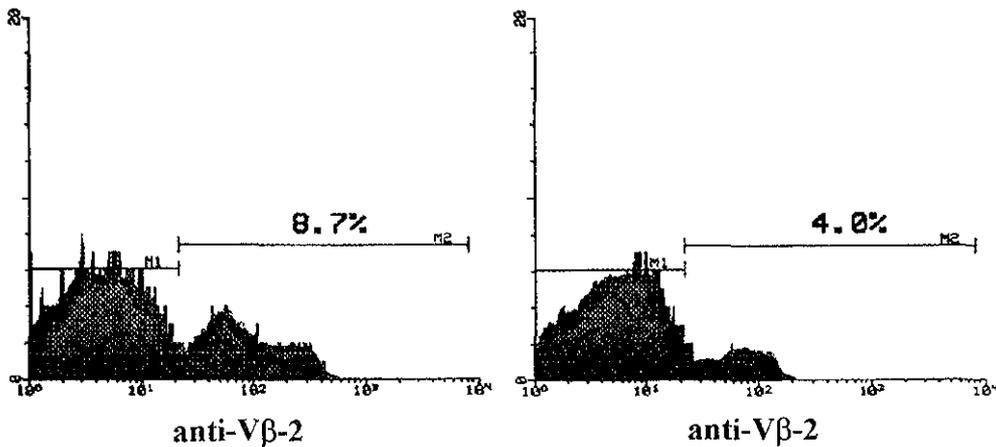
No Infectado

Infectado

A. Células CD4



B. Células CD8

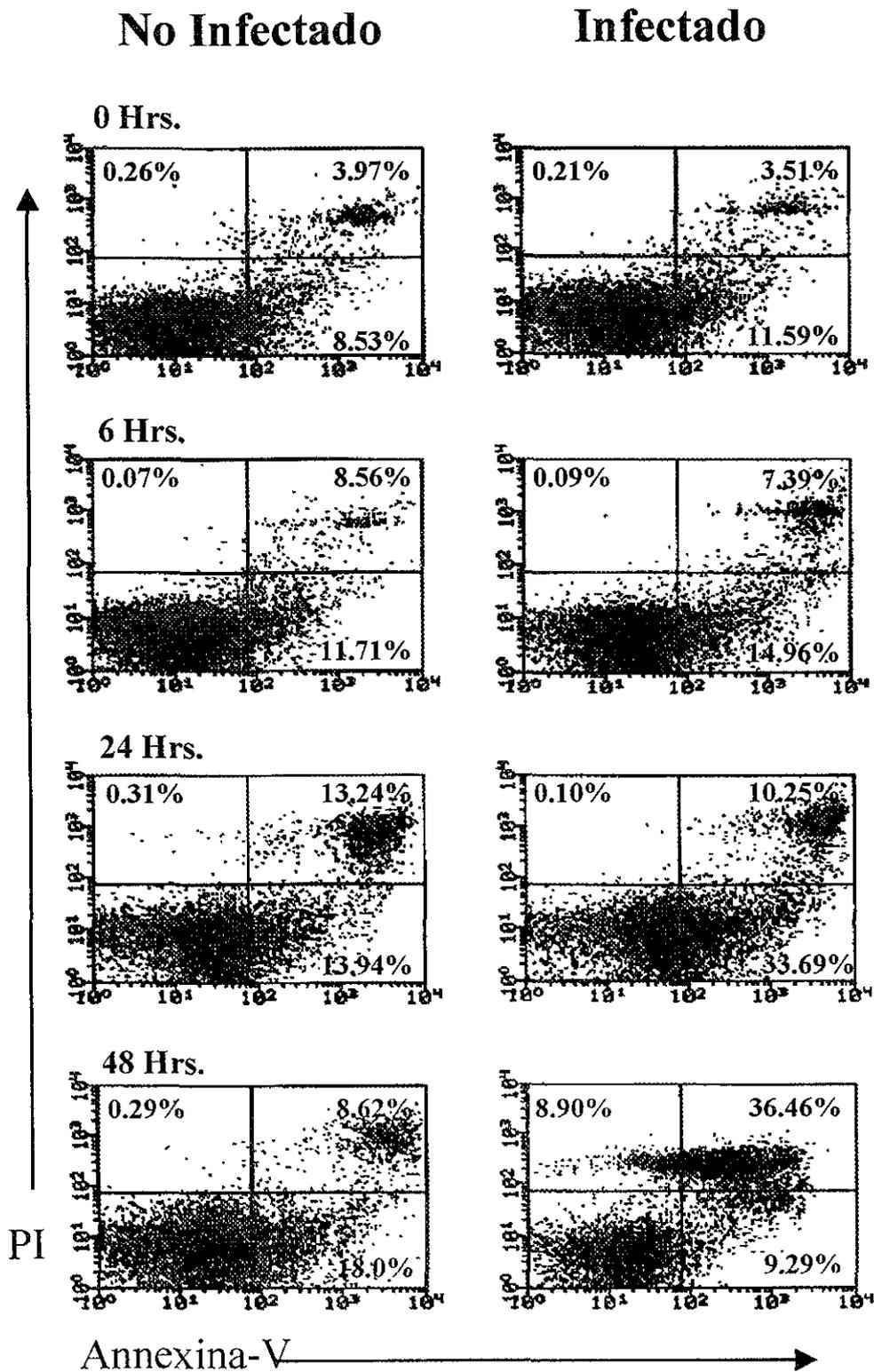


**Figura 3.** Disminución de la subpoblación V-2 en los linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de ratones BALB/cJ y BALB/cAnN infectados con cisticercos de *T. crassiceps*

