



11281
7
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

“RESPUESTAS Th1 y Th2 INDUCIDAS EN RATONES
POR ANTIGENOS DEL METACESTODO DE
Taenia solium”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA LA ALUMNA
QFB. ISABEL MARIA CORTES CUELLAR

TUTOR PRINCIPAL: DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR

COTUTOR: DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO

COMITE TUTORAL: DRA. KAETHE WILLMS MANNING
DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO
DRA. PATRICIA ZALDIVAR

MEXICO, D. F.

MAYO 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN DISCONTINUA

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

¡ Profundidad de las riquezas, de la sabiduría y del conocimiento de Dios!
¡ Cuán insondables son tus juicios e inescrutables sus caminos!,
porque ¿quién entendió la mente del Señor? ¿o quién fue su consejero?
¿Quién le dio a él primero, para que le fuera recompensado?
Porque de él, por él y para él son todas las cosas.
A él sea la gloria por los siglos. Amen

Romanos 11:33-36

AVISO a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo
NOMBRE: Isabel María
Cortés Cuellar
FECHA: 2/Mayo/03
FIRMA: [Firma]

Gracias Dios

Por darme vida cada día, por la fortaleza que me has dado para afrontar cada situación difícil,
por el gozo de poder tener una familia y amigos que me quieren y estiman tal cual soy, por
cada bendición recibida a lo largo de todos estos años.

Gracias por darme sabiduría y fuerza para poder culminar este trabajo que me permite iniciar
una nueva etapa en mi vida profesional

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Quiero agradecer al jurado por la revisión de esta tesis.

Dra. Edda Sciutto Conde

Dra. Patricia Tato Zaldivar

Dra. Ingeborg Becker Fauser

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Dra. Gloria Soldevila Melgarejo

Dra. Kaethe Willms Manning

Dr. José Luis Molinari Soriano

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DEDICATORIA

A Alberto:

Gracias por ser parte de mi vida, por permanecer a mi lado para luchar hombro con hombro y darle frente a las situaciones adversas, por tu apoyo, paciencia y comprensión para poder hacer realidad este sueño, que nos permitirá brindarle a nuestra hija un futuro mejor. Te amo.

A Jehieli:

Mi tesoro.... Gracias por ser uno de los motores que mueve mi vida para seguir superándome, por ser mi amiguita y poder vivir cada momento intensamente feliz. Deseo con todo mi corazón que este trabajo sea un ejemplo valioso de lucha y superación. Te amo

A mis padres y hermanos:

Gracias por su apoyo incondicional en todo momento, por su cariño, estímulo y respeto para cada una de las decisiones que he tomado. Los amo.

A mis suegros:

Gracias por todo su apoyo y paciencia, porque a pesar de las diferencias y dificultades, me han servido para crecer como persona y poder brindarles mi respeto y cariño.

A la familia Gálvez Juárez:

Gracias por sus oraciones y por su valiosa amistad que me han brindado desde el día en que me recibieron en su familia, por toda su ayuda, consejos y bendiciones. Los quiero mucho.

A los Dres. Patricia Tato Zaldívar y José Luis Molinari Soriano:

Gracias a ustedes he podido alcanzar una meta aforada desde hace tiempo, al creer en mí y aceptarme tal cual soy me han impulsado día tras día para adquirir no sólo una formación académica, sino también valores como amistad, respeto y ayuda desinteresada, que para mí son más valiosos. Gracias por todo su apoyo, paciencia y tiempo dedicado para mi formación. Los admiro porque además de ser excelentes investigadores son personas muy valiosas con las que ahora cuanto como amigos. Los quiero mucho.

TESIS CON
FALLA DE CUBEN

A mis amigos y compañeros del Laboratorio:

Sandra, Toño, Anita, Lilia, Rosina y José, les agradezco primeramente su amistad y su compañerismo, porque siempre hubo un buen ambiente para trabajar, por sus buenos descos y su apoyo para terminar este trabajo.

A mis amigas:

Lorena, gracias por ser más que una amiga, pues te has portado como una hermana en tiempos de angustia y prueba, siempre tan sincera pero a la vez comprensiva, por todos los momentos que hemos compartido juntas, te quiero mucho.

Lilian y Esperanza, gracias por su amistad y consejos, por permitirme colaborar con ustedes en sus trabajos pero al mismo tiempo aprendiendo de ustedes. Las quiero mucho.

A los alumnos:

Dres. Jorge Luis Tláhuél, Jimena Quinzanos y Belén Rivera, gracias por su trabajo y participación en la parte experimental de este trabajo, pero también por su optimismo y su amistad.

A la Iglesia Gilgal:

Queridos hermanos en Cristo, gracias por sus oraciones y consejos.

