

206



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CISTICERCOSIS MURINA POR LA TRANSFERENCIA PASIVA DE MACROFAGOS DIFERENCIALMENTE ACTIVADOS”.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS

PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

MARIA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Rafael Bojalil Parra

2002



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "EFECTO EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CISTICERCOSIS MURINA POR LA TRANSFERENCIA DE MACROFAGOS DIFERENCIALMENTE ACTIVADOS".

realizado por MARIA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR

con número de cuenta 9354894-0 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

DR. RAFAEL BOJALIL PARRA

Rafael Bojalil Parra

Propietario

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

Rocio Salceda

Propietario

DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO

Patricia Rivas M.

Suplente

M. EN C. ROSARIO ORTIZ HERNANDEZ

Rosario Ortiz

Suplente

M. EN C. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA

Miriam

Consejo Departamental de BIOLOGIA

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

[Firma]
DRA. PATRICIA RAMOS MORALES



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "EFECTO EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA CISTICERCOSIS MURINA POR LA TRANSFERENCIA DE MACROFAGOS DIFERENCIALMENTE ACTIVADOS".

realizado por MARIA RASHIDI SPRINGALL DEL VILLAR
con número de cuenta 9354894-0 , quién cubrió los créditos de la carrera de BIOLOGIA
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	DR. RAFAEL BOJALIL PARRA	<i>Rafael Bojalil Parra</i>
Propietario	DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES	<i>Rocio Salceda</i>
Propietario	DRA. PATRICIA RIVAS MANZANO	<i>Patricia Rivas M.</i>
Suplente	M. EN C. ROSARIO ORTIZ HERNANDEZ	<i>Rosario Ortiz H.</i>
Suplente	M. EN C. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA	<i>Miriam</i>

Consejo Departamental de BIOLOGIA

DRA. PATRICIA RAMOS MORALES

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" bajo la dirección del Dr. Rafael Bojalil Parra y la asesoría de la M. en C. Miriam Rodríguez Sosa. Ha sido financiado en su mayor parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto: 31102M).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente al Dr. Rafael Bojalil Parra por haberme brindado la oportunidad de ingresar a su laboratorio y que bajo su dirección a sido posible la realización de esta tesis. Por su valiosa y hermosa amistad. Por su confianza. Mil gracias.

A la M. en C. Miriam Rodríguez Sosa por su asesoría y apoyo en la elaboración de este trabajo. Por transmitir y enseñar pacientemente su experiencia durante todo este tiempo. Gracias.

A la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, Dra. Patricia Rivas M. y a la M. en C. Rosario Ortiz H. por su interés y valiosas aportaciones en este trabajo. Por su amistad, comprensión y apoyo que cariñosamente mostraron durante mi carrera. Por aceptar ser mis sinodales pues son y serán personas especiales en mi formación personal y profesional. Muchísimas gracias.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Maru, Soco, Carmen, Vale, Gus, Angel, Adriana, Inés, Rosi, Paty, Yola, Héctor, Rodrigo, Nacho, Ricardo, Salvador y Lorena que tan cariñosamente siempre me han brindado su amistad y su ayuda. Por hacer muy agradable estos años. Mil gracias.

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y admiración agradezco enormemente a mis padres por su apoyo, interés y solidaridad en mi desarrollo personal y profesional. Por su solidaridad en los momentos más felices y difíciles de mi vida. Mi más profundo agradecimiento por hacer posible que esta tesis llegara a su fin. Espero lograr transmitir a mis hijos todos los valores, ilusiones e inquietudes que con tanto cariño y entusiasmo han sabido enseñar y sembrar en mi persona. No existen palabras suficientes para expresarles mi gratitud y el amor que les tengo. GRACIAS POR TODO.

A mis hijos, por ser el mayor tesoro que la vida me ha otorgado. Agradezco infinitamente a cada uno por su paciencia y amor con el que han participado desde el inicio hasta el final de mi carrera. Por ser ambos la motivación más grande para seguir adelante y por ser el estímulo de una superación personal. Espero que esta meta les sirva de ejemplo en su vida futura. Los amo. MUCHISIMAS GRACIAS.

A todos mis hermanos por su cariño y solidaridad para conmigo y mis hijos. Agradezco enormemente a cada uno por estar siempre de manera incondicional en las diversas circunstancias de la vida. Por ser también ejemplos a seguir. MIL GRACIAS.

A Fernando por haber estado conmigo de manera incondicional durante toda mi carrera. Por su solidaridad y cariño de siempre. GRACIAS.

A todos mis amigos por la inmensa y bellísima amistad que nos une. Por ser pilares sólidos e importantísimos en mi vida. Les dedico este pensamiento para transmitir a cada uno mi más grande afecto y gratitud. GRACIAS SIEMPRE.

LA AMISTAD

Es el más noble y sencillo de los sentimientos.
Crece al amparo del desinterés, se nutre dándose
y florece con la comprensión.
Su sitio está junto al amor,
porque la amistad es amor.
Sólo los honrados pueden tener amigos,
porque la amistad no admite tener cálculos, ni sombras, ni dobleces.
Exige en cambio sacrificio, valor, comprensión y verdad;
verdad sobre todas las cosas.

H.E. RATTI

CONTENIDO

1. ABREVIATURAS	5
2. RESUMEN	6
3. INTRODUCCION	
3.1 Respuesta Inmune Mediada por Células	7
3.2 Papel de los Macrófagos en la Respuesta Inmune	10
3.3 Biología del Macrófago	14
3.4 Citocinas	17
3.5 Oxido Nítrico	19
3.6 Mecanismos de Polarización de la Respuesta Inmune	23
4. ANTECEDENTES	28
5. JUSTIFICACIÓN	36
6. MODELO EXPERIMENTAL	37
7. OBJETIVOS	39
8. HIPOTESIS	40
9. METODOLOGÍA	41
10. RESULTADOS	47
11. DISCUSIÓN	66
12. CONCLUSIONES	78
13. BIBLIOGRAFÍA	79

1. ABREVIATURAS

AAmo.	macrófagos alternativamente activados
Ag	Antígeno
BCR	Receptor de la Célula B (B cell receptor)
BSA	Albúmina Sérica Bovina (Bovine serine albumine)
CAmo.	macrófagos clásicamente activados
CD	Grupo de Diferenciación (Cluster Differentiation)
Células NK	Células Asesinas Naturales (Natural Killers Cella)
CPA	Célula Presentadora de Antígeno
Con-A	Concanavalina A
CSF-1	Factor estimulador de colonias-1 (colony-stimulating factor-1)
GM-CSF	Factor estimulador de granulocitos/monocitos
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacárido
Mo.	Macrófago
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
NO	Oxido Nítrico
NOS	Oxido Nítrico Sintetasa
PBS	Solución Buffer de Fosfatos (Phosphate buffer Solution)
PBS/BSA	Solución Buffer de Fosfatos c/Albúmina Sérica Bovina (Phosphate buffer solution/bovine serine albumine)
PBS-T	Solución Buffer de fosfatos -Tween
PGE-2	Prostaglandina E-2
pH	Potencial de Hidrógeno
RNIs	Intermediarios de la reacción del nitrógeno
ROIs	Intermediarios de la reacción del oxígeno
rpm	Revoluciones por Minuto
SN	Sobrenadante
TCR	Receptor de la Célula T (T cell receptor)
Th	Células T cooperadoras (T helper cells)
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (Tumoral necrosis factor)
[3H]TdR	Timidina tritiada

2. RESUMEN

Las infecciones por helmintos inducen respuestas altamente polarizadas que se caracterizan por el dominio de citocinas tipo Th2 que resultan protectoras en muchos de los casos. Sin embargo, en algunas infecciones helmínticas persistentes como la causada por *T. crassiceps* se ha demostrado el desarrollo de una respuesta Th1 inicial capaz de controlar el crecimiento del cisticerco que conforme se torna crónica se pierde y es sustituida por otra mediada por citocinas Th2. Esta última no solo no elimina al cisticerco sino que el hospedero se muestra más susceptible dando como resultado un aumento en la velocidad de reproducción del patógeno. Aun cuando la diferencia de la carga parasitaria observada en las distintas etapas de la cisticercosis por *T. crassiceps* pudiera explicarse por el ciclo biológico normal del parásito, muchos estudios han demostrado la influencia del sistema inmune en el desarrollo del cisticerco. En general, dichos trabajos habían buscado definir el papel de los anticuerpos y linfocitos T, sin embargo, las investigaciones relacionadas, recientemente han puesto especial atención en las células presentadoras de antígeno (CPAs), en particular en los macrófagos por su capacidad de sintetizar gran parte de las citocinas que definen el tipo de respuesta en las distintas etapas de la infección. La producción diferencial de estas citocinas por los macrófagos que se ha observado durante el curso normal de la cisticercosis crónica se atribuye principalmente a cambios en el estado de activación y/o a una activación diferencial como consecuencia de la influencia de citocinas presentes en el medio. Mediante la transferencia de macrófagos obtenidos de distintas etapas de infección a ratones sanos e infectados con el mismo parásito y sacrificados a las ocho semanas de infección se demostró un efecto distinto en el número de parásitos presentes en la cavidad peritoneal de los diversos grupos de animales receptores, lo que indica claramente la influencia de los macrófagos transferidos en el desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps*. Los animales que fueron transferidos con macrófagos provenientes de ratones con 6 y 8 semanas de infección resultaron ser los mayormente protegidos en comparación con los animales que fueron transferidos con macrófagos provenientes de otros momentos de la infección (0,2,4 y 12 semanas). El número parasitario mínimo observado en estos grupos se correlacionó con la producción más elevada de IFN- γ y óxido nítrico en comparación con el grupo control de ocho semanas de infección y de los demás grupos transferidos. Ello indica una activación clásica de los macrófagos en estos grupos de animales para adquirir funciones citotóxicas responsables de la restricción y/o eliminación del cisticerco. Los grupos receptores que presentaron mayor carga parasitaria se relacionan más con una disminución significativa del IFN- γ y por consiguiente de óxido nítrico que con el dominio de citocinas Th2 como IL-4, IL-6 e IL-10. Estos resultados sugieren que la diferencia en la velocidad de crecimiento del cisticerco se debió a la presencia de macrófagos con distintas capacidades, entre las que podrían destacar la producción diferencial de citocinas secretadas por dichos macrófagos y probablemente por el efecto de las citocinas presentes en el microambiente sobre estos fagocitos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 RESPUESTA INMUNE MEDIADA POR CELULAS

Gran parte de los microorganismos y moléculas ajenas que se introducen al cuerpo son rápidamente ingeridos y destruidos por las células fagocíticas quienes proveen una primera línea de defensa innata. Sin embargo, muchos patógenos han implementado estrategias para evadir su eliminación, por lo que en el transcurso de la evolución se han venido desarrollando mecanismos inmunológicos más eficientes como los que se presentan durante la respuesta inmune adaptativa. Esta última se ha dividido en humoral y celular dependiendo de los componentes del sistema inmune que intervengan en dicha respuesta. En la respuesta humoral el reconocimiento específico del antígeno está mediado por la unión de dicho antígeno a moléculas de anticuerpo secretadas, mientras que la inmunidad mediada por células se inicia con el reconocimiento específico del antígeno por las células T (Abbas et al., 1997). Los patógenos son accesibles a los anticuerpos sólo cuando están presentes en sangre y en espacios extracelulares, pero algunas bacterias, parásitos y todos los virus infectan y se replican dentro de las células donde no pueden ser detectados por estos. Por lo tanto, la eliminación de estos organismos la realizan los linfocitos T junto con los fagocitos, ambos responsables de la inmunidad celular. Esta diversidad de mecanismos inmunológicos es importante puesto que permite al sistema inmune responder de manera específica a un amplio rango de antígenos y microorganismos presentes en el ambiente.

Todas las respuestas inmunológicas inician con el reconocimiento de antígenos ajenos, lo

que conduce a la activación de los linfocitos que los identifican de manera específica y culminan en el desarrollo de mecanismos efectores destinados a su eliminación. Este reconocimiento consiste en la unión de los antígenos a receptores específicos presentes en los linfocitos maduros. Los linfocitos T expresan receptores alfa-beta/CD3 (TCR) que sólo reconocen secuencias peptídicas cortas expuestas en las superficies de otras células, por lo que son necesarias células accesorias como macrófagos, células dendríticas o linfocitos B consideradas todas ellas como las células presentadoras de antígeno (CPAs) profesionales capaces de capturar antígenos y digerirlos enzimáticamente. Los residuos peptídicos que resultan de esta digestión contienen los determinantes antigénicos o epitopes del antígeno, los cuales se unen a moléculas propias del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) formando un complejo que se expone sobre su membrana para que posteriormente puedan ser reconocidos por las células T e iniciarse una respuesta inmune. Las moléculas del MHC clase I se unen a péptidos de proteínas de generación endógena como las proteínas virales y son reconocidas por los linfocitos T CD8+ (linfocitos citotóxicos). Los antígenos exógenos como el material captado por una célula mediante endocitosis se procesan dentro de la célula y los péptidos resultantes son presentados por moléculas del MHC clase II reconocidos por los linfocitos T CD4+ (linfocitos cooperadores) (Weir y Stewart., 1993). El reconocimiento del antígeno por las células T es el estímulo inicial para su activación, la cual no es completa si en dicha interacción no participan por un lado las moléculas CD4 y/o CD8 que se encuentran presentes en la superficie de los linfocitos T y que reconocen a los antígenos del MHC clase II o de clase I respectivamente, y por el otro moléculas coestimuladoras como las B7 (CD80 y CD86) también presentes en las CPAs. Para que se genere una respuesta inmunológica, el antígeno no sólo debe ser

reconocido por linfocitos específicos, sino que dicho reconocimiento debe traducirse en señales bioquímicas intracelulares que conduzcan a la secreción de citocinas, a la proliferación y a la ejecución de funciones efectoras reguladoras o citolíticas por los linfocitos T (Paul, 1998). Existe además otra clase de moléculas accesorias presentes en la superficie de las células T que fortalecen las interacciones con las CPAs (i.e. receptores LFA-1, CD2) e intervienen también en eventos de señalización necesarias para una eficiente activación linfocitaria. Muchas funciones efectoras también requieren de la participación de otras células no linfoides (i.e. neutrófilos) o de otras moléculas como las del sistema del complemento. Por lo general además de la señalización generada por el contacto de células mediante sus ligandos y receptores, se requiere de otra clase de señales para que una respuesta inmune se inicie, desarrolle y resulte eficiente logrando que las células involucradas del sistema funcionen de forma sincronizada. Esto último se logra cuando entre ellas se lleva a cabo alguna forma de comunicación mediante el envío y recepción de señales solubles como las citocinas (Abbas et al, 1997).

A pesar de lo mucho que se conoce acerca del reconocimiento, procesamiento y presentación de antígenos así como de la proliferación celular, hasta ahora no han sido del todo aclarados los mecanismos reguladores que pueden encender, amplificar o apagar la respuesta inmune. La regulación de las respuestas inmunes específicas es un fenómeno complejo en el que el propio antígeno, las células accesorias y los linfocitos contribuyen de diversas maneras influyendo principalmente en la magnitud y naturaleza de dichas respuestas.

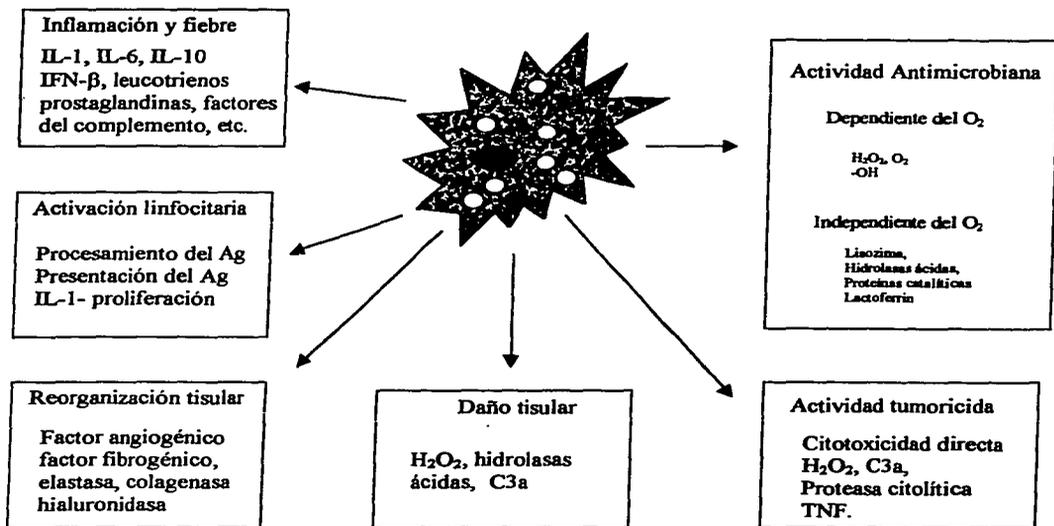
3.2 PAPEL DE LOS MACROFAGOS EN LA RESPUESTA INMUNE

Los macrófagos participan de una manera muy activa en la inmunidad innata como células fagocíticas por excelencia eliminando células muertas, anormales o infectadas. Estas actividades contribuyen en la defensa contra microorganismos invasores, partículas ajenas y otros inmunógenos que en muchos de los casos son fagocitados y destruidos de manera intracelular por la liberación de sustancias líticas directamente de los lisosomas mientras que en otros, el macrófago secreta productos tóxicos al medio para eliminarlos (Adams y Hamilton, 1988).