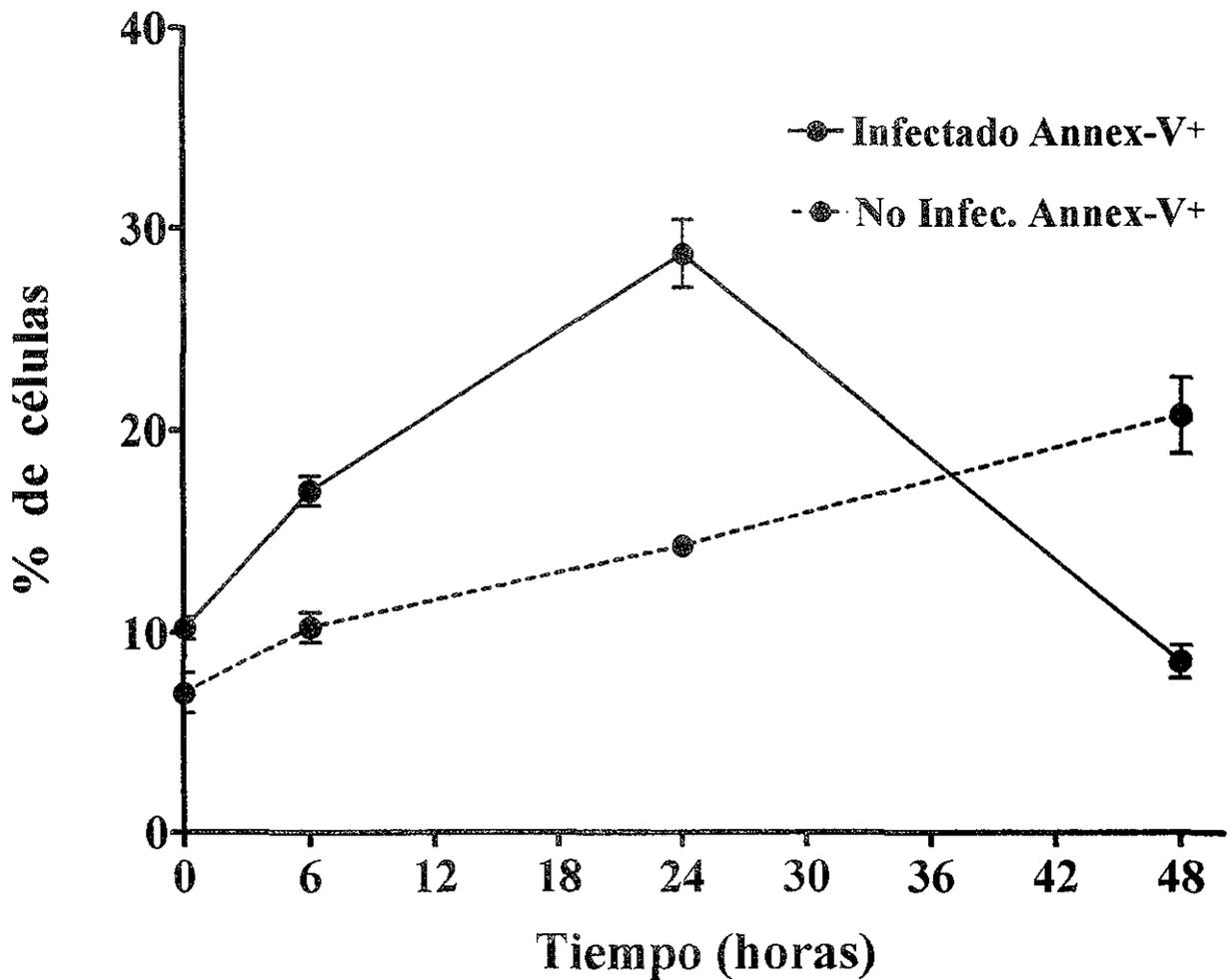
## **INDUCCION DE APOPTOSIS EN ESPLENOCITOS DE RATONES BALB/cAnN INFECTADOS CON CISTICERCOS DE *T. crassiceps*.**

**Los esplenocitos (CMN) de ratones infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps* expresan fosfatidilserina en la superficie celular después de la estimulación *in vitro* con *TcAg*.**

Recientemente, se ha reportado que las células apoptóticas, pero no las necróticas redistribuyen el fosfolípido fosfatidilserina del interior al exterior de la membrana celular independientemente del estímulo utilizado. Este fenómeno es un proceso temprano que se presenta en la apoptosis y sirve como una señal fisiológica para que las células fagocíticas reconozcan y eliminen a las células apoptóticas, evitando los procesos inflamatorios. La apoptosis de CMN de ratones infectados (30 días) y no infectados, se evaluó después de ser estimuladas *in vitro* con *TcAg* por citometría de flujo, utilizando la Annexina-V la cual se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, y el yoduro de propidio, que se une al ADN de las células que han perdido su actividad en la membrana y por lo tanto son permeables al colorante. Los resultados de estos experimentos nos indican que a las 24 h de estimulación con *TcAg*, se incrementa significativamente la población de las células annexin V+/PI- en ratones infectados (Figura 1). Interesantemente, el porcentaje de estas células annexin V+/PI- disminuye a 9.29% a las 48h después del estímulo, pero se observó un importante incremento en el porcentaje de células Annexina-V+/PI+ (de 10.25% a 36.46%). Este fenómeno no se observó en CMN de ratones no infectados (13.24% y 8.62%). Un porcentaje bajo de apoptosis espontánea (<10%) fue detectado



**Figura 1.** Evaluación de la apoptosis inducida por estimulación in vitro con *TcAg*, en esplenocitos de ratones BALB/cAnN infectados durante 30 días. Las células fueron teñidas con Annexina-V y Yoduro de propidio y posteriormente analizadas por citometría de flujo



**Figura 2.** Cinética de la apoptosis inducida por la estimulación *in vitro* de esplenocitos con TcAg. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado por análisis de FACS, después de teñir las células con Annexina-V y yoduro de propidío.

al comienzo de los experimentos. Solo se encontró un 1% ó menos de células necróticas, yoduro de propidio positivas (PI+). Las células apoptóticas (Annexina-V+/PI-) se incrementan significativamente en los cultivos de esplenocitos estimulados (24h) con TcAg de ratones infectados, comparados con las CMN de ratones no infectados. Además, diferencias significativas en la detección de Annexina-V entre las células estimuladas de ratones control e infectados son evidentes desde las 6h de estimulación (Figura 2). Interesantemente, el estímulo con TcAg (a las 48 h) de esplenocitos de ratones no infectados muestra un incremento en la detección de células Annexina-V+ (18%) con respecto al tiempo inicial (8.53%).

### **Detección de la fragmentación del ADN.**

La fragmentación del ADN en segmentos de múltiplos de 200 pares de bases ha sido ampliamente utilizada como un marcador específico para diferenciar entre muerte por apoptosis, y otros fenómenos de muerte celular. En esta tesis se evalúa si el patrón característico de fragmentación en escalera del ADN se presenta en las CMN estimuladas con TcAg. El ADN total se obtuvo de acuerdo al protocolo mencionado en materiales y métodos y se analizó su corrimiento en geles de agarosa al 1% (Figura 3). El típico patrón de fragmentación en escalera del ADN fue detectado en CMN estimuladas con TcAg de ratones infectados desde las 6h. de estimulación (datos no mostrados), y este patrón se mantiene a las 12h (carril no. 4) y hasta las 24h (carriles 8 y 9). Interesantemente, fragmentación del ADN de CMN estimuladas con TcAg de ratones no infectados fue detectada a las 24h de estimulación.