TESIS CON
FALLA DE TEN

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Patricia Tato Zaldivar y José Luis Molinari Soriano:

Por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo bajo su tutoría, por sus consejos y regaños que me han ayudado a crecer y superarme y también por su ayuda económica y moral que me han brindado en mis tiempos de austeridad.

A la Dra. Kaethe Willms Manning:

Por su participación como integrante del comité tutorial, que fue guiándome con su apoyo, crítica y estímulo para lograr los avances necesarios para realizar este trabajo.

Al M en C. José Antonio Ramírez Bárcenas:

Por su apoyo técnico, consejos y sugerencias en la parte experimental y por el trabajo de captura de imágenes presentadas en este trabajo.

A la QFB. Sandra Georgina Solano Gálvez:

Por su apoyo técnico, al enseñarme hacer algunas de las técnicas realizadas en este trabajo.

A los Dres. Belén Rivera, Jorge Luis Tlahuel y Jimena Quinzaños:

Por su colaboración técnica en la parte experimental de este trabajo.

A la Sra. Irene (Instituto de Fisiología Celular):

Por proveer y cuidar de los ratones utilizados en toda la parte experimental de este trabajo.

Al PADEP de la UNAM:

Dependencia que apoyo parcialmente el desarrollo experimental de este proyecto

Al CONACYT:

Por el apoyo económico brindado durante mis estudios de doctorado, que me permitió estabilizarme económicamente y poder tener un mejor desempeño en las actividades de investigación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Al Fondo Von Bhering Kitasato:

Por el apoyo económico brindado durante el último año de mis estudios, que me permitió continuar con el mismo desempeño en las actividades propias del programa de doctorado.

Al departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la UNAM:

Dependencia en la cual, por su infraestructura y ambiente académico, se ha realizado el trabajo científico presentado en esta tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**RESPUESTAS TH1 Y TH2 INDUCIDAS EN RATONES POR
ANTÍGENOS DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium***

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1. Morfología del parásito	3
2. Ciclo de Vida	4
3. Cisticercosis humana	6
4. Epidemiología de la cisticercosis humana y porcina	6
5. Respuesta Inmune en la cisticercosis	8
6. Evasión de la Respuesta Inmune	14
7. Vacunación de cerdos	16
ANTECEDENTES	18
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIALES Y MÉTODOS	23
1. Obtención de antígenos de metacéstodos de <i>T. solium</i>	23
2. Purificación de proteínas	24
3. Inmunización de ratones Balb/c con antígenos del metacéstodo	26
4. Ensayos de proliferación	27
5. Expresión de RNAs mensajeros de citocinas	28
6. Determinación de isotipos de los anticuerpos específicos	29
7. Inmunoelctrotransferencia	30
RESULTADOS	31
1. Análisis electroforético	31
2. Ensayos de proliferación	33
3. Determinación de RNAs mensajeros de citocinas	34
4. Cinética de eosinofilia en sangre periférica	35
5. Determinación de isotipos de anticuerpos	36
6. Determinación de la inmunoreactividad de los anticuerpos IgG e IgE	37
7. Cromatografía de intercambio iónico de los antígenos de metacéstodos	38
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50
APÉNDICE	65

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Paginas

1. Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	4
2. Electroforesis de los antígenos de metacéstodos de <i>T. solium</i> (Coomassie)	31
3. Electroforesis de los antígenos de metacéstodos de <i>T. solium</i> (PAS)	32
4. Inmunotransferencia de antígenos de metacéstodos de <i>T. solium</i>	33
5. Proliferación de células esplénicas estimuladas con antígenos de metacéstodos	34
6. Perfil de RNA mensajeros de citocinas	35
7. Eosinofilia en sangre periférica de ratones inmunizados y testigos	36
8. Respuestas de anticuerpos específicos contra antígenos de metacéstodos de <i>T. solium</i> determinados por ELISA	37
9. Inmunoreactividad de los anticuerpos IgG e IgE	38
10. Perfil de elusión de los antígenos de metacéstodos separados en una columna Hi-Trap Q de intercambio iónico	39
11. Electroforesis de los picos obtenidos de la cromatografía de intercambio iónico	40
12. Expresión de RNAm de citocinas inducidos por los picos 2, 3 y 5	41
13. Eosinofilia de sangre periférica de ratones inmunizados con Pico 2	42

CUADROS

1. Prevalencias de cisticercosis humana y porcina en algunos países de Latinoamérica	7
2. Establecimiento de cisticercos de <i>T. solium</i> en cerdos vacunados con diferentes antígenos	17
3. Proteínas contenidas en los picos obtenidos por cromatografía de intercambio iónico de los antígenos de metacéstodos	40

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Se ha demostrado que los antígenos de metacéstodos de *Taenia solium* inoculados en cerdos son capaces de inducir respuestas protectoras contra el parásito. El objetivo de este trabajo fue estudiar y caracterizar la respuesta inmune generada por los antígenos de metacéstodos de *T. solium* utilizando como modelo experimental ratones de la cepa Balb/c.