La participación de los macrófagos en la inmunidad innata en la eliminación de patógenos se complementa con las respuestas adaptativas tanto humorales como celulares y en los procesos inflamatorios mediante tres funciones principales: 1) actuando en el reconocimiento y presentación de antígenos (CPAs), 2) interviniendo en la activación y regulación de linfocitos T y B mediante la producción de citocinas y metabolitos del ácido araquidónico (leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas) y, 3) actuando como células efectoras y reguladoras de respuestas inmunológicas, liberando citocinas al medio con funciones autócrinas, parácrinas y endocrinas, y especies reactivas del oxígeno (superóxidos, peróxidos, radicales hidroxilo) y del nitrógeno (óxido nítrico) (Klebanoff, 1998).

Los macrófagos son células multipotenciales que se pueden activar por distintos estímulos y de ello dependerán las funciones que estos realicen. La activación de los fagocitos resulta en alteraciones cuantitativas en la síntesis de proteínas que le confieren la

capacidad de realizar distintas funciones, donde los agentes responsables de las modificaciones en la expresión génica son las citocinas solubles, productos de microorganismos como el lipopolisacárido (LPS) y moléculas de la matriz extracelular. Sin embargo, los requerimientos tanto bioquímicos como moleculares que activan muchas de las funciones de los macrófagos no están del todo aclarados a la fecha (Adams y Marino, 1984).



Esquema 1. Diversas funciones que realizan los macrófagos durante respuestas innatas y adaptativas (Moreno, 1996).

La habilidad de los fagocitos para presentar al antígeno eficientemente a los linfocitos T es una capacidad que depende de la eficiencia en la endocitosis y degradación de proteínas, del transporte de péptidos a la superficie y de su asociación con moléculas del MHC para poder expresarlos en la membrana plasmática, además de la expresión de moléculas coestimuladoras como B7 (CD80 y CD86) cuyo ligando llamado CD28 se encuentra en la superficie de los linfocitos T. La expresión de algunas de estas moléculas es inducida por algunas citocinas como el IFN- γ y por el LPS ya que los macrófagos en reposo carecen de ellas o están presentes en cantidades mínimas pero que son cruciales durante las respuestas inmunes adaptativas (Janeway et al., 1999).

Una vez activados los macrófagos son capaces de matar microorganismos. En la mayoría de los casos esta capacidad microbicida suele ser eficiente solamente con el estímulo del IFN- γ , sobre todo tratándose de bacterias. Los macrófagos de ratón tienen un segundo mecanismo microbicida importante pues expresan una sintetasa del óxido nítrico (NOS) que aumenta con el IFN- γ así como con el LPS, TNF o IL-1 que contribuyen a la eliminación de un espectro mayor de patógenos pues es capaz de inhibir, por ejemplo, la replicación viral. Además de destruir inespecíficamente los microorganismos que fagocitan o aquellos que los han infectado y de actuar como CPAs, los macrófagos tienen otras funciones importantes pues son fuente importante de citocinas y otras moléculas de secreción que participan en la respuesta inmune. Como consecuencia de la interacción de los ligandos con los receptores específicos presentes en su membrana, los fagocitos generan señales intracitoplasmáticas mediante segundos mensajeros que aumentan la síntesis de diversas proteínas y/o se inicia la producción de otras que son fundamentales en la activación, regulación, amplificación y polarización de la respuesta inmune. Pueden

entonces producir algunas sustancias inmunosupresoras como la IL-10, TGF- β y PGE₂ que actúan como moduladores de la actividad de algunas células que participan durante una respuesta inmunológica. Por ejemplo, el TGF- β suprime la producción de óxido nítrico y antagoniza los efectos de la IL-1 y TNF- α que producen los mismos macrófagos. Las prostaglandinas son un conjunto de ácidos grasos que actúan como moduladores de la respuesta. La PGE₂ por ejemplo, inhibe la estimulación del macrófago cuando es inducida por IFN- γ y puede regular negativamente la respuesta proliferativa de los linfocitos B e inhibir la expresión de moléculas del MHC clase II. La PGE₂ también es responsable de estimular a los linfocitos Th1 y promover la síntesis de GM-CSF y de otras citocinas y suprimir la respuesta proliferativa de los linfocitos T citotóxicos. Los macrófagos pueden además producir citocinas como la IL-12, IL-10 e IL-6 que intervienen en la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia cualquiera de los fenotipos de células T cooperadoras (Th1 o Th2) participando de esta manera en la polarización de respuestas inmunológicas y modulando la actividad del sistema inmune tras un reto antigénico lo cual es esencial para el desarrollo, resolución o persistencia de una enfermedad (García Tamayo, 1997).

3.3 BIOLOGIA DEL MACROFAGO

Los macrófagos como las demás células sanguíneas se originan en la médula ósea por una célula madre pluripotencial comprometida a diferenciarse a una estirpe celular (línea monocítica). Ahí, diferentes citocinas promueven su proliferación y maduración. Los macrófagos se encuentran en todos los tejidos del organismo y por su localización han recibido distintos nombres: microglía en el sistema nervioso central, células de Kupffer en las paredes vasculares de sinusoides hepáticos, osteoclastos en tejido óseo etc. (Abbas et al., 1997).

Los macrófagos son células fagocíticas admirablemente equipadas que les permite reconocer y eliminar inespecíficamente a una amplia gama de agentes infecciosos tanto de origen procarionte como eucarionte (intracelulares y extacelulares) (Nelson 1972; Edelson 1982). Presentan numerosos pseudópodos, un sólo núcleo lobulado reniforme, abundante citoplasma con gran cantidad de mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi abundante y un citoesqueleto altamente organizado. Tanto la complejidad del citoplasma como de sus organelos se incrementan dependiendo del estado de maduración y activación en que se encuentren (Fedorko y Hirsch, 1970). Aún en estado de reposo, los macrófagos son metabólicamente muy activos con una elevada síntesis de proteínas que puede ser alterada de manera muy importante por la interacción ligando-receptor (Adams y Hamilton, 1984; Nathan y Cohn, 1980). Tienen una vida media larga (meses) en comparación con otras células del sistema inmune (García Tamayo, 1997). Su superficie presenta una gran variedad de proteínas como son las moléculas clase I y II del complejo principal de

histocompatibilidad (MHC), receptores importantes para la endocitosis que reconocen diversos isotipos de inmunoglobulinas, componentes de la cascada del complemento, carbohidratos, lipoproteínas y otras proteínas, receptores para moléculas mediadoras como CSF-1, interferones, agentes adrenérgicos y colinérgicos etc. Además presentan moléculas B7 y receptores para LPS que ayudan a la unión y digestión de sustancias antigénicas, a la presentación del antígeno y a la activación de los linfocitos T (Gordon, 1986).

Los macrófagos son células secretoras y se conocen actualmente por lo menos 80 de los productos que sintetizan y liberan al medio (Unanue, 1986). Los macrófagos al ser activados producen diversas citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IL-8 y TNF- α , componentes del complemento, factores de necrosis tumoral (TNF), así como interferones (IFN) que funcionan como mediadores de la respuesta inmune celular (Adams y Marino, 1984). La capacidad para secretar estos productos depende principalmente del lugar en que residan, de su activación, de su encuentro con productos microbianos como LPS y su exposición a otras citocinas y otras moléculas inmunoreguladoras del microambiente. Los macrófagos pueden también producir varias sustancias inhibitoras con actividad autócrina o parácrina como la IL-10, TGF- β y prostaglandinas. Algunos de estas proteínas son secretadas constitutivamente pero la mayoría son liberados tras la interacción con el receptor específico (Unanue, 1986). Estos productos son secretados al medio por la fusión de vesículas o cuerpos residuales a la membrana. Los principales estímulos externos que activan a los macrófagos son los interferones, algunos factores estimulantes de colonias (i.e. CSF-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α). También son estimulados por algunas citocinas como la IL-2 e IL-3. Los macrófagos que han sido activados presentan

diferencias tanto en el número y tipo de proteínas expresadas en su membrana como a nivel del citoesqueleto adoptando diversas morfologías. También presentan diferencias en cuanto a la regulación del transporte, transducción, síntesis y expresión de proteínas, lo que permite definirles a estas células diversos estados de activación (Adams y Marino., 1984).

Una vez activados los macrófagos aumentan el metabolismo de sus mitocondrias, elevan su consumo de oxígeno, aumentan la oxidación de la glucosa, liberan grandes cantidades de metabolitos del oxígeno, multiplican el contenido de sus vacuolas lisosomales, aumentan la transcripción de los genes que codifican para los antígenos del MHC, de la expresión de algunas proteínas reguladoras y de la producción de enzimas proteolíticas. Sin embargo, para que el macrófago pueda desarrollar otra serie de funciones como la producción de óxido nítrico (potente microbicida), es necesaria una segunda señal como la proporcionada por el lípido A contenido en los lipopolisacáridos (LPS) o endotoxinas de las bacterias Gram negativas (Unanue, 1984).

En respuesta a cambios tisulares locales y vasculares parcialmente inducidos por macrófagos residentes durante una inflamación o por diversos estímulos inmunológicos, los monocitos son capturados (en grandes cantidades) en sitios bien localizados. Mediante diapédesis estos monocitos salen de la circulación y se diferencian en macrófagos inmunológicamente activos. Estos últimos presentan alteraciones en sus propiedades de superficie, secretoras y citotóxicas debido a la influencia de citocinas e interacciones de superficie con células endoteliales, leucocitos y otras células locales. Sin embargo, este mecanismo prevalece en gran parte desconocido. La apoptosis y necrosis de macrófagos y de otras células contribuyen en el equilibrio de su reclutamiento y proliferación durante una infección (Paul, 1998).

3.4 CITOCINAS

Las citocinas son definidas como pequeñas proteínas solubles secretadas por diversos tipos celulares tanto de la línea linfoide como de la mieloide que afectan el comportamiento y propiedades de la misma célula que la secretó (función autócrina) o de otras células (función parácrina y endócrina) formando una compleja red de interacciones de comunicación celular. Intervienen en la fase inductora y efectora de las respuestas inmunitarias e inflamatorias mediando así la inmunidad innata y la adquirida. Durante la inmunidad adquirida (específica) gran parte de las citocinas son secretadas por los fagocitos mononucleares estimulados por microorganismos y por las células T activadas. Su síntesis y liberación comienza con la activación de dichas células puesto que no se sintetizan de manera continua ni son almacenadas intracelularmente. Las citocinas normalmente influyen en la síntesis de otras citocinas produciendo cascadas bioquímicas e inclusive regulan los efectos biológicos de otras, iniciando su acción al unirse a receptores específicos en las superficies de las células diana. (Abbas et al., 1997).

Las citocinas pueden tener multitud de efectos biológicos diferentes y sus efectos varían dependiendo de la célula blanco. (Janeway et al., 1999). Las citocinas secretadas por los macrófagos actúan como moduladores de la actividad del sistema inmune, provocan la síntesis y liberación de linfocinas y factores de crecimiento (Finkelman, 1995), estimulan la síntesis de otras proteínas inductoras de las reacciones inflamatorias y propician algunas interacciones entre los sistemas neuroendócrino e inmunitario (García Tamayo, 1997), estimulan a los linfocitos Th1 y promueven la síntesis de GM-CSF y otras citocinas,

además suprimen la respuesta proliferativa de los linfocitos T citotóxicos. Ciertas citocinas secretadas por las células T cooperadoras promueven su proliferación lo que lleva a la expansión de clonas de linfocitos específicos, a la amplificación de la respuesta protectora y a su diferenciación hacia células que activen a los macrófagos o hacia células que lisen directamente aquellas células que produzcan antígenos extraños (Finkelman, 1995). Las citocinas también actúan como sustancias quimiotácticas que atraen y activan a otros leucocitos inflamatorios (i.e. neutrófilos y eosinófilos) proporcionando una importante conexión entre una respuesta inmune adquirida y la respuesta innata (Abbas et al., 1997).

Todas las citocinas se han clasificado de acuerdo a su función principal en: citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 e IL-6), citocinas reguladoras de la activación, diferenciación y proliferación de linfocitos T y B (IL-2, IL-4, TGF- β), citocinas que activan leucocitos inflamatorios (IFN- γ , IL-10 e IL-12) y citocinas que estimulan la expansión y diferenciación de las células progenitoras de la médula ósea (IL-3, IL-7, IL-9, IL-11 y el GM-CSF=factor estimulante de granulocitos y monocitos, M-CSF =factor estimulante de monocitos-macrófagos y G-CSF=factor estimulante de granulocitos) principalmente (Abbas et al., 1998)

3.5 OXIDO NITRICO

El óxido nítrico (NO), como otros derivados e intermediarios resultantes de las reacciones del nitrógeno (RNIs) y del oxígeno (ROIs) son moléculas tóxicas del sistema inmune que contribuyen al control de patógenos (virus, bacterias, hongos, protozoarios, helmintos) y de tumores. Existen muchas evidencias de las funciones adicionales de estos metabolitos en la inmunidad innata y adquirida. Estas funciones incluyen la regulación de la respuesta de los linfocitos T, regulación de la apoptosis en las células del sistema inmune además de sus funciones citotóxicas (Abbas et al., 1997).

El óxido nítrico es un gas producido de manera endógena por una variedad de células de mamíferos como los macrófagos. Es sintetizado por la oxidación de la L-arginina por una reacción compleja catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). La NOS convierte al aminoácido L-arginina y al oxígeno molecular en L-citrulina y NO y requiere como cosubstratos y cofactores al NADPH, FAD, FMN y BH4 (tetraidrobiopterina) (Klebánoff et al., 1998).

La NOS de los macrófagos (NOS2) es una isoforma inducible que está ausente en macrófagos en reposo y es fuertemente inducida y regulada por citocinas (IFN- γ y TNF- α) y por otros estímulos inmunológicos como los productos microbianos. Existen otras citocinas que inhiben su síntesis como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β alterando fuertemente el grado de expresión de esta enzima (MacMicking, et al., 1997). La regulación de la NOS puede ocurrir en múltiples niveles: - en la transcripción del gen que codifica para NOS2, en la estabilidad y transferencia del RNAm, en la disponibilidad de sustratos, cofactores y sustratos endógenos análogos que actúan como inhibidores y en la retroalimentación

negativa del NO como producto final. Más de 30 citocinas y factores similares han sido descritas para activar o inhibir la expresión de esta enzima en diferentes células del sistema inmune (Munder et al., 1998). Diversas investigaciones apoyan la idea de que ciertas citocinas como el IFN- α/β , IL-4 e IL-10 pueden tener efectos inhibidores y estimuladores en la producción de óxido nítrico por los macrófagos (Bogdan, 2000). El LPS es el principal ejemplo, el cual estimula la expresión de NOS en macrófagos de ratón. (Gao et al., 1998). El LPS usualmente sinergiza con el IFN- γ para la inducción de NOS2, pero también puede tener efectos antagónicos, dependiendo de la concentración y de la secuencia de la estimulación. Así como el LPS, otras lipoproteínas o endotoxinas bacterianas inducen la expresión de NOS en macrófagos y en otros tipos celulares que en algunos casos su acción es dependiente de la presencia de LPS o del IFN- γ (Braun et al., 1999; Flak y Goldman, 1999). Los macrófagos tratados solamente con IFN- γ son estimulados para producir NO y cuya producción es importantemente incrementada en combinación con otros agentes como el TNF- α , IL-2, etc. (Mullet et al., 1997) pues éstos elevan la expresión de la enzima catalizadora. Las acciones microbicidas y citotóxicas del NO son incrementadas por otras moléculas producidas por los mismos macrófagos como son el glutatión, cisteína, peróxido de hidrógeno o superóxidos. Existen algunos patógenos como *Leishmania* spp. y *Candida albicans* que inhiben la expresión de NOS2 (Nandan et al., 1999 ; Chinen et al., 1999). La actividad antimicrobiana de los RNIs ha sido estudiada en ratones transgénicos y se ha demostrado que: 1) un amplio espectro de agentes infecciosos (desde virus hasta helmintos) son directa o indirectamente controlados *in vivo* por RNIs y que, 2) la expresión de NOS no está restringida solamente a la inmunidad adquirida sino también en la inmunidad innata (Diefenbach, 1999).

El óxido nítrico regula una variedad importante de procesos biológicos incluyendo la neurotransmisión, citotoxicidad y transducción de señales (Fligger et al., 1999). Constituye uno de los principales mecanismos microbicidas de los macrófagos murinos (Panaro et al., 1999). El NO también inhibe la replicación viral por la interrupción del ciclo de vida de ciertos virus, además de ser un compuesto antiparasítico (Abbas et al., 1997). Existen evidencias que sugieren que la producción de NO es un importante mecanismo para la regulación de la función celular y para la comunicación inter e intracelular (Moncada S., 1991).

Junto con las prostaglandinas, la producción de NO es un mecanismo por el cual los macrófagos inhiben la respuesta proliferativa de los linfocitos T hacia antígenos y mitógenos. Ello también sirve para el control de procesos inflamatorios o para eliminar células T autoreactivas y para llevar a cabo funciones protectoras al hospedero (Bogdan, 2000). A la fecha, se sabe que el NO también afecta la producción de más de 20 citocinas (i.e. IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ y TGF- β) producidas por diferentes células del sistema inmune (macrófagos, linfocitos T, células NK) y por células endoteliales. Dependiendo de la concentración de NO, la producción de IL-12 por macrófagos se ha visto facilitada, inhibida o bien no afectada como lo sugieren diversos estudios (Huang et al., 1998).