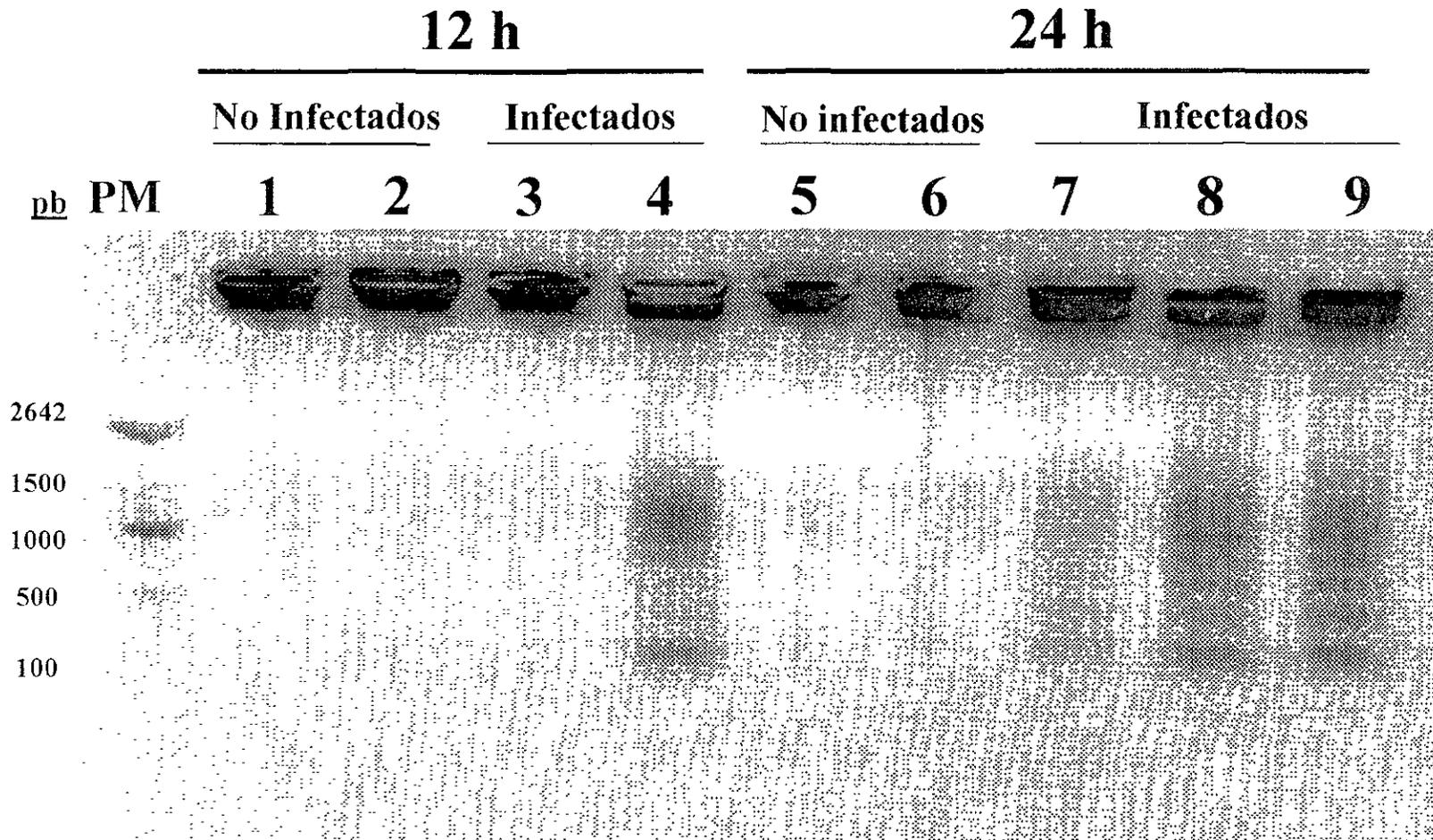
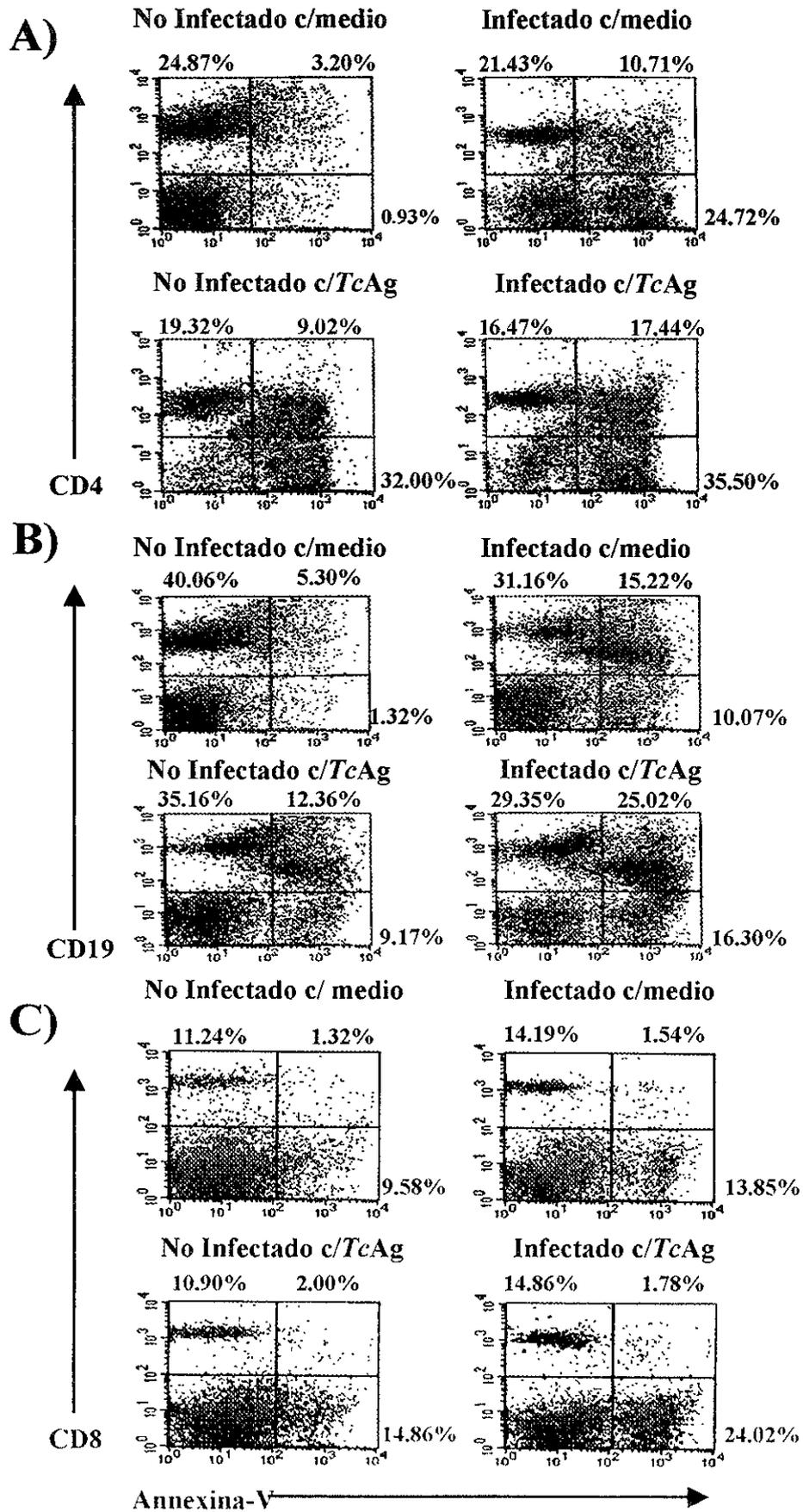


Figura 3. Análisis de la fragmentación del ADN en esplenocitos estimulados *in vitro* con TcAg. Líneas 1, 3, 5 y 7 sin estímulo, líneas 2, 4, 6, 8, y 9 estimuladas con TcAg. Primer carril, marcador de peso molecular (PM).

## **Determinación de la susceptibilidad a la apoptosis de las células CD4+, CD8+ y CD19+, inducida por la estimulación *in vitro* con TcAg.**

Para determinar el fenotipo de las células que sufren apoptosis después de ser estimuladas con TcAg, realizamos tinciones dobles con los siguientes anticuerpos monoclonales anti ratón: anti CD8 PE, anti CD19 PE o anti-CD4 CyChrome conjuntamente con annexin-V FITC. La Figura 4 (A y B) nos muestra que las células que son susceptibles a la inducción de apoptosis a través de la estimulación (24h) con TcAg, presentaron un fenotipo CD4+ ó CD19 y provienen de ratones infectados. La Figura 4A muestra un incremento significativo ( $P < 0.05$ ), de las células CD4+/Annexin V+ (17.44%) después de la estimulación, en comparación con las células no estimuladas (10.71%). La Figura 4B muestra un incremento significativo ( $P < 0.05$ ), de las células CD19+/Annexin V+ estimuladas con TcAg (25.02%), y solo un 15.22% de células doble positivas en esplenocitos no estimulados. Las células que presentan un fenotipo CD8+ no fueron susceptibles a la inducción de apoptosis a través de la estimulación con TcAg (Figura 4C).



**Figura 4.** Determinación de la susceptibilidad a la inducción de apoptosis de distintas subpoblaciones de linfocitos, después de la estimulación *in vitro* con TcAg. Los resultados muestran el análisis por citometría de flujo de las células teñidas con los anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 o anti-CD19, conjuntamente con annexina V.