Los resultados mostraron que los antígenos contienen al menos 18 polipéptidos diferentes con pesos moleculares entre 220 y 7 kDa.

Al estudiar la respuesta celular se encontró que los antígenos indujeron respuestas proliferativas de esplenocitos de ratones inmunizados en forma dosis dependiente y estadísticamente significativas cuando se compararon con sus testigos ($P < 0.02$). Las células de animales inmunizados y testigos estimuladas con Con A produjeron mensajeros para IL-2, IFN- γ e IL-4 mientras que, la estimulación con antígenos de metacéstodos mostró que las células de animales inmunizados produjeron mensajeros para IFN- γ , IL-4 e IL-5 mientras que, las células de animales testigos no produjeron ningún mensajero. Los antígenos aparentemente inducen la expresión de respuestas mixtas Th1 (IFN- γ) / Th2 (IL-4 e IL-5).

Los antígenos indujeron en ratones un incremento transitorio y significativo de eosinófilos en sangre periférica ($P < 0.01$) en comparación con la eosinofilia de animales testigos.

También indujeron anticuerpos específicos IgE e IgG en los sueros de ratones inmunizados en comparación con los de animales testigos. IgG1 fue el isotipo más abundante ($P < 0.0007$), aunque IgG2b e IgG3 también estaban incrementadas significativamente en los sueros de ratones inmunizados, mientras que la IgG2a permaneció sin cambio. Tres antígenos de metacéstodos (95, 85 y 7 kDa) fueron reconocidos por todas las subclases de IgG e IgE, de éstos antígenos, los 2 primeros fueron reconocidos por un suero anti-paramiosina. Una proteína aproximadamente de 57 kDa fue reconocida por IgG1, IgG2a, IgG2b e IgE mientras que, otros antígenos (52, 30 y 20 kDa), fueron reconocidos por IgG1 e IgG2b. Dos (68 y 60 kDa) de las 4 bandas que fueron reconocidas por el suero anti-IgG de cerdo, también lo fueron por los antisueros contra todas las subclases de IgG y por IgE.

Las respuestas de eosinofilia y de isotipos de anticuerpos correlacionaron bien con lo encontrado *in vitro* ya que, la eosinofilia está controlada por IL-5 y el cambio de isotipo a IgE e IgG1 por IL-4, lo que sugiere que *in vivo* predominan las respuestas tipo Th2.

Se consiguió la separación de 7 picos por cromatografía de intercambio iónico, que al ser analizados por electroforesis mostraron diferentes componentes. Los picos 2 y 3 indujeron la expresión de RNAm para IL-5 a las 44 h en esplenocitos de animales inmunizados mientras que, el pico 5 indujo la expresión de mensajeros para IL-4, IL-5 e IFN- γ a las 66 h en los animales inmunizados y también para IL-4 e IFN- γ en los testigos. El pico 2 indujo eosinofilia significativa ($P = 0.04$) en sangre periférica al compararla con la de los animales testigo. Probablemente alguna de las proteínas compartidas por los picos 2, 3 y 5 (66, 56 y 35 kDa) inducen la síntesis del mensajero para IL-5 y eosinofilia *in vivo*.

Al parecer, el ratón puede ser un buen modelo para estudiar las respuestas inmunes contra antígenos del metacéstodo de *T. solium* ya que inducen respuestas similares a las observadas en el cerdo y en humano.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

It has been demonstrated that a *Taenia solium* metacestode antigenic complex induced immune responses in pigs that are able to prevent infection and destroy the parasite. The aim of this work was to study and characterize the immune responses induced by the *T. solium* metacestode antigens using Balb/c mice as a model.

Results showed that this complex contains at least 18 different polypeptides with molecular weights ranging from 220 to 7 kDa.

This immunogenic complex induced proliferative responses in spleen cells from immunized mice in a dose-dependent manner. The proliferative responses of immune spleen cells were statistically significant when compared with their controls. Con A induced the synthesis of IL-2, IFN- γ e IL-4 mRNAs in either cells from immunized and control animals. Meanwhile, antigenic complex induced IFN- γ , IL-4 e IL-5 mRNAs synthesis in cells from immunized animals and no messenger synthesis was induced in control cells. Antigens induced Th1 (IFN- γ) / Th2 (IL-4 and IL-5) mixed responses.

On the other hand, antigens induced a transient and significant increase of eosinophil numbers in peripheral blood ($p < 0.01$) in comparison to peripheral blood from control animals.