El NO es un compuesto regulador de muchas funciones biológicas incluyendo la relación del número de células Th1/Th2. El NO puede inducir o bloquear el proceso de apoptosis en muchos tipos celulares. Efectos pro-apoptóticos se han observado con altas concentraciones de NO exógeno. Un mecanismo por el cual el NO exógeno induce apoptosis incluye la regulación positiva del receptor Fas (CD95) o su ligando en la superficie celular. Actualmente no existe duda de que los RNIs y ROIs además de tener

efectos citotóxicos, son parte integral de los mecanismos de señalización inmunológica, regulan las respuestas a citocinas, y contribuyen también al daño tisular como se ha observado en enfermedades autoinmunes o en otras formas de procesos inflamatorios crónicos.

3.6 POLARIZACION DE LA RESPUESTA INMUNE

En 1986, Mossmann y colaboradores comenzaron un nuevo concepto en inmunología dividiendo a las células T cooperadoras en dos subpoblaciones: Th1 y Th2, con perfiles de citocinas bien definidos ante una repetida estimulación antigénica *in vitro* de células T CD4+ de ratón. Las células del subtipo Th1 son aquellas que producen niveles altos de IL-2, IFN- γ , IL-18 y linfotóxina (TNF- β) y son responsables junto con otros factores de la respuesta inmune mediada por células o fagocítico-dependiente, que generan activación de macrófagos y promueven reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH), activación de células T CD8+ y activación de células NK (Mossmann y Coffman, 1989). Las células del subtipo Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que contribuyen a generar y mantener la respuesta inmune de tipo humoral o fagocítico-independiente, con proliferación y diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos principalmente de la clase IgG1 e IgE, inmunidad de las mucosas por células cebadas, inducción de la diferenciación y proliferación de eosinófilos y facilitación de la producción de IgA (Mossmann y Coffman, 1989; Doherty et al, 1993). Por otro lado existen citocinas como la IL-1, GM-CSF (factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos) y TNF- β que son producidos por ambos subtipos celulares. Una vez expandidas ambas subpoblaciones celulares, tienden a regularse de manera negativa y parecen ser excluyentes una de la otra mediante la acción de las citocinas liberadas. Actualmente está bien establecido que algunas linfocinas producidas por ambos fenotipos pueden ejercer interacciones reguladoras recíprocas. En particular, la IL-4 e IFN- γ , las principales

citocinas producidas por células Th2 y Th1 respectivamente, se oponen una a la otra. La IL-10 que es producida principalmente por células Th2 pero también por macrófagos y células B ejercen efectos reguladores negativos en algunas funciones de las células Th1 (Fiorentino et al, 1991). Por el contrario, el IFN- γ derivado de células Th1 así como la IL-12 e IFN- α que no son producidas por células Th1 pero que actúan como citocinas inductoras de éstas, regulan negativamente la función de las células Th2. El IFN- γ producido por células Th1 inhibe la proliferación de las células Th2 y la síntesis de algunas de sus citocinas (Mosmann y Sad, 1996). Otro ejemplo es el que se observa con la IL-13 que modula diversas funciones de los macrófagos, aumentando la expresión de integrinas y antígenos de MHC clase II, disminuye la producción de óxido nítrico, disminuye la producción de citocinas como la IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12 e IFN- α y la producción de algunas quimiocinas.

A través de diversas investigaciones, se sugiere que los fenotipos maduros Th1 o Th2 no están presentes entre la población de células T CD4+ vírgenes, sino que parecen diferenciarse de una misma célula precursora posterior a un primer evento de activación (Gajewski et al., 1994). No existe duda de que muchos clones de células T en respuestas inmunes *in vivo* muestran una dramática polarización hacia alguno de estos subtipos, y el hecho de que las células tipo Th1 y Th2 se diferencien de un ancestro común da lugar a estudios enfocados a conocer los diferentes factores que afectan estos mecanismos de diferenciación. Algunos de estos factores permanecen hasta ahora desconocidos pero existen otros que actualmente están bien definidos como son: naturaleza del antígeno (Wraith et al, 1989; DeMagistris et al, 1992; Kumar et al, 1995), dosis antigénica (Valderrama, 1999), vía de entrada del antígeno (Van den Eetweg et al, 1992), células

presentadoras de antígeno (Gajewsky et al, 1991) y sus moléculas coestimuladoras (June et al, 1994; Lenschow et al, 1996) y el microambiente de citocinas (Afonso et al., 1994; Magram et al., 1996).

A la fecha, no se ha esclarecido que es lo que condiciona el estado final de diferenciación de las células T CD4+ *in vivo*. A partir de los años noventa han sido publicados una serie de estudios que afirman que la proliferación de los tipos celulares Th1 y Th2 está influenciado de manera muy importante por el tipo de célula que presenta el antígeno (Gajewski et al, 1991). Se ha demostrado que las células adherentes (macrófagos y células dendríticas) inducen la proliferación de las células Th1 pero no de las células Th2. Por el contrario, los linfocitos B inducen proliferación en células Th2 pero no en células Th1 (William y Unanue, 1990). Los mecanismos por los cuales esto sucede no están del todo claros, pero podría ser posible que las distintas CPAs expresen cofactores especializados necesarios para la proliferación eficiente de un tipo celular, pero no para el otro. Es decir, que las células Th1 y Th2 tengan distintos requerimientos para el reconocimiento de la señal de proliferación proveniente de las CPAs. Sin embargo, también se reconoce que tanto los macrófagos, las células dendríticas y los linfocitos B, pueden inducir tanto una respuesta Th1 o Th2, influenciada por el propio ambiente de citocinas (Finkelman, 1995).

En particular, se ha puesto mucho énfasis en los macrófagos puesto que participan de diversas maneras en la activación y diferenciación de las células T, ya que funcionan como células accesorias necesarias para la presentación del antígeno por medio del complejo péptido-MHC expresado en su superficie para ser reconocido por el linfocito T por medio de su receptor TCR , por sus moléculas coestimuladoras presentes en su

membrana como B7-1 y B7-2 con sus ligandos CD28/CTLA-4 en linfocitos T y por ser fuente importante de citocinas de ambos perfiles (Th1 y Th2). Todas estas funciones pueden modificar el desarrollo de una respuesta inmune por diversos mecanismos. Por ejemplo, las moléculas coestimuladoras que más se han estudiado como posibles señales reguladoras son las moléculas B7/CD28/CTLA-4 (Gause et al., 1997). Diversas investigaciones sugieren que estas señales participan de manera importante en la regulación de estos eventos inmunológicos. Por tanto, el bloqueo de moléculas como B7-1 y/o B7-2, afectan el curso de algunas enfermedades autoinmunes o bien modifican la susceptibilidad a algunas enfermedades e infecciones como consecuencia de la alteración del fenotipo de las células Th0 hacia Th1 o Th2 (Kuchroo et al, 1995, Lenschow et al 1996). En 1994, Gajewsky y colaboradores proponen que de acuerdo a la transducción de la señal asociada al reconocimiento antigénico por el receptor de las células T y a la movilización de Ca^{++} intracelular es que la célula puede diferenciarse hacia Th1 o Th2. Actualmente es ampliamente aceptada la idea de que las citocinas son el factor principal y determinante para la polarización de la respuesta inmune. Se reconoce que las citocinas por sí mismas determinan la diferenciación de las células T vírgenes y probablemente de las células T de memoria. De manera global, la presencia o ausencia de las citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ en las distintas etapas de una infección es determinante para inducir una respuesta ya sea de tipo Th1 o Th2. Los macrófagos al ser activados secretan citocinas que afectan directamente esta diferenciación ya que son fuente importante de IL-6, IL-10 e IL-12. A pesar de que son varias las citocinas involucradas en la respuesta inmune (Th1 o Th2), existe la idea general tanto para modelos murinos como para humanos, que la IL-12 e IL-4 son la citocinas más

importantes en dirigir el desarrollo de células Th1 y Th2 respectivamente. La presencia de la IL-12, la cual es sintetizada principalmente por células presentadoras de antígeno como macrófagos y células dendríticas (Magrath et al, 1996) promueve la diferenciación de las células Th0 hacia el fenotipo Th1 pues estimula la síntesis y secreción de IFN- γ por las células T activadas e inhibe el desarrollo de células productoras de IL-4. La presencia de la IL-4 induce la diferenciación hacia el fenotipo Th2 (Afonso et al. 1994) ya que regula de manera negativa la respuesta Th1 de manera indirecta, dado que afecta la secreción de diversas citocinas por las CPAs (Swain et al, 1990). A pesar de todo, tanto la IL-12 como la IL-4 parecen ser las citocinas reguladoras más importantes de la diferenciación hacia alguno de los subtipos celulares, siempre y cuando estén presentes en etapas tempranas de la respuesta inmune (Nicholson y Kuchroo, 1996).

4. ANTECEDENTES

Las enfermedades parasitarias provocan enormes problemas a sus hospederos pues tienden a ser prolongadas, con montajes variados y muchas veces no exitosos de respuestas inmunológicas. Todos los parásitos tienen ciclos de vida complicados que por sus distintas etapas o por sus diferentes sitios de ocupación difieren antigénicamente unos de otros. Por lo tanto, el desarrollo de una infección es un proceso dinámico que depende de factores derivados tanto del microorganismo como del propio hospedero. Las respuestas del hospedero contra las estructuras antigénicas complejas de los parásitos tienen diversas manifestaciones y juegan un papel crucial en la susceptibilidad o resistencia hacia el agente infeccioso, lo que se correlaciona no sólo con la persistencia o resolución de la infección sino con la magnitud y duración del padecimiento. Es decir, no siempre ocasionan una completa inmunidad protectora. Por ello resulta de gran importancia estudiar los factores que controlan el desarrollo de dicha respuesta.

Las infecciones por parásitos frecuentemente resultan en respuestas dependientes de células T altamente polarizadas caracterizadas por el dominio de alguno de los fenotipos con perfiles de citocinas ya sea Th1 o Th2 (Jankovick y Gause, 2001). Durante la patología de algunas enfermedades parasitarias ya se han establecido algunas características generales de esta especificidad. Se ha concluido que para algunos virus y parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Reiner et al, 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (Martin et al., 1995) y *Plasmodium sp.* (Stevenson y Tam, 1993), la respuesta inmune es dependiente de Th1, esencial para su eliminación (Gessner et al., 1993; Miralles, et al. 1994; Kemp et al., 1993), mientras que una respuesta tipo Th2 es ineficiente y en

ocasiones facilitadora para el desarrollo del patógeno. En particular, *L. major* sobrevive dentro de los macrófagos y la resistencia del hospedero se asocia a la producción de IFN- γ y TNF por el subgrupo Th1, mientras que su diseminación se asocia a la estimulación de células Th2 con una producción elevada de IL-4. Otras infecciones como son las causadas por ciertas bacterias y algunos parásitos extracelulares como *Trichuris muris*, *Trichella spiralis* (Else y Grencis, 1991), *Trichinella spiralis* y *Necator americanus* (Pritchard, 1995), la respuesta inmune tipo Th2 generalmente confiere protección y la respuesta Th1 se ha visto favorecedora para el desarrollo del parásito (Reiner et al., 1993). En el caso de las infecciones crónicas se observa diferente puesto que aunque se genera la respuesta adecuada al inicio de la infección, puede existir un cambio a una respuesta no adecuada al persistir el microorganismo. Un ejemplo de lo anterior es la infección causada por *Taenia crassiceps*, donde se tiene bien definido que en etapas iniciales de la infección se establece una respuesta tipo Th1 restrictiva y en etapas avanzadas se genera un cambio a una respuesta tipo Th2 que favorece al cisticerco (Terrazas et al, 1998) haciendo mayormente susceptible al hospedero y el crecimiento parasitario se incrementa de manera importante. Este mismo patrón se ha descrito para infecciones causadas por *Mycobacterium leprae* (Rojas et al., 1994) y *Schistosoma mansoni* (Fallon, 2000).

El análisis de modelos murinos con enfermedades parasitarias que tienen una drástica polarización de la respuesta inmune ha ayudado a confirmar un gran número de conceptos relacionados con la diferenciación y función de los subgrupos de linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2), de los macrófagos y en particular el papel de las citocinas en ambos procesos.

A la fecha poco se conoce acerca de los eventos iniciales que gobiernan la diferenciación de células Th1 o Th2 durante una infección parasitaria *in vivo*, pero investigaciones

recientes sugieren que las funciones de las CPAs pueden ser importantes en estos procesos. La presencia de grandes cantidades de macrófagos en el sitio de la infección en estos modelos experimentales ha implicado de manera importante a estas células en la eliminación de parásitos y como mediadoras en la regulación de la respuesta inmune. Considerables estudios *in vitro* sugieren que los macrófagos son efectivos en eliminar estados larvales de parásitos causantes de filariasis (Allen et al, 2001). Uno de los mecanismos por lo cuales los macrófagos son capaces de dañar a un organismo que no pueden fagocitar es mediante la liberación de metabolitos derivados de las reacciones del oxígeno y del nitrógeno al medio como se ha visto en estudios donde *Brugia malayi* puede ser eliminado directamente por macrófagos activados con IFN- γ mediante la producción de NO (Thomas et al, 1994).

Mientras que el papel de los linfocitos T cooperadores (Th1 y Th2) ha sido bien aceptado y ampliamente considerado en la interpretación de las respuestas inmunológicas, recientemente la observación de que citocinas tienen efectos distintos en los macrófagos ha llamado la atención. Investigaciones relacionadas sostienen la existencia de dos tipos de activación de los macrófagos: la clásica y la alternativa. El IFN- γ y el LPS han sido identificados como los principales mediadores de la activación clásica de estos fagocitos. Este tipo de activación también está promovida por los efectos del TNF- α e IL-12. En contraste, la activación de macrófagos por agentes anti-inflamatorios como IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β se ha definido como una activación alternativa (Stein et al., 1992) e inhiben la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α por los macrófagos (Hart et al., 1989). Existen numerosas evidencias que demuestran que el

IFN- γ y la IL-4 son los agentes que producen una amplia gama de efectos antagonistas en los macrófagos, como es la expresión de receptores Fc γ (Becker y Daniel, 1990) inducida por el IFN- γ pero inhibida por la IL-4, mientras que la expresión del receptor de manosa (Cowan et al. 1992) en los macrófagos y de la 15-lipooxigenasa (Conrad et al., 1992) son inducidas por IL-4 pero inhibidas por el IFN- γ . Sin embargo, se ha observado que en algunos casos los efectos de ambas citocinas se sinergizan por ejemplo para la acumulación de CD23 citoplásmico o inhibición de la expresión de CD14. Investigaciones recientes indican que los macrófagos alternativamente activados (AAmo.) expresan un grupo especial de moléculas como proteínas de alto peso molecular (MS-1-HMWP) (Goerdts et al., 1993). La producción de NO por esta población de macrófagos es contrarrestada por el aumento en la expresión de la arginasa que compite con la NOS por la L-arginina como sustrato (Munder et al., 1998) y la producción de O₂ se encuentra también suprimida (Becker y Daniel, 1990). Todo esto parece indicar que los macrófagos alternativamente activados son una primera línea de defensa que no necesita generar una respuesta inmune tipo Th1 para funcionar. Además, estos macrófagos presentan un aumento en la expresión de moléculas del MHC clase II lo que las hace eficientes en la presentación de antígenos. Parece que estas células pueden ser capaces de inducir la diferenciación de las células T vírgenes a células Th antígeno-específicas, probablemente del tipo Th2 y de activar funciones efectoras asociadas a Th2 (Cua y Stohlman, 1997). Los macrófagos alternativamente activados se caracterizan por la expresión y síntesis de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y receptor antagonista de IL-1 y por la falta de expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12 (Bonder et al., 1998). En contraste con la activación clásica con IFN- γ que ocurre durante las fases

tempranas de inflamación (Topoll et al., 1989) y que está altamente encendida en granulomas, los macrófagos alternativamente activados están asociados con un alto grado de vascularización, por lo que se propone participan en la remodelación de tejidos dañados y en la regulación negativa de las respuestas inmunes como células supresoras de una respuesta tipo Th1. Las funciones supresoras de los macrófagos se han atribuido en diversos modelos experimentales, a los efectos inhibidores de la IL-10, PGE₂ o bien por el NO (Mills, 1991). Se sabe que el IFN- γ directamente inhibe la actividad supresora de los macrófagos (Boraschi et al 1984) y que el LPS se sinergiza con los ionóforos de Ca₂⁺⁺ para inducir la producción de TNF- α en macrófagos alveolares, indicando un cambio de diferenciación de macrófagos con activación alternativa a una clásica, por lo que es posible que los ionóforos de calcio contrarresten el desarrollo de la activación alternativa de los macrófagos. El concepto de una activación inmunológica alternativa de las CPAs ha facilitado el entendimiento de muchos resultados confusos acerca de las muy variadas funciones de las CPAs en diversos modelos experimentales. Tanto los macrófagos como las células dendríticas son activados de manera alternativa lo cual es muy importante en la regulación de los procesos de inflamación e inmunidad.

En estudios realizados con filariasis (Allen y Loke, 2001) se ha demostrado que los macrófagos clásicamente activados (CAmo.) por citocinas tipo Th1 son capaces de producir NO, mientras que los alternativamente activados por citocinas tipo Th2 no lo producen como lo sugieren estudios con *B. malayi*. Consistente con la idea de que el NO es una molécula clave en la función de los macrófagos, la distinción más clara entre ambas categorías es el distinto mecanismo metabólico para la L-arginasa, donde los macrófagos clásicamente activados la utilizan como sustrato para la producción de NO mientras que

los alternativamente activados la utilizan para la formación de ornitina y urea, lo que implica competencia, participación y funciones distintas entre ambos subgrupos celulares. La actividad principal de los CA_{Mo}. parece asociarse a la eliminación microbiana, mientras que la de los AA_{Mo}. a la regulación de la respuesta inmune. Por lo tanto, parece ser que los macrófagos, de manera similar a las células T y células dendríticas, tienen una heterogeneidad en su función y en sus mecanismos de desarrollo que resultan dependientes del microambiente de citocinas.