## DISCUSION

El cisticerco de *Taenia crassiceps* se establece y reproduce en la cavidad peritoneal de ratones infectados experimentalmente. La capacidad para desarrollarse depende de la cepa de ratones utilizada. Así, BALB/cAnN se considera altamente susceptible y comparativamente BALB/cJ y C57BL/6J resultan más resistentes. Sabemos que una de las diferencias genéticas asociadas a la resistencia es el antígeno de histocompatibilidad no-clásico Qa-2 (Fragoso, et al. 1996). En este tesis se estudiaron e identificaron posibles moléculas y mecanismos inmunes que participan en estas diferencias de susceptibilidad con énfasis en la búsqueda de posibles funciones inmunológicas mediadas por Qa-2.

En estudios previamente realizados se observó la relevancia de la respuesta celular en el control de esta parasitosis. Existen evidencias de que en tiempos tempranos de la infección, en la fase de instalación del parásito y mínima reproducción, se induce una respuesta tipo Th1. Esta respuesta cambia progresivamente a Th2 conforme avanza la infección y se reproduce el parásito (Terrazas, et al. 1998; Villa, et al. 1996). Otros autores han reportado que durante todo el tiempo de infección se presenta una respuesta Th1-Th2 (Tonges, et al. 1999). Sin embargo, hasta la fecha no se conoce con certeza que tipos celulares están involucrados en la respuesta inmunológica durante dicha infección. Con el propósito de avanzar en este conocimiento, comparamos la susceptibilidad de ratones genéticamente deficientes (ratones knock out) en CD4, CD8, TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\delta$ , y RAG-1 con su respectivo ratón silvestre (Wild Type). En este estudio claramente mostramos la relevancia de ciertas subpoblaciones de células T en el control de la parasitosis, así como en la sobrevivencia del hospedero. Nuestros resultados indican que la ausencia de las

moléculas CD4 ó TCR $\alpha\beta$  alteran dramáticamente la respuesta a la infección por *T. crassiceps* lo que se refleja en una mayor cantidad de cisticercos recuperados a los 30 días de infección, así como en la muerte de hasta 57% de los ratones infectados a partir de los 21 días. El perfil de susceptibilidad observado en ratones CD4 $^{-/-}$ , TCR $\alpha^{-/-}$  y TCR $\beta^{-/-}$  no difirió de ratones RAG-1 $^{-/-}$  (los cuales no tiene células T y B maduras, debido a la inhabilidad de realizar el re-arreglo de sus genes VDJ del TCR y de las inmunoglobulinas). Mientras tanto, la ausencia de la molécula TCR $\delta$  solo se refleja en un aumento de la cantidad de cisticercos, pero no en la inducción de la mortalidad. Por lo que podemos decir que el TCR $\delta$  contribuye de manera importante en el control del crecimiento del parásito. Resulta de interés comentar previos resultados obtenidos por Tonjes, et al. (1999), quienes encontraron que ratones deficientes en el TCR $\delta$  no muestran un patrón diferente de infección con respecto al ratón silvestre (WT). Las diferencias entre nuestros resultados y los de Tonjes, pueden ser debidas a diferentes factores de experimentación empleados, como son: número de parásitos empleados para la infección, tiempo de infección, tamaño de la aguja (jeringa) empleado para la infección, edad de los ratones, etc. Es probable que estas diferencias de experimentación, lleven a diferencias en la cantidad de parásitos recuperados. Por otro lado, la ausencia de células CD8 $^{+}$  no modificó la parasitosis respecto a los ratones Wild Type, lo que nos indica que las células CD8 $^{+}$  no son importantes en el control de esta parasitosis.

Es importante señalar que la mortalidad en esta parasitosis, no había sido observada previamente en ninguna de las cepas de ratones evaluadas susceptibles inmunológicamente competentes. Considerando que los ratones deficientes en los que se observa mortalidad no detectamos la presencia de anticuerpos creemos que es

factible que el parásito libere factores solubles inmunosupresores que no puedan ser neutralizados (Arechavaleta, et al. 1988; Spolski, et al. 2000). En ausencia de anticuerpos, esta posibilidad parece ser bastante sólida, considerando diferentes reportes donde se sugiere que el cisticerco de *T. crassiceps* libera productos capaces de regular la respuesta inmune del hospedero e inclusive inducir la muerte de células T *in vitro* (O'connell, et al. 2000). Así, es posible que estos factores solubles puedan afectar a diferentes células y tejidos, llevando a la muerte a los ratones inmunodeficientes.

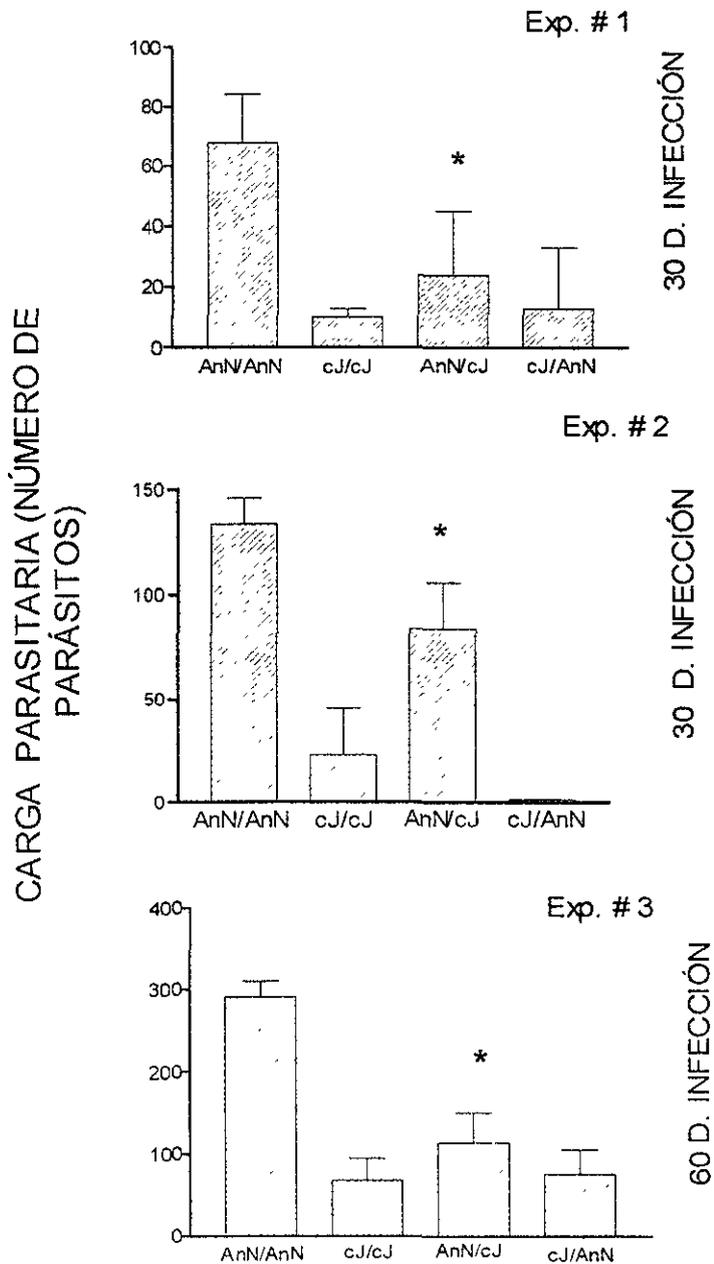
Otro hallazgo que amerita comentarse, es que a excepción de los ratones infectados deficientes en  $\text{TCR}\beta^{-/-}$  y  $\text{RAG-1}^{-/-}$ , todos los demás ratones presentaron importantes niveles en la producción de citocinas tipo T1 (IL-2 e  $\text{INF}\gamma$ ), mientras que las citocinas tipo T2 (IL-4 e IL-10) son importantemente incrementadas en los ratones  $\text{CD8}^{-/-}$  y Silvestres (WT), ligeramente incrementadas en los ratones  $\text{TCR}\delta^{-/-}$  y no se modifican en los ratones infectados  $\text{CD4}^{-/-}$ ,  $\text{TCR}\alpha^{-/-}$  y  $\text{TCR}\beta^{-/-}$  comparando con los ratones no infectados. Estos resultados, sugieren que en la cepa C57BL/6J, los ratones deficientes en ciertas moléculas de interés inmunológico, la ausencia de una respuesta de tipo T2 está asociada a condiciones de máxima susceptibilidad, después de 30 días de infección. Sin embargo, en la cepa BALB/c, a los 30 días de infección se induce una respuesta de tipo Th-2, la cual es ineficiente en el control del crecimiento del parásito. Es posible que dependiendo de la cepa de ratón utilizada para este tipo de experimentos, el fondo genético sea importante para determinar el tipo de respuesta inmunológica involucrada en el control de la parasitosis..