Besides, the antigens induced IgE and IgG specific serum antibodies in mice. IgG1 was the most abundant isotype produced however, IgG2b and IgG3 were also significantly increased in sera from immunized mice. IgG2a concentration in sera showed no difference between immunized and control sera. Three antigens (95, 85 and 7 kDa) were recognized by all IgG subclasses and IgE antibodies but two of them (95 and 85 kDa) corresponded to paramyosin since they were recognized by anti-paramyosin antibodies. Other antigens (52, 30 y 20 kDa) were recognized by IgG1 and IgG2b. Four proteins were recognized by anti-pig IgG, all the IgG subclasses and IgE recognized two of them.

There was good correlation between eosinophilia and antibody isotypes and the cytokines detected in vitro since eosinophilia is controlled by IL-5 and the switching of antibodies to IgE and IgG1 by IL-4. The results suggest that the responses controlled by Th2 cells predominated in vivo.

The antigenic complex was separated in 7 peaks using chromatography. Peaks 2 and 3 induced the synthesis of IL-5 and IL-4 mRNAs, 44 h after the stimulation of spleen cells from immunized mice. Meanwhile, 66 h after stimulation, peak 5 induced the expression of IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNAs in spleen cells from immunized mice as well as IL-4 and IFN- γ in spleen cells from control mice.

Peak 2 induced significant peripheral blood eosinophilia ($P = 0.04$) in comparison to that of control animals. Likely, one of the proteins shared by peaks 2, 3 and 5 (66, 56 y 35 kDa) is the responsible of inducing IL-5 mRNA synthesis and the eosinophilia in vivo.

The results support the idea that the mouse is a good experimental model to study the immune responses against *T. solium* metacestode antigens since they are similar to those observed in pigs and humans.

INTRODUCCION

1. Morfología del parásito.

Taenia solium pertenece al Phylum *Platyhelminthes*, a la Clase *Cestoda* y al Orden *Taeniidae*, es causante de teniosis en el hombre y cisticercosis en éste y en el cerdo. El cuerpo del gusano adulto tiene apariencia de listón o tallarín y está constituido por el escólex o región cefálica, el cuello y una cadena de proglótidos llamada estróbilo. El escólex tiene un diámetro de 1 mm. está formado por cuatro ventosas y un rosetelo que posee una doble corona de ganchos (Yoshino, 1933b). Se ha demostrado que los ganchos y ventosas son los elementos anatómicos con los que la tenia se fija al intestino de hámster (Merchant y col., 1998) y se piensa que lo mismo ocurre en el humano, donde puede permanecer por largos periodos. A partir del cuello se desarrolla el estróbilo que llega a medir de 2 a 7 m de largo. Las tenias son hermafroditas y cada proglótido tiene órganos sexuales masculinos y femeninos. Los proglótidos cercanos al cuello son inmaduros, les siguen los proglótidos maduros, que presentan ya órganos sexuales desarrollados y en donde ocurre la fertilización y finalmente. los grávidos que esencialmente constituyen sacos llenos de huevos (Aluja y col., 1987).

Los huevos, que contienen interior al embrión hexacanto u oncosfera, son esféricos y extremadamente resistentes, lo que les permite dispersarse y resistir cambios de temperatura en el medio externo. Cuando los huevos son liberados del huésped definitivo están completamente embrionados y son infectantes (Laclette y col., 1982).

Los metacéstodos de *T. solium* tienen apariencia de pequeñas vesículas, esféricas u ovales que miden de 0.5 a 1.5 cm, lo que permite identificarlos fácilmente. La pared de la vesícula es translúcida y a través de ella puede verse el escólex invaginado (Escobar, 1983).

2. Ciclo de Vida

El ciclo biológico de *T. solium* involucra dos huéspedes, uno definitivo y otro intermediario; así como tres estadios de desarrollo: el gusano adulto en el huésped definitivo, los huevos en el medio ambiente y el metacéstodo en el huésped intermediario. El hombre es el huésped definitivo ya que alberga al gusano adulto mientras que, la forma larvaria, conocida como metacéstodo, se desarrolla principalmente en el cerdo (huésped intermediario) y accidentalmente en el hombre (Flisser, 1998) (Fig. 1).

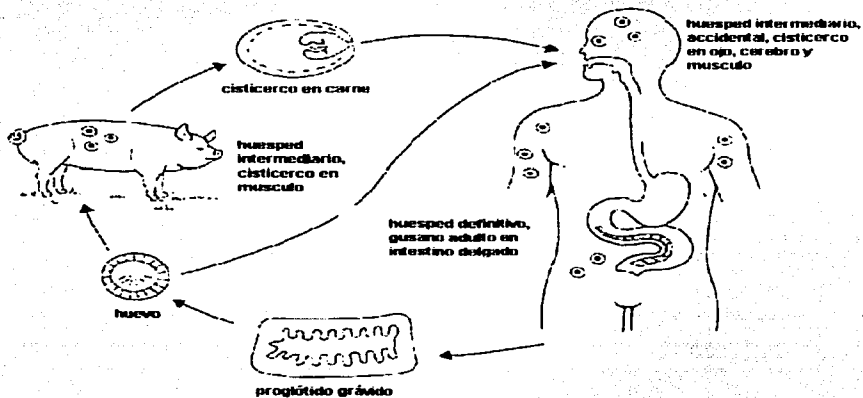


Figura 1. Ciclo Biológico de *Taenia solium*. (Tomado de A. Flisser. Larval cestodes. En: Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections).