Además se sabe que los dos tipos de macrófagos suprimen por diversos mecanismos la proliferación de linfocitos T. Los macrófagos cocultivados con IL-4 y glucocorticoides *in vitro* suprimen la proliferación de células T por mecanismos independientes de NO, IL-10 o prostaglandinas mientras que los CA_{Mo}. como lo demuestran modelos con tripanosomiasis lo inhiben vía NO y prostaglandinas. Goedt y Orfanos (1993) demostraron que los macrófagos alternativamente activados (AA_{Mo}.), de manera similar a las células dendríticas tipo 2 (DC2) pueden inducir a los linfocitos T vírgenes a diferenciarse a células Th2. Los macrófagos clásicamente activados son comúnmente asociados con la inducción de respuestas tipo Th1, mientras que la producción de TGF- β e IL-10 por AA_{Mo}., ayudan a la generación y estabilización de respuestas tipo Th2 ya sea de manera directa o por la inhibición de la respuesta Th1 asociada con la inhibición de IFN- γ por células T, en lugar de una inducción de células productoras de IL-4, dirigido principalmente por TGF- β más que por la IL-10. Estas observaciones demuestran que los macrófagos pueden ser blanco de citocinas producidas por linfocitos T y actuar como reguladores en su diferenciación y en la polarización de las respuestas inmunológicas, así como agentes del cambio de una respuesta inicial a una final totalmente distinta. Es

decir, los macrófagos exhiben una complejidad de intervenciones funcionales y una vez que se establece una infección, el balance entre ambas "subpoblaciones" de macrófagos puede determinar el curso de la enfermedad asociada a la infección.

Por otro lado, en estudios con filariasis se ha demostrado que los AAmo. pueden ser generados por administraciones diarias de productos secretados por parásitos vivos adultos y no por la implantación de parásitos muertos. Taylor y colaboradores sugieren que parásitos muertos pueden causar la liberación de mediadores pro-inflamatorios por macrófagos. Sostienen que en parásitos muertos existe liberación de LPS dando lugar a la activación de CAmo cuyas citocinas llevan al desarrollo de Th1 así como a la inducción de daño por inflamación a los tejidos vecinos. En cambio, las respuestas Th2 inducidas y sostenidas por parásitos vivos lleva a un reclutamiento de AAmo. que pueden controlar dicha inflamación mientras se promueve de manera continua una respuesta tipo Th2. Mientras más parásitos son eliminados, el balance puede ser eventualmente promovido hacia una Th1 y los subsecuentes efectos inflamatorios darían lugar a una patología más severa asociada a una enfermedad crónica. Muchas respuestas inflamatorias inducidas por LPS son eficientes y relativamente rápidas en diversas infecciones en contraste con lo observado por infecciones crónicas. Otras enfermedades presentan un exitoso balance que da lugar a AAmo. a controlar los efectos inflamatorios de los CAmo. Este escenario tiene considerable semejanza al patrón de respuesta inducida durante infecciones causadas por *S. mansoni* y *T. crassiceps*, donde la respuesta inicial es una pro-inflamatoria Th1 y AAmo. aparecen disminuyendo la respuesta inflamatoria y promoviendo un encendido hacia una respuesta Th2. Se propone entonces que las citocinas presentes durante una infección darán lugar a una determinada proporción entre ambos "subgrupos" de macrófagos

requerido para eliminación de la patología asociada a muchas enfermedades parasitarias, a su destrucción, o a la generación de una respuesta que permita al hospedero sobrevivir aunque el patógeno persista, como en el caso de la cisticercosis crónica por *T. crassiceps*.

5. JUSTIFICACION

Durante los últimos años se han realizado gran cantidad de estudios destinados a aclarar algunos de los factores y mecanismos por los cuales una respuesta inmune puede polarizarse hacia una tipo Th1 o tipo Th2, esencial para el desarrollo y curso de una infección. Dentro de estos factores, se han propuesto a las células presentadoras de antígeno (CPAs) como factores participantes en la diferenciación y polarización de los linfocitos T CD4+ vírgenes (Gajewski et al, 1997). En particular, los macrófagos resultan ser células interesantes que además de funcionar como CPAs con una importante interacción con los linfocitos T, tienen la capacidad de secretar citocinas como IL-12, IL-6 e IL-10 y citotóxicos (i.e. óxido nítrico) entre muchos otros factores. El estado de activación de los macrófagos se ve modificado dependiendo del tiempo de la infección en que se encuentren, lo que se refleja no sólo en su morfología, sino en la presentación diferencial de marcadores de membrana y en la producción diferencial de las moléculas que sintetizan y liberan al medio (Calderón, 1999). Los diferentes estados de activación pudieran ser una influencia importante que determine el curso de la respuesta inmune, incidiendo por consiguiente en el desarrollo, crecimiento y establecimiento del agente infeccioso con efectos importantes en la susceptibilidad o resistencia hacia el mismo.

Por lo tanto, utilizando un modelo murino de cisticercosis crónica causada por *T. crassiceps* donde se tiene bien definido que la respuesta inmune se polariza en etapas tempranas hacia una respuesta de tipo Th1 que resulta restrictiva para el cisticerco y que durante etapas tardías existe un cambio hacia una respuesta de tipo Th2 favorecedora para

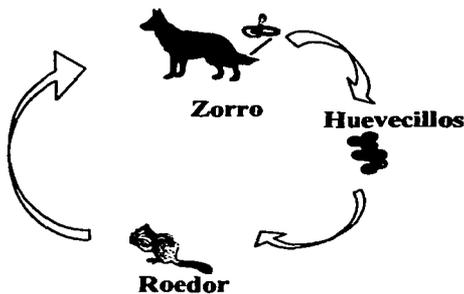
el establecimiento del parásito (Terrazas et al., 1998), resulta interesante estudiar por un lado, si las variaciones en el estado de activación de los macrófagos participan en el tipo de respuesta generada en las diferentes etapas de la cisticercosis y, por otro el otro si los macrófagos de distintos tiempos de infección modifican la susceptibilidad al cisticerco.

6. MODELO EXPERIMENTAL

Un modelo murino de cisticercosis causada por *T. crassiceps* permite evaluar hipótesis y realizar experimentos que en los seres humanos no serían viables, además de que presenta diversas ventajas que hacen posible el estudio de las respuestas inmunológicas y relaciones hospedero-parásito. Al igual que otras enfermedades parasitarias, la cisticercosis es una enfermedad crónica en donde el parásito permanece por largos períodos sin que se monte una respuesta inmunológica por parte del hospedero capaz de eliminarlo. El cisticerco tampoco parece hacer daño importante ni pone en riesgo la supervivencia de su hospedero debido a su baja capacidad patogénica (Bojalil, 1994). Este modelo ofrece la posibilidad de realizar un número importante y significativo de experimentos gracias a los ciclos biológicos de ambos organismos. La reproducción del ratón es elevada y rápida y la del parásito se lleva a cabo por gemación permitiendo un alto índice de crecimiento en la cavidad peritoneal del ratón (Larralde et al, 1989).

Por ser *Taenia crassiceps* un parásito macroscópico ofrece ventajas de manejo en el laboratorio y es un organismo seguro que no infecta al hombre pero que tiene una importante identidad antigénica con *Taenia solium* lo que hace posible extrapolar y aportar

conocimientos a la cisticercosis humana (Huerta et al, 1992). Este modelo facilita el estudio, análisis y medición de parámetros biológicos tanto *in vivo* como *in vitro* que participan en la inducción de susceptibilidad y resistencia (Chernin, 1975). Permite además, obtener grandes cantidades de antígenos del parásito (Larralde et al., 1989, 1990; Sciutto et al, 1990) imprescindibles para el numeroso manejo de animales. La inoculación periódica de ratones con cisticercos de *T. crassiceps* por vía intraperitoneal permite el crecimiento y mantenimiento del parásito por medio de pases dentro del mismo laboratorio. *T. crassiceps* es un platelminto cuyo estado adulto se encuentra normalmente en el intestino de la zorra roja Europea y Norteamericana (Toledo et al., 1997). Su estado larval o de cisticerco (*Cysticercus longicollis*) se desarrolla en pequeños roedores quienes adquieren la infección por la ingestión de los huevecillos de las heces de las zorras. En los roedores los huevos se desarrollan a cisticercos multiplicándose asexualmente por gemación (Freeman, 1962). El ciclo se completa al ser estos roedores infectados presa de otras zorras. (Brusca y Brusca, 1990; Toledo, 1997).



Esquema 2. Ciclo de vida de *T. crassiceps*. Tomado de Brusca y Brusca, 1990.

7. OBJETIVOS

Objetivo General

Demostrar si las variaciones en el estado de activación de los macrófagos participan en el tipo de respuesta observada en las diferentes etapas de una cisticercosis crónica y si los macrófagos de distintos tiempos de la infección modifican la susceptibilidad del hospedero al cisticerco de *T. crassiceps*.

Objetivos Particulares

- Relacionar el perfil de citocinas producido por macrófagos peritoneales y el tipo de respuesta observada en distintos tiempos de una cisticercosis crónica causada por *T. crassiceps*.

- Determinar variaciones en el estado de activación de macrófagos peritoneales provenientes de distintos momentos de la cisticercosis mediante la producción diferencial de citocinas y óxido nítrico y su relación con la carga parasitaria.

- Determinar si la transferencia de macrófagos peritoneales provenientes de distintos tiempos de la cisticercosis influye en el desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps*.

- Contribuir a la definición de los mecanismos restrictivos o favorecedores que participan en la susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps*.

8. HIPOTESIS

Los macrófagos como células presentadoras de antígeno y como células efectoras durante la respuesta inmune específica, pueden influir en la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes hacia algunos de los fenotipos ya sea Th1 o Th2 por diversos mecanismos. Debido a la activación diferencial que sufren los macrófagos por las distintas citocinas del microambiente y/o por presentar modificaciones en su estado de activación dependiendo del tiempo de infección al que pertenezcan durante el transcurso de una cisticercosis crónica, contribuirán de manera importante en el desarrollo de respuestas inmunológicas distintas que favorezcan o restrinjan el establecimiento de un agente infeccioso determinado. Por lo tanto, si son transferidos macrófagos de diferentes momentos de infección y distintos estados de activación a ratones sanos y tras ocho semanas de infección con el mismo parásito, tendrán un efecto diferencial en la susceptibilidad o resistencia hacia dicho parásito modificando así la carga parasitaria en la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones.

9. MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratones hembras de la cepa Balb/c de 6 a 8 semanas de edad lo cuales se dividieron en 3 grupos experimentales: 1) ratones sanos como grupo control (N) 2) ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps*, y 3) ratones transferidos con macrófagos provenientes de distintos tiempos de infección (0, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas) e infectados posteriormente con el mismo parásito.

Parásitos. Se utilizaron metacéstodos de *T. crassiceps* cepa ORF extraídos de la cavidad peritoneal de hembras Balb/c con 10 semanas de infección. Los cisticercos se lavaron cuatro veces en solución salina (PBS; 0.15 M NaCl, 0.01 M buffer de fosfatos, pH 7.2) y fueron seleccionados para la inoculación de los ratones.

Infección por *T. crassiceps*. Los ratones del segundo grupo fueron inoculados con 25-30 cisticercos de 2 mm. de tamaño y sin gemas, por vía intraperitoneal con jeringa de insulina de 1 ml usando 0.5 ml de PBS como vehículo. Los ratones del tercer grupo se inocularon de manera similar ocho días después de haber sido inyectados con macrófagos de diferentes semanas de infección. Los tres grupos experimentales fueron mantenidos bajo las mismas condiciones de bioterio (temperatura, alimentación, luz etc.)

Obtención de macrófagos peritoneales. Se extrajeron los fagocitos de la cavidad peritoneal de los ratones infectados a distintos tiempos (0,2,4,6,8 y 12 semanas de infección), y de los ratones sanos. Brevemente, al grupo de ratones sanos destinados para la transferencia de macrófagos de 0 semanas de infección se les inyectaron 5 ml de medio de tioglicolato al 3% estéril por vía intraperitoneal en dos sesiones: 5 días y 24 h. antes de ser sacrificados para inducir la migración de los macrófagos hacia el peritoneo irritado por la inyección de este medio. Todos los ratones de los tres grupos experimentales se sacrificaron por dislocación cervical y se les administraron 5 ml de PBS estéril a temperatura ambiente por vía intraperitoneal. Bajo condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar), se introdujo una jeringa de 5 ml en la cavidad peritoneal sin dañar vísceras y se extrajeron los macrófagos suspendidos en la solución anteriormente inyectada. Las muestras se colocaron en tubos de fondo cónico y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100 U de penicilina/estreptomicina, 2 mM de glutamina, 25 mM de buffer de HEPES y 1% de aminoácidos esenciales (GIBCO, BRL Grand Island, NY, USA). Las muestras se colocaron en cajas de Petri con 4 ml adicionales de medio RPMI y se incubaron en estufa a 37°C con 15% de CO₂ para permitir la adherencia de los macrófagos a la superficie plástica. A las 24 horas se lavaron los cultivos con medio RPMI suplementado para la eliminación de las células no adherentes. Los macrófagos adheridos se obtuvieron por medio del raspado de la superficie de las cajas con un gendarme y se les añadió 1 ml del mismo medio. Parte de las muestras se utilizaron para la transferencia de macrófagos a ratones sanos con excepción de las células obtenidas de los ratones sanos (N) por lo que las

células se ajustaron a 1×10^6 cel/ml mediante el conteo en cámara de Neubauer. El resto de las muestras se cultivaron y fueron estimuladas con LPS para la determinación posterior de citocinas, incluyendo a los macrófagos obtenidos de ratones sanos. Este procedimiento se realizó de la misma manera con los ratones que fueron transferidos con macrófagos extraídos de distintos tiempos de la infección y las muestras obtenidas se utilizaron únicamente para la determinación de citocinas.

Estimulación de macrófagos con LPS. Una vez ajustado el número de macrófagos (1×10^6 cel/ml), en una placa para cultivo celular de 24 pozos (Costar) se colocaron 0.5 ml del sobrenadante de cultivos de macrófagos de todos los grupos de ratones, y se les añadió 0.5 ml de LPS (lipopolisacárido) a una concentración de $2 \mu\text{g/ml}$. Se dejaron incubar durante 48 h. y se cosecharon los sobrenadantes en tubos Eppendorf y se mantuvieron en congelación hasta su uso. Este proceso se realizó bajo condiciones de esterilidad.

Transferencia de macrófagos. Cada vez que se fueron obteniendo los macrófagos peritoneales de ratones en distintos tiempos de infección (2,4,6,8 y 12 semanas), se les observó al microscopio para determinar su viabilidad y se les ajustó a 1×10^6 células en un ml de RPMI suplementado. Con jeringa de insulina, se tomó 1 ml de la muestra de macrófagos y se transfirieron a ratones sanos por vía intraperitoneal. Al cabo de una semana, estos mismos ratones fueron inoculados con 25-30 cisticercos de *T. crassiceps* y se dejó transcurrir la infección por 8 semanas. Posteriormente fueron sacrificados para la obtención de macrófagos peritoneales.

Determinación de citocinas en sobrenadantes (IL-6, IL-12 e IL-10): Se determinó la producción de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos estimulados con LPS de los tres grupos experimentales. La medición se realizó mediante la técnica de ELISA-Sandwich. En placas de 96 pozos (High binding, Costar) se colocaron 50 µl por pozo del anticuerpo de captura (purified anti-mouse IL-10, IL-12 e IL-6) diluido en buffer de bicarbonato 0.1 M, pH 8.2, a una concentración de 2 µg/ml y se dejaron incubar por una noche a 4°C. Se lavaron dos veces con PBS Tween 0.05% y se bloquearon con 50 µl de PBS-BSA (PBS con albúmina) al 3% a temperatura ambiente durante 2 h. Se lavaron nuevamente y se realizó la curva por duplicado con citocinas recombinantes (Pharming). La curva se comenzó con una concentración de 4000 pg/ml y se hicieron ocho diluciones seriadas 1:1 hasta tener una concentración final de 15.6 pg/ml. Al resto de la placa se les colocaron 50 µl de PBS/BSA al 3% y 50 µl de cada muestra y se dejaron incubar toda la noche a 4°C. Se lavaron y se agregaron 50 µl/pozo del anticuerpo biotilnado diluido en PBS/BSA a una concentración de 1 µg/ml, Se dejaron incubar durante 45 min. a temperatura ambiente y se agregaron 50 µl de estreptoavidina peroxidasa diluida 1:1500 en PBS/BSA al 1%. Se incubaron durante 30 min. y se lavaron. Las placas se revelaron con 50 µl de sustrato ABTS (revelador). Las placas fueron leídas a los 30, y 60 min. a 405 nm en lector de ELISA (Metertech S. 960).