Por otro lado, con el propósito de identificar posibles mecanismos inmunológicos en los que pudiera estar participando la proteína Qa-2, comparamos la respuesta

inmune en contra del cisticerco de *T. crassiceps* en ratones altamente susceptibles (BALB/cAnN, Qa-2<sup>-</sup>) y ratones relativamente resistentes (BALB/cJ, Qa-2<sup>+</sup>). Si bien, entre estas dos cepas existen otras diferencias fenotípicas reportadas por Roderick et al. (1985) (BALB/cJ presenta mayores niveles de alfafetoproteína en los animales adultos, 3 enzimas que participan en la biosíntesis de catecolaminas; tirosina hidroxilasa, dopamina β-hidroxilasa y feniletanolamina N-metil transferasa y mayores niveles de testosterona), estas cepas resultaban adecuadas para explorar en un primer nivel esta posibilidad.

Para comenzar a evaluar si las diferencias de susceptibilidad estaban mediadas por células de origen hematopoyético se realizaron trasplantes recíprocos de células de médula ósea entre ambas sublíneas BALB/c (H2 compatibles), en estudios previos se ha demostrado que se puede transferir la resistencia a una enfermedad de una cepa resistente a una cepa susceptible a través de células de la médula ósea o de bazo (DeGee, et al., 1984; Greenblatt, et al., 1985). Los ratones quimeras resultantes se crearon por medio de la reconstitución celular con células de médula ósea ( $3-5 \times 10^6$  células) después de una dosis subletal de irradiación-γ (800 Rad) y se infectaron con 10 cisticercos de *T. crassiceps* 30 días posteriores al trasplante. Estos experimentos demostraron que las células de médula ósea de ratones BALB/cJ (Qa-2<sup>+</sup>) son capaces repoblar a los ratones BALB/cAnN (Qa-2<sup>-</sup>) irradiados, determinado por la presencia de linfocitos CD3<sup>+</sup>Qa-2<sup>+</sup> después de 30 días de la reconstitución. La reconstitución celular aumenta la resistencia a la infección por *T. crassiceps*, si bien las células de médula ósea contienen diferentes tipos celulares, (considerando la relevancia de las células T en la resistencia), podríamos suponer que la transferencia de células T Qa-2<sup>+</sup> media claramente la resistencia observada inmunológicamente. Mientras tanto, la

reconstitución celular de ratones irradiados BALB/cJ con células de ratones BALB/cAnN, no disminuyó la resistencia hacia dicha parasitosis (Fig. 2).



**Fig. 2.** Alteración de la susceptibilidad a través de la reconstitución celular, con células de médula ósea, en ratones irradiados. Los ratones receptores fueron irradiados con 800 Rad. e inmediatamente se reconstituyeron con células de médula ósea ( $3-5 \times 10^6$ ) del ratón donador (Receptor/Donador), las cuales se les introdujeron por la vena de la cola. Después de 25 días se evaluó el quimerismo y se infectaron con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. A los 30 ó 60 días de infección se sacrificaron y se realizó el conteo de los parásitos en cada individuo. (\*  $p < 0.05$ )

Estos resultados nos indican que probablemente la resistencia exhibida por BALB/cJ está asociada parcialmente a células del sistema inmune y a otros factores genéticos no inmunológicos.

Con respecto a mecanismos no inmunológicos involucrados en resistencia, en principio, resultaba interesante evaluar cual es la participación de factores sexuales considerando las diferencias de susceptibilidad en la cisticercosis murina entre hembras y machos observada en todas las cepas de ratones hasta la fecha evaluadas. A estos hechos se suman las diferencias en susceptibilidad asociadas al sexo observadas en diferentes modelos experimentales murinos de enfermedades parasitarias: Así, los machos han mostrado ser más susceptibles que las hembras en infecciones parasitarias por *Leishmania major* (Mock, et al., 1988), *Plasmodium chabaudi* (Wunderlich, et al., 1988), *Trypanosoma rhodesiense* (Greenblatt, et al., 1984). Por el contrario en la tricomoniasis por *Trichomonas vaginalis* en donde las hembras resultaron ser más susceptibles (Alexander and Stimson, 1988).

Considerando las diferencias de susceptibilidad entre hembras y machos observada en la cisticercosis murina se evaluó también la probabilidad de que la susceptibilidad estuviera mediada por factores sexuales, para comprobar la posible participación de los factores sexuales en la mayor resistencia expresada por BALB/cJ, se realizaron experimentos con ratones machos BALB/cAnN y BALB/cJ, los cuales se gonadectomizaron a las 2 semanas después del nacimiento. Los ratones gonadectomizados se infectaron a las 6 semanas con 10 cisticercos de *T. crassiceps* y se determinó la carga parasitaria a los 10, 20, 30, y 60 días. Los resultados indicaron que la gonadectomía aumentaba la susceptibilidad de ambas cepas presentando un mayor número de parásitos, pero que las diferencias observadas previamente entre

**Tabla 2. EFECTO DE LA GONADECTOMIA EN RATONES MACHO DE LA CEPA BALB/c RESISTENTES (J) Y SUSCEPTIBLES (AnN)**

Grupo	Media $\pm$ Desviación estandar de la carga patasitaria			
	Días post-infección			
	10	20	30	60
<b>Control</b>				
BALB/cAnN	6.85 $\pm$ 3.4 <sup>a</sup>	10.8 $\pm$ 4.08 <sup>a</sup>	22.3 $\pm$ 7.20 <sup>a</sup>	245.16 $\pm$ 35.59 <sup>c</sup>
BALB/cJ	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	115.20 $\pm$ 13.98 <sup>d</sup>
<b>GONADECTOMIZADOS</b>				
BALB/cAnN	7.42 $\pm$ 2.63 <sup>a</sup>	14.8 $\pm$ 5.97 <sup>a</sup>	26.4 $\pm$ 7.26 <sup>a</sup>	514.83 $\pm$ 90.78 <sup>e</sup>
BALB/cJ	0 <sup>b</sup>	4.50 $\pm$ 1.80 <sup>a</sup>	5.20 $\pm$ 1.80 <sup>a</sup>	246.50 $\pm$ 34.88 <sup>c</sup>

a, b, c, d, e, Los datos marcados con la misma letra no son diferentes significativamente entre ellos, mientras que los marcados con letras diferentes si son diferentes significativamente (P < 0.01)