El adulto se desarrolla en el intestino del hombre después de que éste ingiere carne de cerdo infectada con metacéstodos ahí, el escólex evagina estimulado por la

bilis y las enzimas digestivas, las ventosas se anclan a las microvellosidades intestinales y la tenia comienza a crecer (Merchant y col., 1998). Tres ó 4 meses después de la infección, los proglótidos grávidos se desprenden del estróbilo con alrededor de 50,000 huevos cada uno, los huevos son eliminados libres o en proglótidos con las heces (Flisser, 1994; White y col., 1997).

En lugares donde la eliminación de heces humanas no es adecuada, los cerdos pueden ingerir materia fecal con huevos de *T. solium*. Cuando los huevos pasan por el estómago del cerdo son activados por acción de las enzimas gástricas e intestinales y las oncosferas son liberadas en el intestino delgado (Flisser, 1994). Después de que son liberadas y activadas penetran el tejido intestinal y alcanzan el torrente circulatorio o linfático, por esta vía llegan a diversos órganos y tejidos como sistema nervioso central, músculo esquelético, tejido subcutáneo y ojo (Yoshino, 1933a) y de 3 semanas a 2 meses se transforman en metacéstodos, completando el ciclo, que se vuelve a iniciar cuando un ser humano consume esta carne infectada con parásitos viables, desarrollando una nueva tenia. Frecuentemente, los cisticercos se encuentran rodeados, en los tejidos del huésped, por una cápsula de colágena conteniendo células inflamatorias, dentro de la cual permanecen vivos (Willms y Merchant, 1980; Hernández-Jáuregui y col., 1983; White y col., 1997b).

El hombre adquiere la cisticercosis por la ingestión de alimentos contaminados con huevos de *T. solium* (Del Brutto y col., 1997; García y Martínez, 1999) y por auto infección (Sarti y col., 1992b). Esto frecuentemente se asocia a malas prácticas higiénicas en la preparación de alimentos por portadores de la tenia, lo cual representa un peligro para la comunidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Cisticercosis humana.

La cisticercosis es una parasitosis provocada por el establecimiento de los metacéstodos de *T. solium* en los tejidos del huésped. En el hombre, los cisticercos tienen predilección por el sistema nervioso central causando neurocisticercosis.

La neurocisticercosis es una enfermedad compleja que puede ser asintomática entre el 9.1 y 44% de los casos (Escobar, 1983; Grisolia y Wiederholt, 1982; Fleury y col., 2003) o bien, tener una presentación clínica pleomórfica, cuyas manifestaciones principales dependen del número, localización, viabilidad y tipo de parásitos albergados en el sistema nervioso central así como, del grado de la respuesta inflamatoria inducida por el metacéstodo (Del Brutto y Sotelo, 1988; White y col., 1997a). Se estima que el período de incubación es en promedio de 4 a 5 años (Dixon y Lipscomb, 1961). La presencia de metacéstodos viables en el sistema nervioso central usualmente no causa síntomas probablemente porque el parásito evade la respuesta inmune del huésped, lo que permite su permanencia ante una inflamación discreta o nula (Kramer y col., 1989; White y col., 1997a). En contraste, cuando el metacéstodo envejece, y degenera hasta morir por acción de la respuesta inmune, se presenta una importante reacción celular que puede ocasionar cuadros clínicos graves como aracnoiditis, hidrocefalia, encefalitis focal, edema cerebral y vasculitis. Las crisis convulsivas son la manifestación clínica más frecuente y ocurren en el 70% de los casos. Por lo que la neurocisticercosis se define como causa de epilepsia de aparición tardía en el 50% de los pacientes en México (Del Brutto y Sotelo, 1988; Medina y col., 1990; Carpio y col., 1994).

4. Epidemiología de la cisticercosis humana y porcina

La neurocisticercosis humana es un importante problema de salud pública en México, América Latina, Asia y África (Majan, 1982; Schenone y col., 1982; Sartí y

col., 1986; Schantz y Sarti, 1989). Actualmente, en países como Estados Unidos la incidencia de la enfermedad va en aumento debido a la migración (Richards y col., 1985; Schantz y col., 1992; Shandera y col., 1994). La mayor parte de los países de Latinoamérica son endémicos para cisticercosis (Cuadro 1).