Determinación de citocinas en sueros (IL-4 e IFN-γ): Se obtuvo sangre periférica del plexo venoso retroorbital de todos los ratones. La sangre se dejó coagular durante 1 h. a

37°C. Las muestras se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. y se congeló el suero hasta su uso. La determinación de las citocinas se realizó mediante la técnica de ELISA-Sandwich de igual manera como se describió para la detección de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Determinación de óxido nítrico por el método de Greiss : La detección de óxido nítrico se realizó en todos los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos de todos los grupos experimentales y controles. Brevemente, se mezclaron volúmenes iguales de Solución A (0.1% dehidrocloruro de naftildietilenediamina en agua destilada) y Solución B (5% de sulfanilamida en H_2PO_4 al 5%) para obtener el reactivo de Greiss. En placas de 96 pozos (Costar) se realizó una primera curva de $NaNO_2$ (1M) con 10 diluciones seriadas 1:1 y una segunda curva de $NaNO_2$ (10 M) igualmente con 10 diluciones seriadas 1:1. Al resto de los pozos se les agregaron 100 μ l/pozo de las muestras y 70 μ l del reactivo de Greiss. Las placas se dejaron incubar a temperatura ambiente por 10-15 min. La reacción colorimétrica se detectó a 550 nm en espectrofotómetro (Technika).

Determinación de la carga parasitaria: Se realizó el conteo del número de cisticercos presentes en la cavidad peritoneal de los ratones infectados a distintos tiempos de la infección (2,4,6,8 y 12 semanas) y de los ratones transferidos después de 8 semanas de infección con la finalidad de establecer la cinética del crecimiento parasitario.

Análisis Estadístico: Las comparaciones entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante el uso de la prueba estadística de la U de Mann-Whitney. Se consideraron estadísticamente significativas las comparaciones con valores de $p < 0.05$.

10. RESULTADOS

CINETICA DEL CRECIMIENTO PARASITARIO. Para poder definir el patrón de desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps* durante el curso normal de una infección crónica, se determinó el número de parásitos presentes en la cavidad peritoneal de ratones sacrificados a distintos tiempos (2,4,6,8 y 12 semanas). Los resultados de la cinética (Fig. 1) mostraron a las dos semanas de la infección un total aproximado de 100 cisticercos, incrementando cuatro veces el número de parásitos inoculados. La carga parasitaria aumentó de manera continua hasta la sexta semana de infección donde se encontró una media de 250 cisticercos. Después de dos semanas (semana 8) se observó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la tasa de crecimiento de modo que el número de parásitos se vio importantemente incrementado (aproximadamente 800 cisticercos) en la cavidad peritoneal de los ratones. Hacia la doceava semana de infección se presentó otro incremento muy importante en el índice de crecimiento del cisticerco logrando un número promedio de hasta 2700 parásitos, de manera que en este tiempo se registró tres veces más la carga parasitaria que el encontrado en el grupo precedente. Por lo tanto, se observó sin lugar a dudas, un cambio en la velocidad de crecimiento o reproducción del parásito entre etapas iniciales y avanzadas de la infección.

Crecimiento parasitario en distintos tiempos de infección

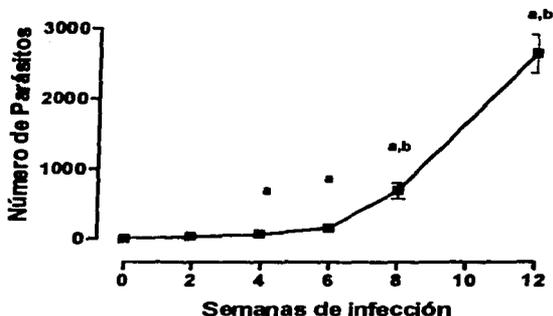


Fig. 1 Cinética de la parasitemia causada por *T. crassiceps*. Número de parásitos presentes en la cavidad peritoneal de ratones sacrificados a distintos tiempos de la infección (0, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas). Los datos que se ilustran representan el promedio \pm ES de al menos 10 ratones por grupo en cada punto de la gráfica, a= $p < 0.05$ con respecto a cero, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente.

CARACTERIZACIÓN DE MACROFAGOS EN DISTINTOS TIEMPOS DE INFECCIÓN.

Para determinar la existencia de modificaciones en el estado de activación de los macrófagos y establecer una relación con el desarrollo y tipo de respuesta generada en las distintas etapas de la cisticercosis crónica y su efecto en la susceptibilidad al parásito, se determinó la producción de citocinas sintetizadas por los macrófagos peritoneales en los distintos tiempos de la infección.

Producción *in vitro* de citocinas en sobrenadantes de cultivos celulares (IL-12, IL-6 e IL-10). Como refiere la Fig. 2, los macrófagos peritoneales extraídos de ratones sin infección produjeron niveles medios de 500 pg/ml de IL-12 al ser estimulados con LPS. Niveles similares se encontraron en cultivos de macrófagos extraídos de 2 y 4 semanas de infección. En los cultivos con macrófagos de 6 semanas se observó un descenso estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en la producción de esta citocina, de manera que sólo se detectó aproximadamente la mitad (250 pg/ml) de los niveles producidos por los fagocitos de semanas anteriores. Los niveles de IL-12 continuaron descendiendo gradualmente conforme la infección se tornó crónica observando los niveles más bajos durante la semana 12 (150 pg/ml).

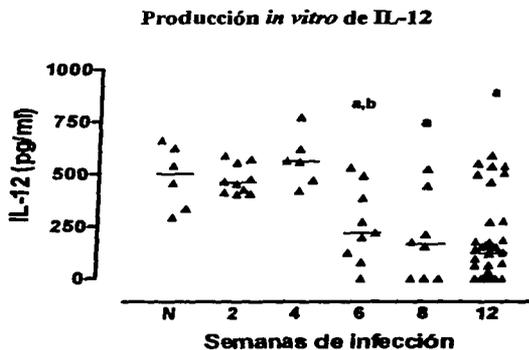


Fig. 2 Producción *in vitro* de IL-12 por macrófagos peritoneales estimulados con LPS extraídos de ratones sanos (N) y de 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección. Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo y la barra equivale a la mediana. a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente.

Lo anterior indica que conforme transcurre el tiempo de infección, los macrófagos pierden capacidad de producir IL-12, lo que pudiera relacionarse con un aumento en la carga parasitaria según lo muestra la Fig. 1.

Por otro lado, se observó que tanto los macrófagos extraídos de ratones sanos como los macrófagos obtenidos de las primeras dos semanas de infección no produjeron IL-6 aún en presencia de LPS. Sin embargo, esta citocina comenzó a detectarse en macrófagos pertenecientes a la semana 4 de infección (1500 pg/ml aproximadamente), y sus niveles se incrementaron importantemente ($p < 0.05$) en macrófagos de seis semanas donde se registraron las concentraciones más elevadas con una media de 12000 pg/ml. Los macrófagos de las semanas 8 y 12 produjeron menores cantidades de IL-6 pero con respecto a los niveles producidos por macrófagos obtenidos de etapas tempranas continuó

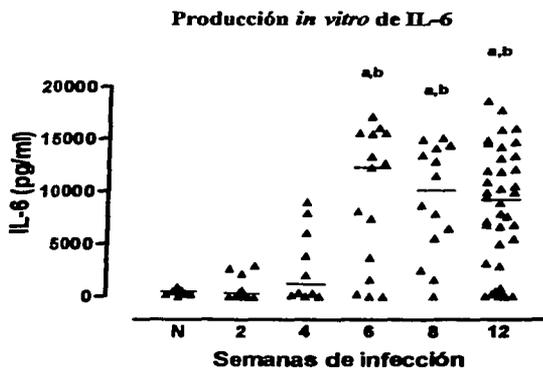
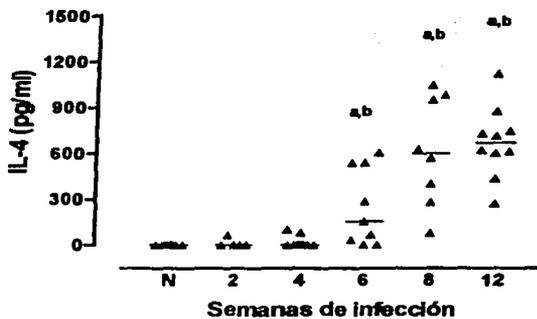


Fig. 3 Producción *in vitro* de IL-6 por macrófagos peritoneales estimulados con LPS y extraídos de ratones sanos (N) y de ratones de 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección. Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo, a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente.

Estas concentraciones se sostuvieron de manera similar por macrófagos de 4, 6 y 8 semanas de infección. Sin embargo, aquellos fagocitos de 12 semanas fueron lo que produjeron los niveles máximos con una media de 700 pg/ml, logrando casi el doble de las concentraciones descritas tras ocho semanas de infección. Por lo tanto, la producción de IL-10 por los macrófagos peritoneales se estimuló desde el inicio de la infección y se mantuvo durante ocho semanas de la misma para aumentar a las 12 semanas. La IL-10 al igual que la IL-6 se produjo en mayor cantidad en macrófagos pertenecientes a etapas avanzadas de la infección.

Determinación de citocinas en sueros (IL-4 e IFN- γ). Debido a que las citocinas presentes en circulación tienen una influencia importante en la estimulación y activación de los macrófagos, se realizó la determinación de IL-4 e IFN- γ mediante la técnica de ELISA- Sándwich en suero obtenido de sangre periférica del plexo retroorbital de ratones de diferentes momentos de la infección. Los datos de la Fig. 5 A indican que durante las primeras semanas de infección (2 y 4 semanas) no se registraron niveles de IL-4, sin embargo comenzaron a existir concentraciones mínimas aproximadamente de 150 pg/ml a partir de la semana 6 de infección, aumentando significativamente ($p < 0.05$) y alcanzando los niveles más altos (750 pg/ml) hacia la semana 12. Se observó claramente que esta citocina no es producida durante etapas tempranas de la cisticercosis, mientras que durante etapas avanzadas la producción de IL-4 es significativa y se mantiene elevada hasta el final de la infección con tendencia a

A) Concentraciones de IL-4 en suero



B) Concentración de IFN- γ en suero

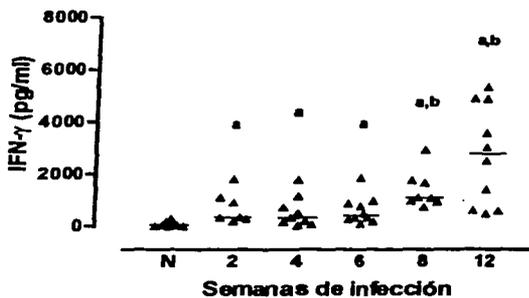


Fig. 5 Concentración de IL-4 (A) e IFN- γ (B) determinados en suero de ratones sanos (N) y de ratones de 2,4,6,8 y 12 semanas de infección. Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo. a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente.

incrementar conforme se torna crónica la infección.

A diferencia de la IL-4, se registraron concentraciones mínimas de IFN- γ (Fig. 5 B) en ratones sanos de 200 pg/ml aproximadamente que aumentaron significativamente ($p < 0.05$) durante las dos primeras semanas de infección con valores cercanos a los 500 pg/ml. Estos niveles se mantuvieron constantes hasta la semana 6 e incrementaron significativamente ($p < 0.05$) durante la semana 8 (1800 pg/ml), logrando sus máximos niveles hacia la semana 12 de infección con una media de 3000 pg/ml.

PRODUCCION *IN VITRO* DE OXIDO NITRICO. Se determinó la producción de óxido nítrico por macrófagos de ratones sanos y de distintos tiempos de la infección (2,4,6,8 y 12 semanas) mediante el reactivo de Greiss. Los cultivos celulares fueron estimulados durante 48 horas con LPS. La figura 6 muestra que los macrófagos obtenidos de ratones sanos al ser estimulados con LPS produjeron concentraciones de aproximadamente 1 μM , mientras que los ratones tratados con tioglicolato, con la finalidad de promover la migración de macrófagos a peritoneo, produjeron los niveles más altos registrando una concentración media de 5.0 μM . Ello sugiere que el LPS en presencia de dicho compuesto tuvo mayor capacidad de estimular la producción de NO que el LPS solamente. Los macrófagos de distintos tiempos de la infección aumentaron la producción de NO en presencia del patógeno. Los macrófagos obtenidos de semanas

tempranas produjeron aproximadamente el doble de la cantidad producida por los controles (N), mientras que los obtenidos de 6 y 8 semanas produjeron los niveles más altos de este citotóxico con respecto a los demás. Los macrófagos obtenidos de semanas más tardías (12 semanas) disminuyeron su producción logrando niveles similares a los observados por macrófagos de 2 y 4 semanas.

Con estos resultados se confirma una producción diferencial de todas las citocinas determinadas tanto en sobrenadantes de cultivos de macrófagos como en sueros, distinguiendo por lo tanto modificaciones en el estado de activación de los macrófagos dependiendo del momento de la infección al que pertenecieron.

Producción *in vitro* de óxido nítrico

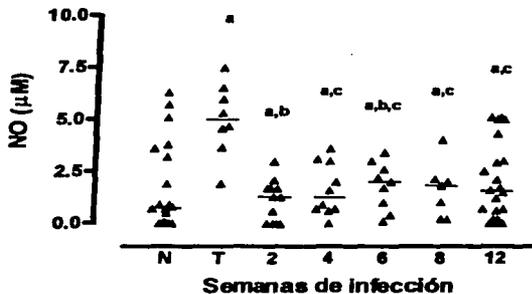


Fig. 6 Producción *in vitro* de NO por macrófagos peritoneales estimulados con LPS y extraídos de ratones sanos (N), de ratones estimulados con tioglicolato (T) y de ratones de 2, 4, 6, 8 y 12 semanas de infección. Se midió la concentración de nitritos existente en los SN de cultivos celulares mediante el reactivo de Greiss. Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo. a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente y c= $p < 0.05$ con respecto a T.

Por consiguiente, para conocer si estas variaciones pudieron influir de manera importante en los cambios de susceptibilidad que se describieron en la cinética parasitaria (Fig. 1) se realizó la transferencia de dichos macrófagos a ratones sanos desafiados posteriormente con el mismo parásito y se observó su efecto en la carga parasitaria.

EVALUACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA EN RATONES TRANSFERIDOS.

Según refieren los datos de la gráfica 7, en el grupo control (C) de ocho semanas de infección y sin transferencia de macrófagos se registró un total aproximado de 550 cisticercos (dato congruente con el registrado en la Fig. 1) y similar al registrado en ratones transferidos con macrófagos provenientes de ratones sanos (0 semanas). La susceptibilidad hacia el parásito prácticamente fue la misma en los animales transferidos con macrófagos provenientes de etapas iniciales de la infección donde el número de cisticercos disminuyó de manera no significativa a una media de 500 cisticercos en los animales transferidos con células obtenidas de 2 semanas de infección y a 450 cisticercos aproximadamente en ratones con macrófagos de 4 semanas. Sin embargo, en ratones transferidos con macrófagos provenientes de 6 semanas de infección, mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el número de parásitos (150 cisticercos) y se observó mayormente restringido dicho crecimiento en los transferidos con macrófagos de 8 semanas, con un efecto protector evidente en estos grupos de animales. En contraste, los ratones receptores de macrófagos provenientes de 12 semanas de infección se mostraron más susceptibles hacia el parásito con respecto a los animales

transferidos con macrófagos de etapas intermedias de infección (6 y 8 semanas) de manera que se registró una media cercana a 400 cisticercos, que con respecto a los animales control y los transferidos de etapas iniciales (2 y 4 semanas) fue ligeramente menor, sin conferir protección. Estos datos muestran entonces que los macrófagos de diferentes momentos de la infección influyen y participan de manera distinta e importante en el desarrollo del cisticercos de *T. crassiceps*.

Crecimiento parasitario a las ocho semanas de infección

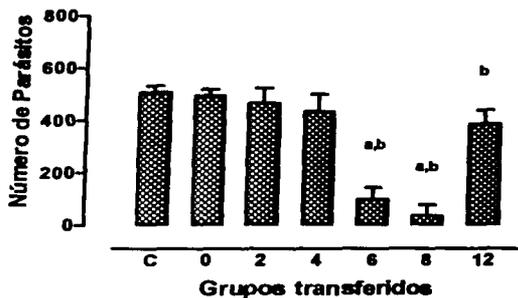


Fig. 7 Número de parásitos presentes en la cavidad peritoneal de ratones infectados (C) y de ratones transferidos con macrófagos de diferentes tiempos de infección (0,2,4,6,8 y 12 semanas) a las ocho semanas de infección. Las barras muestran el promedio \pm ES de por lo menos 10 ratones por grupo. $a=p<0.05$ con respecto a C, $b=p<0.05$ con respecto al grupo precedente.