Numero de ratones por grupo: 8

BALB/cAnN y BALB/cJ se mantiene, siendo más notable el aumento de la susceptibilidad a la parasitosis a los 60 días de infección (Tabla 2). De tal modo que podemos decir que en los machos de las cepas BALB/cAnN y BALB/cJ las hormonas gonadales juegan un papel en el control de la parasitosis, aunque aún desconocemos el mecanismo con el que subyace este fenómeno. Como se ilustra en la Tabla 2, aunque la gonadectomía aumentó la susceptibilidad en ambas sublíneas, los ratones BALB/cJ continuaron siendo más resistentes que los BALB/cAnN lo que sugiere que la diferencia de susceptibilidad podrían estar determinada por otros factores diferentes a los gonadales. Sin embargo, considerando que hay características sexuales que se determinan en el nacimiento y que pudiesen estar influyendo el fenómeno de resistencia, por lo cual es necesario realizar experimentos con ratones gonadectomizados recién nacidos, de este modo podríamos establecer de manera más clara la participación de las gonadas en la inducción de la resistencia o susceptibilidad.

Habiendo obtenido evidencias compatibles con que las diferencias de susceptibilidad entre las sublíneas de BALB/c radican en diferencias inmunológicas, nos concentramos en estudiar la respuesta inmune inducida por la infección en ambas cepas. Evaluando el porcentaje de células  $CD8^+$ ,  $CD4^+$  y  $TCR\alpha\beta^+$  en tiempos tempranos de la infección, ya que consideramos que el grado de infección depende principalmente de la instalación, desarrollo y reproducción del parásito, observamos que mientras en BALB/cJ estas poblaciones no se modificaban, en BALB/cAnN se observó una pequeña pero significativa disminución de estas poblaciones. Mientras tanto, en la población de células T ( $TCR\gamma\delta^+$ ) no se observan diferencias significativas entre ambas cepas. Con el propósito de conocer si la disminución en linfocitos  $TCR\alpha\beta^+$  se debía a una disminución de todas las poblaciones o de ciertas poblaciones, se

estudió un conjunto de 14 diferentes poblaciones V $\beta$  (TCR V $\beta$ 2, TCR V $\beta$ 3, TCRV $\beta$ 4, TCRV $\beta$ 5, TCRV $\beta$ 6, TCRV $\beta$ 7, TCRV $\beta$ 8, TCRV $\beta$ 9, TCRV $\beta$ 10, TCRV $\beta$ 11, TCRV $\beta$ 12, TCRV $\beta$ 13, TCRV $\beta$ 14). Interesantemente, encontramos que solo en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup> disminuyen significativamente en ratones BALB/cAnN infectados, mientras que en los ratones BALB/cJ infectados no se modifican los porcentajes respecto a los no infectados. La disminución de la subpoblación TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup> observado solo en la cepa susceptible podría resultar como consecuencia del eficiente establecimiento del parásito. Esta subpoblación de células T TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup> ha sido implicada en distintos fenómenos en respuesta a superantígenos (Hodes, et al., 1993) y en la patogenia de la infección por estafilococos (Choi, et al., 1990; Ericson, et al., 1996). Así, es factible que el parásito produzca un estado de anergia en la subpoblación T TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup> que favorezca su establecimiento. Estos resultados permiten proponer que la población de células T TCR V $\beta$ 2<sup>+</sup> podrían tener un papel importante en la generación de una respuesta inmune efectiva capaz de controlar al parásito.

En un intento por conocer los posibles mecanismos involucrados en la disminución de células T durante la infección por *T. crassiceps* observada en ratones susceptibles (BALB/cAnN), evaluamos si en estos ratones la parasitosis inducía apoptosis. Esta posibilidad no es remota considerando previos reportes en los que se ha descrito que en diferentes infecciones parasitarias (*Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, y *Plasmodium chabaudi chabaudi*) puede inducirse apoptosis de esplenocitos *in vivo* o *in vitro*, y se ha especulado que este fenómeno forma parte de una estrategia del parásito para reducir la respuesta inmunológica del hospedero y favorezca su instalación (Rumbley, et al. 1998, 1999;

Nunes, et al. 1998; Khan, et al. 1996; Helmbj, et al. 2000). En particular, en la cisticercosis por *T. crassiceps*, se ha reportado que el parásito es capaz de producir factores solubles que intervienen en la regulación de la respuesta generando una inmunodepresión de la respuesta inmune celular, inhibición en la producción de citocinas y hasta capacidad de inducir muerte de linfocitos T *in vitro* (Arechavaleta, et al. 1998; Spolski, et al. 2000; O'Connell, et al. 2000 ). Con este panorama estudiamos si la estimulación *in vitro* con antígenos de *T. crassiceps* es capaz de inducir apoptosis en células de ratones BALB/cAnN después de 30 días de infección. Los resultados de este trabajo, nos indican que la estimulación *in vitro* de células de ratones infectados, induce la expresión extracelular de fosfatidilserina a las 6 h después del estímulo, y alcanza un pico máximo a las 24 h. La fosfatidilserina es una molécula que se redistribuye del interior al exterior de la membrana celular en la apoptosis, mientras que en un fenómeno necrótico este efecto no se observa. Así, realizando una tinción doble con una proteína llamada annexin V (la cual tiene alta afinidad por la fosfatidilserina) y el Yoduro de propidio (PI) se puede distinguir entre el fenómeno de apoptosis y el de necrosis. Para verificar el fenómeno de apoptosis se evaluó simultáneamente a través de la técnica de fragmentación del DNA en geles de agarosa. Utilizando este procedimiento observamos también el fenómeno de apoptosis a partir de las 6 h posteriores a la estimulación. Este fenómeno lo observamos solo en las subpoblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD19<sup>+</sup>. La apoptosis observada en células CD4<sup>+</sup> resulta de especial interés considerando la relevancia de las células CD4<sup>+</sup> en el control de la parasitosis. Con respecto a estos resultados de muerte celular (apoptosis) inducida por *T. crassiceps*, previamente se había reportado que la estimulación *in vitro* de células Jurkat con el parásito completo de *T. crassiceps*, resultaba en la muerte de

las dichas células, sin embargo en este reporte evalúan la muerte celular por técnicas no muy confiables para determinar si la muerte es por apoptosis o por otro fenómeno de muerte celular, entre estas técnicas se encuentran: 1) exclusión del colorante azul de tripano (que no sirve para discriminar entre apoptosis u otro mecanismo de muerte celular), 2) electroforesis para el análisis del "cometa" (que solo nos indican que hay daño, a nivel del ADN pero, tampoco sirven para especificar si es o no apoptosis), y 3) tinción de las células con el colorante naranja de acridina (es una técnica que morfológicamente ayuda a discriminar entre apoptosis y otras formas de muerte celular, pero no es muy usual el uso de esta técnica). Por lo tanto, creemos que la aplicación de otras técnicas que discriminen plenamente entre apoptosis y necrosis, son necesarias para demostrar que el cisticerco de *T. crassiceps* realmente induce un fenómeno apóptotico a las células Jurkat. En nuestro trabajo evaluamos el fenómeno de muerte celular con técnicas mas específicas (ver los resultados II), que realmente determinan que dicho fenómeno es por apoptosis. Sin embargo, es necesario realizar otro tipo de experimentos para tratar de identificar un posible mecanismo intracelular específico de apoptosis. En varios experimentos preeliminares, la apoptosis inducida en esplenocitos incubados in vitro con TcAg, parece ser dependiente de la activación de caspasas, ya que hemos detectado fragmentación de la poly(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). La fragmentación proteolítica del PARP por las caspasas es un marcador principal de la apoptosis. Además, sería interesante investigar, si algunas moleculas tales como CD95 (APO/Fas) y su ligando (CD95L) o TNF- $\alpha$  y su ligando están involucrados en este fenómeno.