Cuadro 1. Prevalencias de cisticercosis humana y porcina en algunos países de Latinoamérica

País	Seroprevalencia (EITB) (%)	Prevalencia en cerdos (%)	Referencias
México	7.65	5.25 ¹	Sarti y col., 1992 ^a ; 1992b; 1994, Díaz Camacho y col. 1990, 1991.
Guatemala	15.5	9.0 ¹	Allan y col., 1996. García-Noval y col., 2001
Honduras	25.5	27.1 ¹	Sanchez y col., 1997. 1999 Sakai y col., 1998
Bolivia	22.6	38.9 ²	Tsang y Wilson, 1995
Ecuador	10.4	7.5 ¹	Cruz y col., 1998
Perú	11.5	42.0 ²	Díaz y col., 1992 García y col., 1996, 1999.

Prevalencia de cisticercosis en cerdos medida por:

¹ Examen visual y palpación de lengua

² Detección de anticuerpos por EITB.

En México, los primeros reportes sobre la incidencia de neurocisticercosis se derivaron de registros de autopsias de hospitales de Neurología y de los servicios de Patología (Villagrán y Rabiela 1989; Escobedo y col., 1983). Desde 1984 se están llevando a cabo estudios epidemiológicos en comunidades de nuestro país (Díaz Camacho y col. 1990, 1992; Sarti y col., 1992b, 1994; Schantz y col., 1994).

La infección afecta la calidad de vida del paciente y su entorno social, el 75% de los pacientes están en edades productivas, y es la causa de aproximadamente 50.000 muertes cada año (Velasco-Suárez, 1983; Flisser, 1988).

Por otro lado, la frecuencia de cisticercosis porcina en nuestro país no es homogénea, variando de un estado a otro desde 0.05 a 10% (Aluja 1982; Sarti y col., 1992a).

5. Respuesta Inmune en la cisticercosis

La respuesta inmune que se induce en el huésped ante la presencia de los metacéstodos de *T. solium* varía desde una marcada tolerancia hacia el parásito hasta una intensa reacción inflamatoria que es capaz de destruirlo.

La ingestión de las oncosferas induce una respuesta inmune contra el parásito. En infecciones con varias especies de *Taenia* (*T. taeniaeformis*, *T. ovis*, *T. hydatigena*) se ha observado que los anticuerpos y el complemento protegen contra la infección por las oncosferas (Williams, 1982; Rickard y Williams, 1982). En el modelo de cisticercosis por *T. taeniaeformis*, la destrucción del estadio oncosferral está mediada principalmente por anticuerpos IgG2a y complemento (Williams, 1982). Esta resistencia puede ser transferida pasivamente a animales receptores (Mitchell y col., 1977). Además, se ha observado que oncosferas incubadas con sueros de pacientes con neurocisticercosis en presencia de complemento son destruidas (Molinari y col., 1993b). En cuanto a la producción de anticuerpos, Mitchell (1982) mostraron que ratones de cepas resistentes a la infección por *T. taeniaeformis*, producen anticuerpos específicos más rápido que los de las cepas susceptibles.

Una vez establecido el metacéstodo en los tejidos del huésped, se induce una respuesta humoral dirigida contra antígenos de esta fase del parásito. Se han detectado diferentes clases de inmunoglobulinas específicas en suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva de enfermos o animales infectados (Flisser y col., 1980; Grogil y col., 1985; Espinoza y col., 1986; Corona y col., 1986; Short y col., 1991).

La IgG es el anticuerpo predominante y su presencia es compatible con que la enfermedad es un proceso crónico y de larga evolución (Corona y col., 1986; Espinoza y col., 1986; Zini y col., 1990). También se ha demostrado la presencia de IgM en LCR (Espinoza y col., 1986; Rosas y col., 1986) y de IgA en suero y LCR (Espinoza y col., 1986; Flisser y col., 1980) así como un incremento de IgE total (Cisneros y col., 1982; Estanol y col., 1989) y de IgE específica (Flisser y col., 1980; Grogil y col., 1985; Short y col., 1991). Se ha reportado la presencia de IgG específica intracranca en casos de neurocisticercosis (Cho y col., 1988; Estanol y col., 1989). Cabe destacar que al parecer el papel de la respuesta humoral no es determinante en la destrucción del metacéstodo, ya que se ha demostrado que no hay correlación entre la presencia de IgG porcina y C3b en la superficie de metacéstodos obtenidos de pacientes y el daño a los parásitos (Gorodezky y col., 1987).

La viabilidad del parásito juega un papel importante en el establecimiento de la respuesta celular. Al envejecer o morir los metacéstodos en forma natural, por tratamiento o vacunación, pierden su capacidad inmunomoduladora y liberan sus antígenos induciendo una respuesta inmune, que frecuentemente se asocia con una intensa reacción granulomatosa y la aparición de sintomatología. En los últimos años, ha surgido un creciente interés por conocer el tipo de respuesta (Th1 o Th2), que se asocia con la sobrevida del cisticercos o favorece la muerte y destrucción del parásito.