DETERMINACION DE CITOCINAS EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS CELULARES DE RATONES TRANSFERIDOS. Con la finalidad de establecer:

una relación directa entre el número de parásitos y el perfil de citocinas secretadas y la producción de NO por macrófagos transferidos de distintos momentos de la infección, 2) el patrón de citocinas producidas y el tipo de respuesta observada en las distintas etapas de la infección y, 3) relación entre la producción de citocinas y NO durante el curso normal de una cisticercosis crónica y la producción de los mismos factores tras la transferencia de los macrófagos, se realizó la determinación de IL-12, IL-6 e IL-10 en sobrenadantes de cultivos celulares. Los resultados de la Fig. 8 indican que los niveles de IL-12 producidos por macrófagos de animales sin infección (N) (500 pg/ml) fueron mayores a los producidos por macrófagos de animales infectados y no transferidos (C) (250 pg/ml) tal como se observó durante el curso normal de la

Producción de IL-12 a las ocho semanas de infección

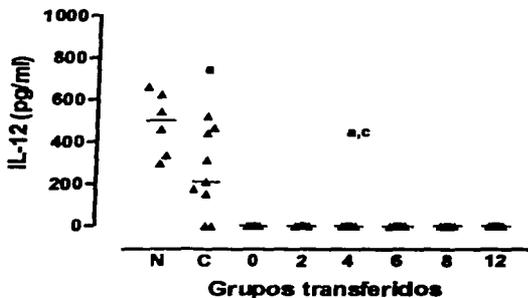


Fig. 8 Producción *in vitro* de IL-12 por macrófagos peritoneales estimulados con LPS y extraídos de ratones sanos (N), de ratones infectados (C) y de ratones transferidos con macrófagos provenientes de distintos tiempos de infección (0,2,4,6,8 y 12 semanas) tras ocho semanas de infección. Los puntos de cada gráfica representan a un solo individuo. **a**- $p < 0.05$ con respecto a N. **c**- $p < 0.05$ con respecto a C.

cisticercosis crónica (Fig. 2), sugiriendo de nuevo que al cabo de ocho semanas de infección los macrófagos pierden parcialmente la capacidad de producir IL-12. Los macrófagos obtenidos de los demás ratones transferidos no produjeron concentraciones de IL-12, independientemente del tiempo de infección del que provinieron estos fagocitos. Por lo tanto, se observó claramente que la transferencia de dichas células abatió el nivel esperado de IL-12 al transcurrir ocho semanas la infección.

En contraste con la IL-12, todos los grupos de ratones transferidos produjeron concentraciones de IL-6 con respecto al grupo control (N) una vez estimulados con LPS (Fig 9). Sin embargo, existió una disminución estadísticamente significativa en la producción de IL-6 en todos los grupos de ratones transferidos con respecto a los ratones control de ocho semanas de infección (C) donde se registró una concentración de hasta 10000 pg/ml. En el grupo transferido con macrófagos de dos semanas de infección se registró la mayor producción de IL-6 (5000 pg/ml) y fue disminuyendo gradualmente conforme los macrófagos provinieron de etapas más avanzadas, de manera que el grupo de ratones transferidos con macrófagos de 12 semanas de infección fue el que produjo menor cantidad de esta interleucina (2500 pg/ml) pero siguió siendo estadísticamente mayor con respecto a N, indicando que aún con la transferencia todos los macrófagos produjeron IL-6. No va por demás hacer notar que en el grupo de ratones transferidos con células de ratones sanos (0 semanas) no se detectaron niveles de IL-6 a pesar que se esperaba produjeran concentraciones similares (10200 pg/ml) a los ratones infectados (C) al cabo de ocho semanas de infección (Fig. 3).

Producción de IL-6 a las ocho semanas de infección

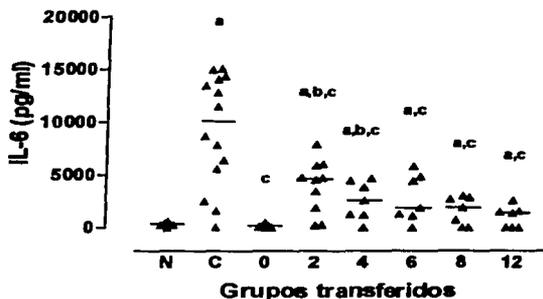


Fig. 9 Producción *in vitro* de IL-6 por macrófagos peritoneales estimulados con LPS y extraídos de ratones sanos (N), de ratones infectados no transferidos (C) y de ratones transferidos con macrófagos provenientes de diferentes tiempos de infección (0,2,4,6,8 y 12 semanas), a las ocho semanas de infección. Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo. a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente y c= $p < 0.05$ con respecto a C.

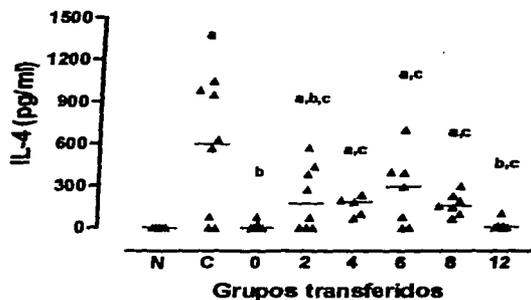
La figura 10 muestra la producción *in vitro* de IL-10 donde se registraron concentraciones significativamente más altas de esta citocina en todos los grupos transferidos, incluyendo los ratones transferidos con macrófagos provenientes de ratones no infectados (0 semanas) con respecto a los ratones N. Esta producción incrementó conforme los macrófagos provinieron de etapas más avanzadas de la infección, de tal manera que los ratones transferidos con macrófagos de doce semanas de infección presentaron la producción más elevada de IL-10 (aproximadamente de 500 pg/ml).

DETERMINACION DE CITOCINAS EN SUEROS DE RATONES TRANSFERIDOS.

Con el objeto de establecer una relación entre la producción de citocinas sistémicas y su influencia sobre el crecimiento parasitario, se determinaron las concentraciones de IL-4 e IFN- γ en sueros de ratones transferidos con macrófagos provenientes de distintos tiempos de infección (0,2,4,6,8 y 12 semanas). Los datos de la figura 12 A muestran una disminución estadísticamente significativa en la producción de IL-4 en todos los grupos de ratones transferidos con respecto a los ratones control C, en las que se registraron concentraciones cercanas a 700 pg/ml. Los macrófagos transferidos de 0 y 12 semanas disminuyeron tanto su producción que no hubo diferencia significativa a los ratones control (N). De los ratones transferidos, los macrófagos pertenecientes a la sexta semana fueron los que produjeron los niveles máximos de IL-4. El grupo de ratones transferidos con macrófagos de ocho semanas mostraron niveles menores a los observados en los ratones receptores de macrófagos del grupo precedente (semana 6) y con niveles similares a los receptores de células de 2 y 4 semanas.

Como indican los datos de la gráfica 12 B, se observó que todos los grupos de animales transferidos produjeron IFN- γ con respecto a los ratones no infectados (N). Sin embargo, solamente aquellos ratones transferidos con macrófagos obtenidos de 4, 6 y 8 semanas de infección presentaron un aumento estadísticamente significativo en la producción de IFN- γ con respecto a los ratones control de ocho semanas de infección (C). Se encontró que la mayor producción de IFN- γ fue en los ratones receptores de macrófagos de 6 semanas de infección, logrando niveles de aproximadamente de 4000 pg/ml y duplicando los títulos

A) Concentración de IL-4 a las ocho semanas de infección



B) Concentración de IFN- γ a las ocho semanas de infección

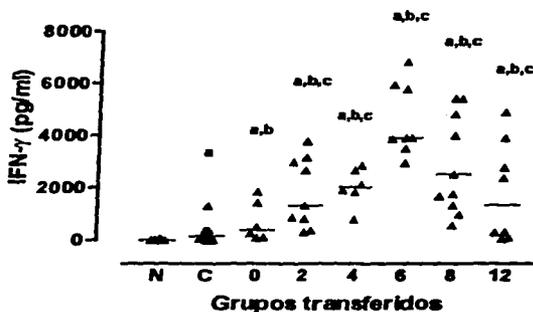


Fig. 12 Concentraciones de IL-4 (A) e IFN- γ (B) determinadas en suero de ratones sanos (N), ratones infectados no transferidos (C) y de ratones transferidos con macrófagos provenientes de distintos tiempos de infección (0,2,4,6,8 y 12 semanas). Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo. a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente y c= $p < 0.05$ con respecto a C.

logrados por los ratones C y que conforme los macrófagos provinieron de etapas más avanzadas de la infección (8 y 12 semanas) fueron disminuyendo gradualmente los niveles de IFN- γ hasta alcanzar concentraciones similares a los ratones control C y transferidos de ratones sanos (0 semanas). Como pudo notarse, la infección indujo un aumento escaso pero significativo de la producción de IFN- γ , mientras que la transferencia de macrófagos indujo una mucho mayor producción de esta citocina.

PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN SOBRENADANTES DE RATONES TRANSFERIDOS. Con el propósito de detectar variaciones en la producción de óxido nítrico y su posible influencia en la carga parasitaria, se determinaron los niveles de este compuesto producido tanto por macrófagos peritoneales de ratones sanos y de ratones transferidos con macrófagos provenientes de distintos tiempos de infección (0,2,4,6,8 y 12 semanas). Según los datos obtenidos en la figura 14 se observó que la producción de NO en todos los grupos de ratones transferidos fue significativamente ($p < 0.05$) más elevada con respecto a los ratones sin infección (N) los cuales registraron niveles cercanos a 1.0 μM . Con respecto a los ratones control C, donde se registraron concentraciones de 5.0 μM , la producción de NO más elevada se observó en aquellos ratones transferidos con macrófagos de 6 a 8 semanas de infección (7 μM), lo que coincide con el menor número de parásitos en los grupos transferidos con macrófagos de 6 a 8 semanas de infección tal como lo demuestra la gráfica de la cinética de crecimiento parasitario. Sin embargo, los

ratones transferidos con macrófagos provenientes de 12 semanas de infección tuvieron menor capacidad para producir NO que los grupos precedentes lo que se correlaciona con un aumento en el número de cisticercos. Ello demuestra entonces una relación directa entre los niveles de óxido nítrico encontrados con el número de parásito registrados a las ocho semanas de infección.

Producción de óxido nítrico a las ocho semanas de infección

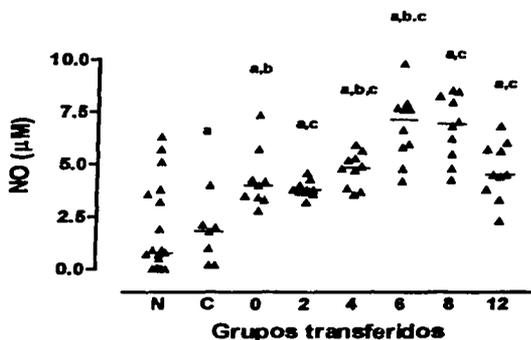


Fig. 13. Producción *in vitro* de óxido nítrico por macrófagos obtenidos de ratones sanos (N), de ratones a las ocho semanas de infección (C) y de ratones transferidos con macrófagos de distintos momentos de infección (0, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas) y sacrificados a las ocho semanas de infección. Se midió la concentración de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante el reactivo de Greiss. Cada punto en la gráfica representa a un solo individuo. a= $p < 0.05$ con respecto a N, b= $p < 0.05$ con respecto al grupo precedente y c= $p < 0.05$ con respecto a C.

11. DISCUSIÓN

Actualmente se tiene bien establecido que los patógenos son generalmente susceptibles de manera preferencial a un tipo de respuesta inmune que establece el hospedero una vez que ha sido infectado. En el caso de infecciones causadas por helmintos se inducen respuestas altamente polarizadas que se caracterizan por el dominio de citocinas tipo Th2 (Jankovic et al, 2001) que resultan protectoras contra dichos parásitos en muchos de los casos (Jankovic y Sher, 1996). Sin embargo, algunas infecciones helmínticas persistentes como las causadas por *T. crassiceps* y *S. mansoni* no siguen este mismo patrón, sobre todo en lo que se refiere a protección. En estas infecciones se ha demostrado el desarrollo de una respuesta inicial caracterizada por citocinas tipo Th1 capaz de controlar el crecimiento del parásito. Conforme ambas infecciones se tornan crónicas, la respuesta Th1 se pierde y es sustituida por otra mediada por citocinas Th2 (Terrazas et al., 1998). Esta última no solo no es capaz de eliminar al parásito, sino que el hospedero se muestra más susceptible dando lugar a una importante diseminación del mismo. La presencia de ambos polos de la respuesta inmune claramente relacionados con protección del hospedero o crecimiento del parásito han permitido que el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* sea de mucha utilidad para el estudio de factores inmunológicos y genéticos relacionados con los mecanismos de resistencia y susceptibilidad. Con estos trabajos se ha podido demostrar que: la diferencia en la carga parasitaria observada en las distintas fases de la infección se relaciona con el tipo de respuesta que generan los linfocitos T cooperadores (Th) principalmente con base en el perfil de citocinas liberadas; una respuesta tipo Th2

establecida durante una infección helmíntica no siempre resulta protectora y; una respuesta Th1 inicial es capaz de restringir el desarrollo del parásito.

Experimentos realizados con el mismo modelo experimental en el presente estudio confirmaron en su mayor parte dichas descripciones. Se observaron igualmente cambios en la velocidad de crecimiento del cisticerco de *T. crassiceps* en las diferentes fases de la infección. Mediante la determinación de algunas citocinas que se saben importantes para la inducción de ambos tipos de respuesta (Th1 o Th2) como la IL-12, IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-4 (Mossman y Coffman, 1989), se encontró durante etapas tempranas de la cisticercosis un dominio de IL-12 con respecto a las demás citocinas asociada con una mínima carga parasitaria, mientras que en etapas más avanzadas un dominio de IL-4, IL-6 e IL-10, donde el crecimiento parasitario se elevó de manera muy importante. Con base en estos resultados se sugiere que durante etapas iniciales lo que probablemente influyó de manera importante en la restricción del desarrollo del parásito fue precisamente el dominio de la IL-12, junto con otros factores aquí no determinados como pudieron ser la IL-2 e IL-18 (Akira A. et al. 2001). Esta afirmación tiene fundamento en numerosas evidencias que indican la propiedad de la IL-12 en la inducción de las células T cooperadoras vírgenes a diferenciarse en células tipo Th1 tanto en ratones (Hsieh et al, 1993) como en humanos (Romagnani, 1992; Manetti et al., 1993; Trichieri, 1993) *in vivo* e *in vitro* (Macatonia et al., 1993) debido a su importante papel coestimulador en el mecanismo B7/CD28 para la activación de estas células (Murphy et al., 1994), a su habilidad para inducir la síntesis de IFN- γ por linfocitos T activados, con los consiguientes efectos sobre los macrófagos para adquirir funciones citotóxicas (producción de NO), y a su capacidad de activar a células NK/LAK (Kobayashi et al., 1989) las cuales pudieron participar en la eliminación

y restricción del crecimiento parasitario. Esta idea es congruente con estudios recientes realizados en ratones *knockout* para IL-12 donde la susceptibilidad a *T. crassiceps* incrementó en un 100% con respecto a ratones silvestres (Rodríguez M., 2002).

Contrario a lo que se esperaba en nuestro trabajo, la producción de IFN- γ no fue paralela a la registrada por la IL-12 durante las semanas iniciales de la cisticercosis sin embargo, pareció que los niveles del primero fueron suficientes para estimular la producción, por un lado, de óxido nítrico que permitió una mayor resistencia al desarrollo del cisticerco y, por el otro, la producción de IL-6 e IL-10 que favoreció el crecimiento parasitario en semanas más tardías de la infección. En contraste con lo descrito en la literatura, los niveles más elevados de IFN- γ se observaron durante etapas finales de la infección. Esto último pudiera explicarse a una continua estimulación antigénica que promovió su producción en otras células del sistema inmune además de los linfocitos T como las células NK, o bien, a una reactividad cruzada descrita recientemente con uno de los productos (p 66) secretados por la larva de *T. crassiceps* (Spolski et al., 2002).

Durante etapas intermedias de la cisticercosis (6 y 8 semanas) se observó un perfil mixto de citocinas relacionado con un aumento en el número de parásitos en comparación con el observado al inicio de la infección. Esto es posible ya que, a pesar de que existe el dogma de que ambos perfiles son excluyentes uno del otro (Mossman et al., 1989) muchos investigadores sugieren la existencia simultánea de ambos haciendo más hincapié en el balance existente con el dominio de alguno de ellos (Romagnani, 1998). También se ha visto que durante el proceso en el que las células T vírgenes adquieren un fenotipo Th1 o Th2, los linfocitos T que producen citocinas de tipo mixto (Th0) pueden surgir (Fierstein,

1989).

Por otro lado, el aumento de IL-4 al tornarse crónica la infección (semanas 6, 8 y 12) se asocia con una disminución significativa de IL-12, promoviendo de esta manera el desarrollo de una respuesta Th2 que coincidió con un aumento significativo del número de parásitos y probablemente permitió su desarrollo. Esta conclusión deriva de la observación que en cultivos de clonas Th0 incubadas con IL-4 e IL-12, los efectos de la IL-4 son dominantes y las células Th2 son inducidas (Hsieh et al., 1993). Acorde con estos resultados, Villa y Kuhn recientemente reportaron que ratones infectados con este mismo parásito exhiben niveles altos de IL-4 durante etapas avanzadas de la infección. En cuanto a la IL-10, a pesar de ser clasificada como una citocina tipo Th2 en ratones, se registraron niveles elevados en etapas iniciales de la infección probablemente debido a la estimulación de macrófagos por IFN- γ e IL-12 (Romagnani, 1998). Ello pudo inhibir de manera significativa la presentación del antígeno por los macrófagos dando como resultado una disminución en la respuesta proliferativa y en la producción de ciertas citocinas por las células T (de Waal Malefyt et al., 1991; Fiorentino et al., 1991) afectando también el desarrollo de una respuesta tipo Th1 y favorecer a mediano plazo el desarrollo de una Th2 como se ha observado en el estudio de la filariasis linfática (King et al., 1993). También se tiene bien definido que la IL-10 inhibe la producción de diversas monocinas (Hsu et al., 1992; D'Andrea, Et al 1993) contribuyendo junto con la IL-4 en la inhibición de la síntesis de IL-12 durante etapas intermedias y avanzadas de la cisticercosis.