En resumen, los resultados obtenidos nos permiten proponer que:

- En fondo C57BL/6J

la respuesta inmunológica asociada a la resistencia a la parasitosis por *T. crassiceps* parece estar mediada por las células CD4<sup>+</sup>TCRαβ<sup>+</sup>, y de acuerdo con el perfil de citocinas observado la respuesta específica contra el parásito resulta de una coexistencia de T1/T2.

- En fondo genético BALB/c

Las células hematopoyéticas Qa2<sup>+</sup> son capaces de transferir resistencia a ratones Qa2<sup>-</sup>. La infección induce disminución de células T, en especial TCRαβ, y en particular Vβ2. Esta subpoblación podría ser importante en el desarrollo de una respuesta efectiva contra la parasitosis. Los resultados indican que fenómenos apoptóticos están involucrados en la infección de ratones susceptibles (BALB/cAnN) y parecen ser los responsables de la disminución de células T observada en estos ratones (BALB/cAnN).

Este trabajo de tesis es una contribución al conocimiento básico de los fenómenos inmunológicos asociados a la cisticercosis experimental murina y al entendimiento de los mecanismos inmunológicos asociados a la resistencia a la cisticercosis experimental. Es la esperanza que la información obtenida en este estudio permita orientar la investigación de la respuesta inmune asociada a la cisticercosis humana por *T. solium*.

## REFERENCIAS.

- Alexander, J., And W. H. Stimson. **1988**. Sex hormones and the course of parasitic infection. *Parasitol today* **4**:189-193.
- Amirayan N., Furrie E., Deleuil F., Mellor A., Leserman L., and P. Machy. **1995**. Influence of MHC class I molecules on T-cell proliferation induced by CD3 or Thy-1 stimulation. *Immunology*. **86**:71-78.
- Arechavaleta F., Molinari J. L., and P. Tato. **1998**. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol. Res.* **84**:117-122.
- Cardona A. E., Restrepo B. I., Jaramillo J. M., and J.M. Teale. **1999**. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of gamma delta T cells. *J. Immunol.* **162**:995-1002.
- Choi Y., Lafferty J. A., Clements J. R., Todd J. K., Gelfand E. W., Kappler J., Marrack P., and B. L. Kotzin. **1990**. Selective expansion of T cells expressing V beta 2 in toxic shock syndrome. *J. Exp. Med.* **172**:981-984.
- DeGee A. L., and J. M. Mansfield. **1984**. Genetics of resistance to the African trypanosomes. IV. Resistance of radiation chimeras to *Trypanosoma rhodesiense* infection. *Cell Immunol.* **87**:85-91.
- Del Brutto O. H. **2000**. [Cysticercosis of the cerebellopontine angle: treatment with single-dose praziquantel]. *Rev. Neurol.* **31**:835-837.
- Del Brutto O. H., Granados G., Talamas O., Sotelo J., and C. Gorodezky. **1991**. Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, C, DR, and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Hum. Biol.* **63**:85-93.

- Dorais F. J. and G. W. Esch. **1969**. Growth rate date of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* **29**:395-400.
- Ericson M. L., Mooney N. A., and D. J. Charron. **1996**. Prokaryotic production of the human T cell receptor Vbeta2 chain and binding to toxic-shock syndrome toxin-1. *Gene.* **168**:257-260.
- Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Govezensky T., and E. Sciutto. **1996**. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology.* **112**:119-24.
- Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Govezensky T., and E. Sciutto. **1996**. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology.* **112**:119-124.
- Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Hernandez M., and E. Sciutto. **1998**. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect. Immun.* **66**:760-764.
- Freeman R. S. **1962**. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zender, 1800), (Rudolphi, 1810). *Can. J. Zool.* **40**: 969-990.
- Freeman R. S. **1964**. Studies on the response of intermediate host infection wuth *Taenia crassiceps* (Zender, 1800) (cestoda). *Can. J. Zool.* **42**:367-372.
- Garcia-Dominguez C., Correa D., Rabiela M.T., and A. Flisser. **1991**. Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis. 4. Reversible in vitro effect. *Parasitol. Res.* **77**:691-696.
- Gogna A. **1996**. Praziquantel therapy in neurocysticercosis. *J. Assoc. Physicians India.* **44**:149-154

- Greenblatt, H. C., and D. L. Rosenstreich. **1984**. *Trypanosoma rhodesiense* infection in mice: sex dependence of resistance. *Infect. Immun.* **43**:337-340.
- Greenblatt, H. C., Potter T. A., and D. L. Rosenstreich. **1985**. Genetic control of natural resistance to *Trypanosoma rhodesiense*: transfer of resistance with bone marrow or spleen cells. *J. Infect. Dis.* **151**:911-916.
- Grossman C. J. **1985**. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* **18**:257-61
- Hahn A. B., and M. J. Soloski. **1989**. Anti-Qa-2-induced T cell activation. The parameters of activation, the definition of mitogenic and nonmitogenic antibodies, and the differential effects on CD4+ vs CD8+ T cells. *J. Immunol.* **143**:407-413.
- Hahn A. B., Tian H., Wiegand G., and M. J. Soloski. **1992**. Signals delivered via the Qa-2 molecule can synergize with limiting anti-CD3-induced signals to cause T lymphocyte activation. *Immunol Invest.* **21**:203-217.
- Helmy H., Jonsson G., and M. Troye-Blomberg. **2000**. Cellular changes and apoptosis in the spleens and peripheral blood of mice infected with blood-stage *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS. *Infect. Immun.* **68**:1485-1490.
- Hernandez M., Beltran C., Garcia E., Fragoso G., Gevorkian G., Fleury A., Parkhouse M., Harrison L., Sotelo J., and E. Sciutto. **2000**. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol. Lett.* **10**:13-17.
- Hodes R. J., Novick M. B., Palmer L. D., and J. E. Knepper. **1993**. Association of a V beta 2-specific superantigen with a tumorigenic milk-borne mouse mammary tumor virus. *J. Immunol* **150**:1422-1428.

- Huerta L., Terrazas L. I., Sciutto E., and C. Larralde. **1992**. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J. Parasitol.* **78**:471-6.
- Huerta M., Sciutto E., Garcia G., Villalobos N., Hernandez M., Fragoso G., Diaz J., Diaz A., Ramirez R., Luna S., Garcia J., Aguilar E., Espinoza S., Castilla G., Bobadilla J.R., Avila R., Jose M.V., Larralde C., and A. S. de Aluja. **2000**. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet. Parasitol.* **27**:209-19
- Joyce S., Tabaczewski P., Angeletti R. H., Nathenson S. G., and I. Stroynowski. **1994**. A nonpolymorphic major histocompatibility complex class Ib molecule binds a large array of diverse self-peptides. *J. Exp. Med.* **179**:579-588
- Khan I. A., Matsuura T., and L. H. Kasper. **1996**. Activation-mediated CD4+ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol.* **8**:887-896.
- Larralde C., Montoya R. M., Sciutto E., Diaz M. L., Govezensky T., and E. Coltorti. **1989**. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J Trop Med. Hyg.* **40**:282-289.
- Malagon-Valdez J. **1999**. [Neurocysticercosis in pediatrics. Prognosis, treatment and prevention]. *Rev. Neurol.* **29**:337-339.
- McElhinny A. S., Exley G. E , and C. M. Warner. **2000**. Painting Qa-2 onto Ped slow preimplantation embryos increases the rate of cleavage. *Am. J. Reprod. Immunol.* **44**:52-58.