Durante la destrucción del parásito, se ha descrito que se presenta un proceso inflamatorio compuesto principalmente por macrófagos, células epitelioides, células gigantes, células plasmáticas, linfocitos y eosinófilos. Estos últimos son abundantes en cerdos pero escasos en humanos (Marquez 1971; Wilms y Merchant 1980; Rabiela y col., 1982; Hernández-Jauregui y col., 1983; Escobar, 1983; Molinari y col., 1983a, 1983b, 1986; Aluja y Vargas, 1988).

Inmunidad en cisticercosis porcina

En estudios histopatológicos de cisticercosis porcina se ha identificado que al inicio existe un foco de infiltración celular discreto, formado principalmente por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos, predominando los 2 primeros tipos celulares (Grado 1). Eosinófilos y en menor número macrófagos son atraídos hacia el borde interno de la zona inflamatoria que rodea la cavidad que contiene al metacéstodo. En la periferia de la zona inflamatoria se observan hiperemia y diapedesis en las arteriolas y capilares (Grado 2). El incremento de eosinófilos en los tejidos que rodean al metacéstodo, es el indicador más importante de que el proceso destructivo ha comenzado. Algunos eosinófilos se adhieren a la pared vesicular del parásito y pueden observarse degranulando. Los macrófagos comienzan a alinearse en empalizadas (células epitelioides) y se forman agregados de células linfoides dentro de la extensa zona granulomatosa. (Grado 3). En etapas tardías, la degeneración del tegumento del parásito coincide con la presencia de células epitelioides, células gigantes y numerosos fibroblastos que se alinean para limitar la lesión. Los eosinófilos presentes entre el metacéstodo y las células epitelioides están necrosados. Los agregados de células linfoides son extensos y con mitosis. Muchos eosinófilos se observan dentro del canal espiral. La cavidad de la vesícula está llena con material acidófilo y células necróticas (Grado 4). Cuando la degeneración del parásito es completa, pocos detalles estructurales son reconocibles excepto por los corpúsculos calcáreos y ganchos. El contenido de la vesícula del parásito es una masa de material necrosado con macrófagos que fagocitan restos celulares, raramente se observa calcificación. Fibroblastos y células gigantes en mayor número forman una cápsula y en el granuloma ya no se encuentran linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Los agregados linfoides se muestran más pequeños o

ausentes (Grado 5). Finalmente, el lugar que ocupaba el metacésto es invadido por tejido fibroso. Las células inflamatorias son escasas, los ganchos y corpúsculos calcáreos son las únicas estructuras que pueden ser identificables. La cavidad del metacésto se localiza dentro de tejido conectivo y adiposo interfascicular y parece estar rodeada por una capa delgada de células, sugerente de endotelio capilar (Grado 6) (Aluja y Vargas, 1988).

Recientemente, por estudios de inmunohistoquímica se ha examinado el tipo de linfocitos presentes en la reacción inflamatoria en cerdos naturalmente infectados observando que la organización de una respuesta inflamatoria activa contra el metacésto en cerdos incluye la participación secuencial de células CD4⁺, CD8⁺ y linfocitos B (Pérez-Torres y col., 2002). Por lo tanto, la inmunidad más relevante contra el metacésto en cerdos es la respuesta celular (Molinari y col., 1983a, 1983b).

Existe evidencia de que la respuesta celular está disminuida mientras los parásitos están viables. En cisticercosis porcina, se ha reportado inmunosupresión causada por el metacésto, ya que en estudios histológicos se ha observado una mínima reacción inflamatoria alrededor de los metacéstos viables (Molinari y col. 1983a) y en ensayos de transformación blastoide, una disminución de la respuesta proliferativa inducida por Con A de linfocitos provenientes de cerdos cisticercosos (Molinari y col. 1993). También se ha detectado una disminución de linfocitos T proporcional a la carga parasitaria y la relación de linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ está alterada por un incremento en la subpoblación de células CD8⁺ (Molinari y col. 1987; Tato y col. 1987).