Aún cuando la diferencia en el crecimiento parasitario entre las distintas etapas de la infección pudiera explicarse al ciclo biológico normal del patógeno, tal como se describe

en bacterias (fase lag y fase log), existen suficientes evidencias que permiten distinguir una influencia importante del sistema inmune en el desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps*. En experimentos previos se ha demostrado que las células T están involucradas en las respuestas restrictivas al cisticerco de *T. crassiceps*. Se ha visto que ratones con timectomía neonatal incrementan la susceptibilidad a *T. crassiceps* y un reemplazo de células T recupera los niveles de parásitos normalmente observados (Bojalil et al., 1993). Otras investigaciones han sugerido la existencia de anergia de linfocitos T cercanos al sitio de infección promovida por factores secretados por la larva del cisticerco mediante una inhibición de células del fenotipo Th1 y un aumento de células Th2 (Villa y Kuhn., 1996). Múltiples trabajos han demostrado la influencia de otros factores biológicos cuyas acciones afectarían la respuesta de las células T durante el curso de la cisticercosis, como el fondo genético asociado al MHC y ambiente hormonal donde el 17- β estradiol es permisivo mientras que los andrógenos son restrictivos (Terrazas et al., 1994; Larralde et al., 1995). Además, recientes estudios confirman que una respuesta Th1 resulta protectora contra *T. crassiceps*: en animales STAT6 -/- con niveles elevados de IL-12, IFN- γ y NO se observa una importante disminución (aproximadamente 90%) de la carga parasitaria, mientras que los animales silvestres desarrollan una respuesta Th2 con una elevada producción de IL-4 e IL-13 relacionada con un elevado crecimiento parasitario (Rodríguez, 2002).

Durante los últimos años, investigaciones enfocadas al estudio de los factores y mecanismos involucrados en la resistencia y susceptibilidad a la cisticercosis han puesto especial atención en las CPAs. Debido a que gran parte de las citocinas que definen el tipo de respuesta en las distintas etapas de la infección son producidas por macrófagos activados, ello invita a pensar que éstas células participan de manera importante no sólo en

los eventos de diferenciación de los linfocitos T CD4+ y en polarización de la respuesta inmune, sino en el desarrollo del cisticercos directamente, promoviendo condiciones restrictivas o permisivas importantes. La producción diferencial obtenida de cada una de estas citocinas por los macrófagos en los distintos momentos de la infección y su relación con el aumento o disminución del número de parásitos observados durante el presente trabajo sostiene en gran medida esta idea. Tal es el caso de los macrófagos de 6, 8 y 12 semanas de infección que produjeron menores concentraciones de IL-12 conforme avanzó la infección (pérdida de una respuesta Th1) pero incrementaron los niveles de IL-10, que se asocia con un aumento importante en la tasa de crecimiento del patógeno. Esto demuestra una relación inversa entre el crecimiento parasitario y los niveles de IL-12 y una relación directa con los niveles de IL-10. Además, los niveles elevados de IL-6 producidas por macrófagos de estas mismas semanas, probablemente contribuyó al aumento de la parasitemia observada durante esta fase de la cisticercosis induciendo una respuesta tipo Th2 junto con la IL-10 como se ha descrito en la literatura (Rincón et al., 1997).

Tomando en cuenta la similitud de los macrófagos con las células dendríticas como CPAs, es posible pensar que lo que se ha descrito en estas últimas pudiera observarse en los macrófagos peritoneales. Se ha demostrado en diversas investigaciones que la inducción de los distintos fenotipos de células T cooperadoras no depende solamente de una línea de células dendríticas sino que existe una dicotomía de éstas (DC1 y DC2) con una expresión diferencial de moléculas de membrana y con distintos requerimientos para su estimulación (Rissoan et al. 1999). Bajo este criterio y con base en los resultados aquí obtenidos, se proponen que distintas subpoblaciones de macrófagos interactuaron con los linfocitos T

CD4+ vírgenes (Jankovic D. Et al. 2001) para dar lugar al desarrollo de distintos tipos de respuestas inmunológicas en las diferentes etapas de la cisticercosis. Por otro lado, se ha visto que el estado de activación y maduración de las células dendríticas que tiene como consecuencia una producción diferencial de citocinas, son propiedades determinantes para la diferenciación de las células T CD4+ vírgenes hacia alguno de los subgrupos celulares (Cella et al., 1996). En otros estudios se ha demostrado la existencia de modificaciones en el estado de activación de los macrófagos conforme transcurre el tiempo de la infección (Terraza et al, 1998; Calderón R., 1999), lo cual se ha visto reflejado no solo en su morfología sino en una producción diferencial de moléculas de secreción, confiriéndoles capacidades y funciones efectoras distintas que influyen de manera diferencial en el desarrollo del cisticerco. Dichas modificaciones pudieron ser resultado de factores intrínsecos de estos mismos fagocitos (i.e. edad o estado de maduración, etc) y/o por factores extrínsecos (i.e. cronicidad del estímulo, microambiente de citocinas, secreción de productos del propio parásito, etc). En adición, investigaciones recientes sostienen la existencia de una activación diferencial (clásica y alternativa) de los macrófagos por la acción de citocinas presentes en el microambiente como el IFN- γ e IL-4 principalmente (Allen et al., 2001) que se diferencian entre sí por la expresión de distintas moléculas de membrana y de secreción en los macrófagos, mostrando un amplio rango de efectos antagónicos en los macrófagos. Con estos antecedentes y según los distintos perfiles de citocinas encontrados en los diferentes periodos de la infección en este estudio, existe la posibilidad que se estuviesen activando de manera diferencial a estas células. Al observar el dominio de IL-12 en etapas tempranas de la infección se puede concluir que los macrófagos fueron activados de manera clásica, interactuando con los linfocitos T CD4+

para dar lugar a una respuesta Th1. Por otro lado, el dominio de IL-4 e IL-10 durante las etapas avanzadas de la infección contribuyó a una activación alternativa en los macrófagos que dio lugar a una respuesta Th2.

Puesto que existen evidencias que la producción de NO es estimulada por el LPS e IFN- γ (activación clásica), entonces este tipo de activación tuvo como importante consecuencia la estimulación de macrófagos (Abbas et al., 1996) hacia un estado microbicida promoviendo la producción de compuestos citotóxicos (NO) que impidieron directamente el desarrollo y/o eliminación del parásito en contraste de los macrófagos alternativamente activados que se sabe son incapaces de producir NO (propiedad citotóxica). Además, las citocinas que inducen la activación alternativa (IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- β) son capaces también de inhibir la producción de NO por los macrófagos (McMicking et al., 1997). Esto es una importante diferencia entre ambos tipos de fagocitos lo cual tendría un efecto evidentemente distinto sobre el número de parásitos en los ratones infectados. Los niveles de NO que aquí se describen durante las primeras semanas de la infección fueron elevados pero sostenidos durante semanas tardías. Esto sugiere la existencia de mecanismos reguladores que frenaron su producción como protección, que de aumentar provocaría lesión a los propios tejidos del hospedero. Dentro de estos mecanismos reguladores pudiera incluirse la autorregulación que ejerce el NO sobre sí mismo por la presencia de niveles elevados de este mismo en el microambiente (Stefano y Magazine, 2001).

Tomando en cuenta que las citocinas producidas por macrófagos tienen un efecto autócrino y mediante factores intrínsecos de la propia célula, es posible que se pudieran estar dando de manera simultánea tanto una activación diferencial como modificaciones en el estado de

activación de los macrófagos, lo cual llevaría igualmente a una producción diferencial de citocinas en los distintos tiempos de la infección con efectos importantes en la susceptibilidad y resistencia al parásito. Mediante la transferencia de macrófagos de distintos tiempos de la infección es posible apoyar esta hipótesis. Una importante conclusión que surge de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo es la evidente participación de los macrófagos en el desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps*. Esta afirmación se sustenta principalmente por la observación de un efecto diferencial en la velocidad de crecimiento del cisticerco en los distintos grupos de ratones receptores después de ocho semanas de infección. Los animales transferidos con macrófagos de 6 y 8 semanas de infección resultaron ser los mayormente protegidos en comparación con aquellos transferidos con macrófagos de otros momentos de la cisticercosis. Esto descarta la posibilidad que dicha diferencia en la susceptibilidad y resistencia observada en los distintos grupos experimentales haya sido resultado de la participación de los macrófagos residentes únicamente, de otra manera todos los animales transferidos hubiesen mostrado un número similar de parásitos entre ellos y niveles semejantes a los grupos control al haber transcurrido las ocho semanas de infección. Así como se demostró durante la cisticercosis crónica una producción diferencial de citocinas y NO por macrófagos a los distintos tiempos de la infección y su relación con el número de parásitos encontrados, al observar este mismo fenómeno tras la transferencia de macrófagos es posible pensar que fuese éste el mismo mecanismo que permitió a los macrófagos transferidos y residentes la restricción o favorecimiento del desarrollo del parásito.

Según nuestros resultados, la diferencia en la velocidad de crecimiento del parásito observado en los distintos grupos de ratones receptores pudiera explicarse nuevamente por:

1) la producción diferencial de citocinas registradas por los macrófagos peritoneales extraídos de los distintos grupos de animales receptores y, 2) la influencia de otras citocinas presentes en el ambiente sobre estos fagocitos y otras células del sistema inmune.

De manera general, al realizar una comparación de la producción de citocinas con respecto a los animales control de ocho semanas de infección (C), se observó un abatimiento en la producción de todas las citocinas con excepción del IFN- γ . Esta disminución pudiera explicarse a diversos sucesos: 1) a una probable pérdida y/o una inhibición en la expresión de moléculas de membrana (i.e. receptores entre otras) como consecuencia de la transferencia, o bien, 2) a una reacción al cambio de ambiente que disminuyó la capacidad respondedora y efectora de estos macrófagos. Además, la IL-12 fue la única citocina que mostró un abatimiento total en su producción independientemente del tiempo de infección al que pertenecieron los macrófagos. Era de esperarse que tras ocho semanas de infección se registrara una importante disminución de esta interleucina de manera que alcanzara niveles parecidos a los obtenidos durante el curso normal de la cisticercosis, por lo que su total abatimiento pudiera explicarse mediante el encendido de mecanismos reguladores que inhibieron directamente su síntesis. Por tanto al no existir una producción diferencial de IL-12 en los distintos grupos de ratones, se puede concluir que la IL-12 no resultó responsable directamente de la restricción del cisticerco en este tiempo de la infección tal como se sugirió para las semanas iniciales de la cisticercosis crónica. De acuerdo con lo anterior, el hecho de que el IFN- γ haya sido la única citocina cuyos niveles fueron estadísticamente más elevados con respecto a ambos grupos control y que coinciden sus máximas concentraciones con aquellos grupos mayormente protegidos, entonces se infiere que esta citocina participó de manera muy importante en el crecimiento parasitario

mediante la estimulación de la síntesis de NO. Por otro lado, se esperaría que estas concentraciones de IFN- γ fueran paralelas a los niveles de IL-12 pues esta última es la que promueve su producción. Debido a que estos macrófagos no la produjeron es posible que la estimulación de dicha producción recayera más en otras citocinas como la IL-2 e IL-18 que también son inductoras de IFN- γ (Marcucci et al, 1982). Debido a que el IFN- γ es una citocina que no es producida por macrófagos sino por linfocitos T activados y células NK principalmente, se confirma la importante influencia de este tipo de citocinas presentes en el ambiente sobre las células fagocíticas. Esto mismo estaría sugiriendo de nuevo una activación clásica de los macrófagos influida por el IFN- γ en los grupos de ratones mayormente protegidos confirmando la capacidad protectora de una respuesta mediada por citocinas Th1.

Por otro lado, es posible pensar que el aumento en la susceptibilidad observada en los demás grupos con respecto a los mayormente protegidos, pudiera deberse más que a un dominio de citocinas Th2 como la IL-6, IL-4 e IL-10, a los niveles de NO directamente. Es decir, se observó una correlación entre los niveles máximos de NO y la máxima protección que se presentó en los ratones transferidos con macrófagos de la sexta y octava semana de infección, mientras que los grupos transferidos con macrófagos de 2, 4 y 12 semanas de infección quienes mostraron un número mayor de cisticercos con valores similares entre ellos, coincide no solo con una disminución en la producción de NO sino que los niveles producidos de dicho compuesto son altamente parecidos. Lo anterior indica una relación inversa entre los niveles elevados de NO con una mínima carga parasitaria, mientras que una disminución de este compuesto con un alto número de parásitos. Sin embargo, los máximos niveles de NO encontrados en el grupo de ratones

transferidos con macrófagos de 8 semanas de infección no coinciden con los niveles máximos de IFN- γ cuyas concentraciones más altas se observaron en el grupo de ratones transferidos con macrófagos de 6 semanas de infección. Era de esperarse que tuvieran comportamientos paralelos ya que el IFN- γ funciona como uno de los principales inductores en la producción de óxido nítrico, lo que pudiera sugerir alguna vía alterna en la estimulación de la iNOS aparte de la inducida por el INF- γ tal como moléculas secretadas por el propio patógeno.

Con lo descrito en esta investigación, se da una evidencia más del importante papel que juegan las citocinas y otras moléculas (i.e. NO) producidas por los macrófagos en el desarrollo y crecimiento del cisticerco de *T. crassiceps*, influyendo en el tipo de respuesta inmune que se genera en el curso de la cisticercosis debido a la activación o inhibición de diversas funciones efectoras como consecuencia de cambios en su estado de activación y/o por una activación diferencial inducida por citocinas presentes en el microambiente.

12. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que:

- 1) Los mecanismos que favorecen o restringen el desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps* están importantemente influidos por células y moléculas del sistema inmune, en particular por los macrófagos.
- 2) Los macrófagos peritoneales presentes durante las distintas etapas de la cisticercosis y por lo tanto sometidos a la influencia de un microambiente cambiante en citocinas varían la producción de citocinas y óxido nítrico y tienen a su vez un efecto diferencial en el desarrollo del cisticerco en animales receptores de dichas células.
- 3) La activación diferencial de macrófagos activados tiene una influencia importante en el cambio de respuesta observada en los diferentes periodos de la infección.
- 4) Los mecanismos restrictivos en contra del parásito se correlacionaron con niveles elevados de INF- γ y de óxido nítrico, lo que sugiere que los macrófagos clásicamente activados participan de manera importante en la respuesta protectora del hospedero.

13. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A.K., Murphy K.M. and Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383:787.
- Abbas A.K., Lichtman S.H. and Pober J.S. 1997. Cellular and Molecular Immunology. 3th Edition, W.B. Saunders Company., USA, 493 pp.
- Adams D.O. and Marino P. 1984. Activation of mononuclear phagocytes for destruction of tumor cells as a model for study of macrophage development. Contemporary Topics in Hematology-Oncology. Plenum Press, N.Y., Vol. III, pp-69-1361.
- Afonso L.C., Scharfion T.M., Vieira L.Q., Wysocka M., Trinchieri G. and Scott P. 1994. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science*. 263:235-37.
- Akira S. 2001. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin. Immunol.* Feb 2(1):59-63.
- Allen J.E. and Loke P. 2001. Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis. *Parasite Immunol* 23:345-352.
- Becker S. and Daniel E.G. 1990. Antagonistic and additive effects of IL-4 and interferon-gamma on human monocytes and macrophages: effects on Fc receptors, HLA-D antigens and superoxide production. *Cell Immunol.* Sep 129(2):351-62.
- Bogdan C. 2000. The function of nitric oxide in the immune system. In: B. Mayer Editor, Handbook of Experimental Pharmacology: Nitric Oxide Springer, Hiedelberg. pp. 443-493.
- Bogdan C., Rollinghoff M. And Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive mitogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin. Imm.* 12:64-76.
- Bojalil R, Terrazas L.I., Govezensky T., Sciutto E. and Larralde C. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol* 179:384-389.
- Bojalil R. 1994. Immune response or tolerance. Cellular selection by the thymus. *Res. Invest. Clin.* Jul-Aug 46(4) 323-31.
- Bonder C.S., Dickensheets H.G., Finlayjones J.J., Donnelly R.P., Hart P.H. 1998. Involvement to the IL-12 receptor gamma chain (gammac) in the control by IL-4 of human monocyte and macrophage inflammatory mediator production. *J. Immunol.* Apr 15: 160(8): 4048-56.
- Boraschi D., Censini S., Tagliabue A. 1984. Interferon-gamma reduces macrophage-suppressive activity by inhibiting prostaglandin E2 release and inducing IL-1 production. *J. Immunol.* Aug 133(2): 764-8.
- Braun J.S., Novak R., Gao G., Murray P.J. and Shenep J.L. 1999. Pneumolysin, a protein toxin of *Streptococcus pneumoniae* induce nitric oxide production from macrophages. *Infect Immun* 67: 3750-3756.
- Brusca R. C. and Brusca G.J. 1990. Invertebrates. Sinauer Associates Inc. USA. 922 pp.
- Cella M., Scheidegger D., Palmer-Leunman K., Lane P., Lanzavecchia A., Alber G. 1996. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of IL-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-Thelp via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747-752.
- Conrad D.J., Kuhn H., Mulkins M., Highland E., Sigl E. 1992. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Jan 1, 89(1):217-24.
- Cowan H.B., Vick S., Corary H.T., Shepherd V.L. 1992. Dexamethasone up-regulates mannose receptor activity by increasing mRNA levels. *Arch Biochem Bioph.* Jul; 296(1):314-20.
- Cua D.J. and Stohlman S.A. 1997. In vivo effects of T helper cell type 2 cytokines on macrophage antigen presenting cell induction of T helper subsets. *J. Immunol.* Dec 15, 159(12): 5834-40.