- Mellor A. L., Antoniou J., and P.J. Robinson. **1985**. Structure and expression of genes encoding murine Qa-2 class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**:5920-5924.
- Mock, B. A., and C. A. Nacy. **1988**. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infection. *Infect. Immun.* **56**:3316-3319.
- Nunes M. P., Andrade R. M., Lopes M. F., and G. A. DosReis. **1998**. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J. Immunol.* **160**:1313-1319.
- O'connell K. M., and M. T. Rogan. **2000**. Apoptosis in human Jurkat T cells after culture with live *Taenia crassiceps* cysticerci in vitro. *Parasitology* **120**: 649-655.
- Ozeretskovskaia, N.N. 2000. Organ pathology in chronic tissue-dwelling helminthic infections: role of blood and tissue eosinophilia, immunoglobulinemia E, G4, and immune response-inducing factors. *Med. Parazitol. (Mosk).* 4:9-14.
- Restrepo B.I., Llaguno P., Sandoval M.A., Enciso J.A., and J.M.Teale.**1998**. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J. Neuroimmunol.* **89**:64-72.
- Roderick T. H., Langley S. H., and E. H. Leiter. **1985**. Some unusual genetic characteristics of BALB/c and evidence for genetic variation among BALB/c substrains. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **122**:9-18.
- Rojas W. G , Tato Z. P., Solano G. S., Herrera M. L., Gutierrez Q. M., and P.M. Salazar Schettino. **1999**. [Immune humoral response in pigs infected with eggs and posoncospheres of *Taenia solium*]. *Bol. Chil. Parasitol.* **54**:57-62.

- Rumbley C. A., and S. M. Phillips. **1999**. The schistosome granuloma: an immunoregulatory organelle. *Microbes Infect.* **1**:499-504.
- Rumbley C. A., Zekavat S. A., Sugaya H., Perrin P. J., Ramadan M. A., and S. M. Phillips. **1998**. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. *J. Immunol.* **161**:4129-37.
- Sciutto E., Aluja A., Fragoso G., Rodarte L. F., Hernandez M., Villalobos M. N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., and T. Govezensky. **1995**. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* **60**:53-67.
- Sciutto E., Fragoso G., Baca M., De la Cruz V., Lemus L., and E. Lamoyi. **1995**. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Immun.* **63**:2277-2281.
- Sciutto E., Fragoso G., Diaz M. L., Valdez F., Montoya R. M., Govezensky T., Lomeli C., and C. Larralde. **1991**. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* **77**:243-246.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R. M., Diaz M. L., Govezensky T., Lomeli C., Tapia G., and C. Larralde. **1990**. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* **12**:687-696.
- Sciutto E., Martinez J. J., Villalobos N. M., Hernandez M., Jose M. V., Beltran C., Rodarte F., Flores I., Bobadilla J. R., Fragoso G., Parkhouse M. E., Harrison L. J., and A. S. de Aluja. **1998**. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet. Parasitol.* **27**:299-313.

- Sekhar G.C., and B.N. Lemke. **1997**. Orbital cysticercosis. *Ophthalmology*. **104**:1599-1604.
- Shanley J. D., and M. C. Jordan. **1980**. Clinical aspects of CNS cysticercosis. *Arch. Intern. Med.* **140**:1309-1313.
- Shiguekawa K. Y., Mineo J. R., de Moura L. P., and J.M. Costa-Cruz. **2000**. ELISA and western blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. *Trop. Med. Int. Health*. **5**:443-449.
- Singhi P., Ray M., Singhi S., and N. Khandelwal. **2000**. Clinical spectrum of 500 children with neurocysticercosis and response to albendazole therapy. *J. Child. Neurol.* **15**:207-213.
- Smith K. M., Esch G. W., and R. E. Kuhn. **1972**. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (cestoda). I. Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *Int. J. Parasitol.* **2**: 261-266
- Spolski R. J., Corson J., Thomas P. G., and R. E. Kuhn. **2000**. Parasite-secreted products regulated the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol* **22**: 297-305.
- Stroynowski I. **1995**. Tissue-specific, peptide-binding transplantation antigens: lessons from the Qa-2 system. *Immunol. Rev.* **147**:91-108.
- Stroynowski I., Soloski M., Low M. G., and L. Hood **1987**. A single gene encodes soluble and membrane-bound forms of the major histocompatibility Qa-2 antigen: anchoring of the product by a phospholipid tail. *Cell*. **50**:759-768

- Tabaczewski P., Chiang E., Henson M., and I. Stroynowski. **1997**. Alternative peptide binding motifs of Qa-2 class Ib molecules define rules for binding of self and nonself peptides. *J. Immunol.* **159**:2771-2781.
- Terrazas L. I., Bojalil R., Govezensky T., and C. Larraide. **1998**. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* **84**:74-81.
- Toenjes S. A., Spolski R. J., Mooney K. A., and R. E. Kuhn. **1999**. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology.* **118**:623-33.
- Toenjes S.A., Spolski R. J., Mooney K. A., and R. E. Kuhn. **1999**. Gamma delta T cells do not play a major role in controlling infection in experimental cysticercosis. *Parasitology* **119**: 413-418.
- Villa O. F., and R. E. Kuhn. **1996**. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology.* **112**:561-70.
- Warner C. M., Exley G. E., McElhinny A. S., and C. Tang. **1998**. Genetic regulation of preimplantation mouse embryo survival. *J. Exp. Zool.* **282**:272-279.
- Willms K., and M.T. Merchant. **1980**. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. *Parasite Immunol.* **2**:261-275.
- Wunderlich, F., Mossmann H., Helwig M., and G. Schillinger. **1988**. Resistance to *Plasmodium chabaudi* in B10 mice: influence of the H-2 complex and testosterone. *Infect. Immun.* **56**:2400-2406.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

A 23 de Abril, 2001  
México, D.F.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

A handwritten signature in cursive script, reading "Kaethe Willms Manning".

---

Dra. Kaethe Willms Manning  
Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

A 23 de Abril, 2001  
México, D.F.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Pedro Laclette San Román', written over a horizontal line.

Dr. Juan Pedro Laclette San Román  
Instituto de Investigaciones Biomédicas



A 23 de Abril, 2001  
México, D.F.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

---

Dra. Edda Sciutto Conde  
Instituto de Investigaciones Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

A 23 de Abril, 2001  
México, D.F.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente

Atentamente,

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Moreno Rodríguez  
Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

A 23 de Abril, 2001  
México, D.F.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Guillermo Alfaro Martínez', written over a horizontal line.

Dr. Guillermo Alfaro Martínez  
Instituto de Investigaciones Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

A 23 de Abril, 2001  
México, D.F.

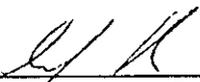
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

  
Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser  
Facultad de Medicina



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

A 29 de Mayo, 2001  
México, D.F.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar,  
UNAM  
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva,

Después de haber evaluado la Tesis titulada "Identificación de los mecanismos de resistencia a la cisticercosis murina mediados por la proteína Qa-2" del alumno, José Sergio López Briones con número de cuenta 98854044 y número de expediente 78981003, inscrito en el Doctorado en Ciencias Biomédicas y aspirante al grado de Doctor en Ciencias, considero que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi VOTO APROBATORIO al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, enclosed within an oval-shaped stamp.

Dr. José Luis Molinari Soriano  
Instituto de Fisiología Celular