- Cunha F. Q., Moncada S. and Liew F.Y. 1992. IL-10 inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 182: 1155-1159.
- Chernin J. 1975. The growth of the metacestodes of *Taenia crassiceps* in white mice. *Journal of Helminthology* 49:297-300.
- Chinen T., Qureshi M.H., Koguchi Y. and Kawakami K. 1999. *Candida albicans* suppresses nitric oxide (NO) production by IFN-g and lipopolysacchride (LPS)-stimulated murine peritoneal macrophages. *Clin Exp Immunol* 115: 491-497.
- D' Andrea A., Aste A.M., Valiante N.M., Ma X., Kubin M. and Trinchieri G. 1993. IL-10 inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* 178:1041-1048.
- De Magestris M.T., Alexander J., Coggeshall M., Altman A., Gaete F.C., Grey H.M. y A. Sette. 1992. Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell* 68:625-34.
- De Waal Malefyt R., Haanen J., Spits H., Roncarolo M.G., Te Velde A, Figdor C., Johnson K., Kastelein Z., Yssel H. and de Vries J.E. 1991. IL-10 strongly reduce antigen specific human T cell responses by diminishing the antigen presenting capacity of monocyte via downregulation of class II MHC expression. *J. Exp Med.* 174:915.
- Diefenback A., Schindler H., Rollinghoff M., Yokoyama W. And Bogdan C. 1999. Requirement for tyupe 2 NO-synthase for IL-12 responsiveness in innate immunity. *Science* 284: 951-955.
- Doherty T.M., Kastelein R., Menou S., Andrade S. and Coffman R.L. 1993. Modulation of murine macrophages functions by IL-13. *J. Immunol.* 151:7151-7160.
- Edelson P.J. 1988. Intracellular parasites and phagocytic cells: Cell biology and pathophysiology. *Rev. Infect. Dis.* 4:124.
- Else K.J. and Grecis P.K. 1991. Cellular Immune Responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunol.* 72:508-513.
- Fallon P.G. 2000. Immunopathology of Schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunol Today* 21:29
- Fedorko M.E. and Hirsch J.G. 1970. Structure of monocytes and macrophages. *Semin. Hematol.* 7:109-124.
- Fenton M.J. 1992. IL-4 reeprorally regulates IL-1 and Il-1 receptor antagonist expression in human monocytes. *J. Immunol.* Aug 15, 149(4):1283-8.
- Fierstein G.S., Roeder W.D., Laxer J.A., Townsend K.S., Weaver C.T., Hom J.T., Llinton J., Torbett B.E. and Glasebrook A.L. 1989. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J. Immunol.* 143:518.
- Finkelman F.D. 1995. Relationship among antigen presentation, cytokine, immune deviation and autoimmune disease. *J.Exp. Med.* 182: 279-282.
- Fiorentino D.F., Zlotnik A., Viera P., Mossman T.R., Howard M., Moore K.W. and O'Gara A. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 146, 3444-3451.
- Flak T.A. and Goldman E.W. 1999. Signaling and cellular specificity of airway nitric oxide production in *B. pertussis*. *Cell Microbiol* 1:51-60 B.
- Fligger J., Blum J., Junji T.W. 1999. Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce NO *in vitro*. *Immunology* 200(2):169-186.
- Freeman R.S. 1962. Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), Rudolphi. 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40:969-990.
- García Tamayo F., 1997. Fundamentos de Inmunología. 1ª. Ed. UNAM 599 pp.

- Gajewsky F.T., Pinnas M., Wong T. and Fitch W.F. 1991. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen presenting cell populations. *J. Immunol.* 146:1750-58.
- Gajewski T.F., Stack R and Fitch F.W. 1994. "Anergy" of Th0 helper T lymphocytes induces downregulation of Th1 characteristics and a transition to a Th2-like phenotype. *J. Exp. Med.* 179: 481-491.-
- Gao J.J., Filla M.B., Fultz M.J., Vogel S.N., Russel S.W. and Murphy W.J. 1998. Autorine/paracrine IFN- $\alpha\beta$ mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 a in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 a in induction of the inducible oxide synthase gene. *J. Immunol* 161: 4803-4810.
- Gause W.C., Mitgro V., Via C., Lunsley P., Urban J.F. and Greenwald J. 1997. Do effector and memory cells also need B7 ligand costimulatory signals? *J. Immunol.* 159:1055-1058.
- Gessner A., Blum H., and Rollingoff M. 1993. Differential regulation of IL-9 expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunol.* 189: 419-435.
- Goerdt S. 1993. Inducible expression of MS-1 high molecular weight protein by endothelial cells of continuous origin and by dendritic cell/macrophages *in vivo* and *in vitro*. *Am. J. Pathol.* May 142(5): 1409-1422.
- Gordon S. 1986. Biology of the macrophage. *J. Cell. Sci (Suppl.)*, 4:267-286.
- Harding C.V. and Unanue E.R. (1986, 1992). Cellular mechanisms of antigen processing and the function of Class I and Class II major histocompatibility complex molecules by DNA mediated gene transfer. *Annual Review of Immunology* 4:281-316.
- Hart P.H., Vitti G.F., Burgess D.R., Whitty G.A., Piccioli D.S. and Hamilton J.A. 1989. Potential anti-inflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor- α , interleukin 1 and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acadm. Act. USA.* 86:3803.
- Hsieh C.S., Macatonia S. E., Tripp C.S., Wolf S.F., O'Garra A. and Murphy K.M. 1993. Development of Th1 CD4⁺T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260: 547-549.
- Hsu D.H., Moore K.W. and Spits H. 1992. Differential effects of IL-4 and IL-10 on IL-2 induced IFN-gamma synthesis and lymphokine-activated killer activity. *Int. Immunol.* 4: 563-569.
- Huang F.P., Xu D., Esfandiari E-O, Sands W., Wei X-Q and Liew F.Y. 1998. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol* 160: 4143-4147.
- Huerta L., Terrazas L.I., Sciutto E. and Larralde C. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J. Parasitol.* 78 (3): 471-476.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Capra D. 1999. Immunobiology. The immune system in health and disease. Current Biology, Garland. 4th ed. 635 pp.
- Jankovic D. and Sher A. 1996. Initiation and regulation of CD4⁺ T cell function in host-parasite models. *Chem Immunol.* 63:51-65.
- Jankovic D., Kullberg M.C., Noben-Trauth N., Caspar P., Paul W.E. and Sher A. 2000. Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat-6 signaling is not required for the *in vivo* or *in vitro* development of CD4⁺ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *J. Immunol* 164: 3047-3055.
- Jankovic D., Sher A and Yap G. 2001. Th1/Th2 choice in parasitic infection: decision making by committee. *Curr Op Immunol.* 13:403-409.
- Jankovic D, Liu Z and Gause W. 2001. Th1 and Th2 cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in Immunology* 22:450.
- June C.H., Bluestones J.A., Nadler L.M. and C.B. Thompson. 1994. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol. Today.* 15:321-31.
- Kemp M, Kurtzhab J.A., Cristensen C.B. 1993. Production of IFN-g and IL-4 by human T cells recognizing *Leishmania* lipophosphoglycan-associated protein. *Immunol. Lett.* Oct 38(2):137-44.

- King C.L., Mahanty S., Kimaraswami F. 1993. Cytokine control of parasite-specific anergy in human lymphatic filariasis. Preferential induction of a regulatory T helper type 2 lymphocyte subset. *J. Clin. Invest.* 92:1667-1673.
- Klebanoff S.J. 1999. Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gallin J.I. and Snyderman R. Editors, *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates* Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Pp. 721-768.
- Kobayashi M., Fitz L., Ryan M., Hewick R.M., Clark S.C., Chan S., Loudon R., Sherman F., Perussia B and Trinchieri G. 1989. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor, a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170:827-845.
- Kolb H. and Kolb-Bachofen V. 1998. Nitric oxide in autoimmune disease cytotoxic or regulatory mediator? *Imm. Today.* Dec 15:556-561.
- Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A., Ranger A.M. Zamvil S.S., Sobel R.A., Weiner H.L., Nabavi N. and Glimcher L.H. 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80:707.
- Kumar V., Bhardawaj V., Soares L., Alexander J., Sette A., Sercarz E. 1995. Major histocompatibility complex binding affinity of an antigenic determinant is crucial for the differential secretion of interleukin 4/5 or Interferon gamma by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 92:9510-9514.
- Larralde C, Montoya R.M., Sciuoto E., Diaz M.L., Govenzensky T. and Coltorti E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hidatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40:282-290.
- Larralde C.J., Sotelo R.M., Montoya A., Palencia, Padilla A., Govezensky M.L., Diaz M.L. and Sciuoto E. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 926-928.
- Lenschow D.J., Walunas T.L. and Bluestone J.A. 1996. CD28/b7 system of T cell costimulation. *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-58.
- Lichtman A.H., Chin J., Schmidt A.J. and Abbas A.K. 1988. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 9699-9703.
- Macatonia S. E., Hsieh C.S., Murphy K.M. and O'Garra A. 1993. Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD- T cells from $\alpha\beta$ TCR transgenic mice: IL-12 substitution for macrophages to stimulate IFN- γ production is IFN- γ -dependent. *Int. Immunol.* 5:1119.
- MacMicking J., Xie Q.W. and Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-350.
- Magram K., Connaughton S.E., Warriar R.R., Carvajal D.M., Wu C.Y., Ferrante J., Stewart C., Sarmiento V., Faherty D.A., and Gately M.R. 1996. IL-12 deficient mice are defective in IFN- γ production and type 1 cytokine responses. *Immunity.* 4:471-81.
- Mannetti R., Parronchi P., Giudizi M.G., Piccinni P, Maggi E, Trinchieri G. and Romagnani S. 1993. Natural killers cell stimulatory factor (interleukine 12 induces T helper type 1 (Th1) specific immune responses and inhibits the development of IL-5 producing Th cells. *J. Exp. Med* 177:1199-1204.
- Marcucci F., Nowak M., Krammer P and Kirchner H. 1982. *J. Gen. Virol.* 60: 195-198.
- Martin D., Slim J.G. and Sole G.J. 1995. CD4+ Lymphocyte count in African patients co-infected with HIV and Tuberculosis. *J. AIDS Hum. Retrovirol.* 8:386-391.
- Mills C.D. 1991. Molecular basis of "suppressor" macrophage arginine metabolism via the nitric oxide synthetase pathway. *J. Immunol* 146:2719.
- Miralles G.D., Stoeckle M.Y., McDermontt D.F., Finkelman I.D., Murray H.W. 1994. Th1 and Th2 cell associated cytokines in experimental visceral Leishmaniasis. *Infec. Immun.* 62:1058-1063.

- Moncada S., Palmer R.M.B. and Higgs E.A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109.
- Moreno J. 1996. Respuesta Inmune y Mecanismos de Autoinmunidad. Noriega Ed, Limusa. 1a. Edición 144 pp.
- Mossman T.R. and Coffman R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
- Mossman T.R. and Sad S. 1996. The expanding universe of T cell subsets. Th1, Th2 and more. *Immunology Today*. 17:138-146.
- Mullet D., Fertel R.H., Kiss D., and Cox G.W. 1997. An increase in intracellular cyclic AMP modulates nitric oxide production in IFN- γ -treated macrophages. *J Immunol* 15 158:2 897-904.
- Munder M., Eichmann K. and Modellell M. 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J. Immunol* 160 : 5347-5354.
- Murphy E.E., Terres G., Macatonia S.E., Hsieh C.S., Mattson J., Lanier L., Wysocka M., Rinchieri G., Murphy K. And O'Garra. 1994. B7 and IL-12 cooperate for proliferation and IFN-gamma production by mouse Th1 clones that are unresponsive to B7 co stimulation. *J. Exp. Med.* 180, 223-231.
- Nandan D., Lo R. and Reiner N.E. 1999. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-fos and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun* 67: 4055-4063.
- Nathan C.F. and Cohen Z.A. 1980. Cellular components of inflammation monocytes and macrophages. In: Textbook of Rheumatology, edited by W. Kelley, E. Harris, S. Ruddy and R. Hodge. P 1861 W.B. Saunders, New York.
- Nelson D.S. 1972. Macrophages as effectors of cell-mediated immunity. In: Macrophages and Cellular Immunity, edited by A.I. Laskin and H. Lechevalier, pp. 4576. Crc Press, Cleveland.
- Nickolson L.B. and Kuchroo V.K. 1996. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr. Op. Immunol* 8:837-842.
- Panaro M.A., Acquafredda A., Lisi S., Lofrumento D.D., Trotta T., Satalino R., Saccia M., Mitolo V. and Brandonisio O. 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Clin Lab Res* 29:3 122-7.
- Paul W.E. 1998. Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers, U.S.A. 4th Ed. 1589 pp.
- Pritchard D.I. 1995. The survival strategies of hookworms. *Parasitol Today* 11:255-259.
- Ranke M.K., Scoot D.E., Quigley L., Gray G.S., Abe R., June C.H. and Perrin P.J. 1995. *L. Clin. Invest.* 96:2195.
- Reiner S.L. and Locksley R.M. 1993. The worm and the protozoa: stereotyped responses or distinct antigens? *Parasitology Today* 9(7): 258-260.
- Reiner S.L., Zheng S., Wang A., Stowring L. and Locksley R.M. 1994. *Leishmania promastigotes evade interleukin IL-12 induction by macrophages and stimulate a broad range on cytokines from CD4 T cells during initiation of infection. J. Exp. Med.* 179:447-456.
- Reem G.H. and Yeh H.H. 1985. *J. Immunol.* 134:953-958.
- Rincón M., Anguita J., Nakamura T., Fiksig E., and Flavell A. 1997. IL-6 directs the differentiation of IL-4 producing CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 185:461.
- Risoan M.C., Soumelis V., Kadowaki N., Grouard G., Briere F., de Waal-Malefyt R. and Liu Y.J. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283:1183-6.
- Rodríguez M., Satoskar A.R., Calderón R., Gomez L., Saavedra R., Bojalil R. and Terrazas L.I. 2002. Chronic Helminth Infection Induces Alternatively Activated Macrophages Expressing High Levels of

CCR5 with Low Interleukin-12 Production and Th2-Biasing Ability. *Infection and Immunity*. Vol. 70 (7):000.

- Roja Espinosa O., Jimenez Samudio L., and Arce Paredes P. 1994. Activación secuencial de la inmunidad celular y la inmunidad humoral en la lepra: consideraciones con base en hallazgos recientes. *Rev. Lat. Amer Microbiol.* 36:213-9
- Romagnani S. 1992. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response? *Immunol. Today* 13: 379-381.
- Romagnani S. 1998. The Th1/Th2 paradigm in disease. Chapman and Hall. USA. 241 pp.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Diaz M.L., Montoya R.M., Govezensky T., Lomeli C. and Larralde C. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine cysticercosis. *Parasite Immunology* 10:687-696.
- Schiutto E., Fragoso G., Diaz M.L., Valdez E., Lomeli C., Govezensky T., Montoya R.M. and Larralde C. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H 2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
- Seder R.A., Gazzinelli R., Sher A., and Paul W.E. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukine 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 90:10188-10192.
- Spolski R.J., Thomas P.G., See E.J., Mooney D.A., and Kuhn R.E. 2002. Larval *Taenia crassiceps* secretes a protein with characteristics of murine interferon- γ . *Parasitol Res* 88: 431-438.
- Stein M. Keshav S., Harris NB., and Gordon S. 1992. IL-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immune macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176:287-293.
- Stefano G. and Magazine H. 2001. Nitric Oxide Autorregulation and its Significance. *Mod Asp. Immunobiol.* 1 (5), 182-186.
- Stevenson M.M. and Tam F. 1993. Differential induction of helper T cell subsets during blood stage *Plasmodium chabaudi* infection in resistant and susceptible mice. *Clin Exp Immunol* 92:77-83.
- Swain S.I.I Weinberg A.D., English M., Huston G. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145:3796-3806.
- Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T and Larralde C. 1994. A role for 17- β -estradiol in immunocendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 80:563-568.
- Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. 1998. Shift from an early restrictive Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*T. crassiceps*). *J. Parasitol* 84:74-81.
- Thomas M and Paul A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.* 15(1):7-10.
- Toledo A., Cruz A., Fragoso G., Lacllette J.P., Merchant T.M., Hernández M. and Sciutto E. 1997. *In vitro* culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.* 82(2): 189-193.
- Trichieri G. 1993. Interleukine 12 and its role in the generation of Th1 cells. *Immunology Today.* 14:335.
- Unanue E.R. 1986. Secretory function of mononuclear phagocytes. *Am. H. Pathology* 83: 396-417.
- Valderrama H.F. 1999. Mecanismos de Polarización de la Respuesta Inmune: Descripción Inmunológica del efecto de la Dosis Antigénica en Modelo Murino con Cisticercosis. Tesis Licenciatura UNAM. Fac. Ciencias. México D.F. 88 pp.
- Van den Eetweg. 1992. The roles of cytokines produced in the murine response to the erythrocytic stages of mouse malarías. *Immunobiology* 189:397.
- Villa O.F. and Kuhn R.E. 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like

immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112:561-570.

- Weir D. M. and Stewart J. 1993. *Immunologia. Manual Moderno. 2ª. Ed.*. 329 pp.
- William J.R. and Unanue E.R. 1990. Costimulatory requirements of murine Th1 clone. The role of accessory cell-derived signals in responses to anti-CD3 antibody. *J. Immunol.* 145:85-93.
- Wraith D.C., McDevitt H.O., Steinman L. and Acha-Orbea H. 1989. Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide mediated immunotherapy. *Cell.* 59:247-55.