Inmunidad en Neurocisticercosis

En estudios de autopsias en humanos se ha reportado que en pacientes que no presentaban síntomas de neurocisticercosis, los metacéstodos estaban viables y rodeados por una discreta reacción inflamatoria (estadio vesicular) (Ridaura, 1987), en tanto que, en la mayor parte de los metacéstodos provenientes de pacientes con enfermedad activa, se observaba una respuesta inflamatoria prominente (Escobar, 1983; Gutierrez, 1990). Al perder el cisticerco la capacidad para modular la respuesta del huésped, la pared del metacéstodo es infiltrada y rodeada por células inflamatorias principalmente mononucleares. Las células inflamatorias entran al líquido vesicular dándole un aspecto gelatinoso (estadio coloidal). Esta respuesta se asocia con la producción de citocinas Th1 como IFN- γ e IL-2 (Restrepo y col., 1998). La respuesta del huésped progresa hacia la fibrosis alrededor del metacéstodo, cuya pared es reemplazada por nódulos linfoides focales y necrosis (estadio nodular-granular). Eventualmente, el parásito es reemplazado por estructuras de colágena y finalmente se calcifica (estadio nodular-calcificado) (Escobar, 1983).

En lo que se refiere a inmunosupresión en pacientes con neurocisticercosis, las evidencias son controversiales, Correa y col. (1989) observaron una reducción de la proliferación in vitro de células mononucleares de sangre periférica cuando eran estimuladas con mitógenos (PHA o Con A); mientras que, Medina y col. (2001) reportaron que en casos activos de neurocisticercosis no hay inmunosupresión.

Por otro lado, se ha buscado la presencia de citocinas en pacientes con neurocisticercosis y se han encontrado niveles elevados de citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6 en LCR de pacientes con enfermedad activa (Ostrosky-Zeicher y col., 1996), un incremento de IL-5 en suero y LCR y de cotaxina en suero de pacientes (Evans y col., 1998).

Más aún, en cortes de cerebro utilizando inmunohistoquímica se ha demostrado que la respuesta inmunológica *in situ*, al inicio es principalmente de tipo celular con producción de citocinas proinflamatorias, especialmente IL-12 que se asocia con una respuesta Th1 (Restrepo y col., 1998) y al progresar la infección, la respuesta es mixta (Th1/Th2) (Restrepo y col., 2001).

Respuestas inmunes en cisticercosis experimental

La infección de ratones con metacéstodos de *T. crassiceps*, es un modelo de cisticercosis experimental que ha sido empleado para estudiar la participación de los linfocitos (Th1 o Th2) en esta parasitosis y que ha aportado información valiosa.

Se ha demostrado que en infecciones tempranas, la carga parasitaria es mínima y la respuesta se polariza hacia Th1 (Terrazas y col., 1998) mientras que, más tarde en la infección se produce predominantemente una respuesta Th2 contra los metacéstodos, pues al estimular células de bazo con Con-A, hay incremento en la producción de IL-4, IL-6 e IL-10 mientras que, la producción de IL-2 e IFN- γ está disminuida (Larralde y col., 1995; Villa y Kuhn 1996; Terrazas y col., 1998). Sin embargo, la respuesta Th2 en los ratones infectados, no es efectiva para controlar el crecimiento de los metacéstodos ya que la carga parasitaria se incrementa en ratones con infección crónica. Esto se confirma en estudios realizados *in situ* en cisticercos de *T. crassiceps* donde se observaron granulomas tempranos con características de una respuesta tipo Th1 mientras que, en los granulomas tardíos, en los que el parásito está destruido se observa una mezcla de respuestas Th1 y Th2, sugiriendo que la respuesta Th1 juega un papel importante tanto en la patogenia de la enfermedad como en la eliminación de los parásitos mientras que, la aparición de una respuesta Th2 (IL-4) se relaciona con la regulación negativa de la respuesta inicial (Robinson y col., 1997). A nivel sistémico, se

ha reportado también que ratones Balb/c con cisticercosis experimental (*T. crassiceps*) muestran una respuesta mixta Th1/Th2, ya que los niveles de IL-4 e IFN- γ en suero se incrementan en la infección tardía (Toenjes y col., 1999). La respuesta inmune inicial durante la cisticercosis experimental también es una respuesta mixta Th1/Th2 con la producción de IFN- γ que es rápidamente seguida por la producción de IL-10 (Toenjes y Khun, 2003).

6. Evasión de la Respuesta Inmune

Utilizando modelos experimentales se han identificado diferentes mecanismos de evasión utilizados por los cisticercos para modular las respuestas inmunes específicas y la inflamación en el huésped.

Se ha reportado la presencia de un receptor Fc de la IgG en la superficie del metacéstodo de *T. solium* que puede unir inmunoglobulinas (Mandujano y col., 1985). Este receptor podría mediar la endocitosis de inmunoglobulinas observada en *T. taeniaeformis* y *T. crassiceps* (Ambrosio y col., 1994; Hayunga y col., 1989; Kalinna y col., 1993). Además, el metacéstodo de *T. solium* puede usar estas inmunoglobulinas como fuente de proteínas debido a que produce proteasas que las digieren (White y col., 1992). Se ha descrito que *T. taeniaeformis* secreta un inhibidor de serina proteasa llamado teniastatina, el cual inhibe la activación del complemento, disminuye la proliferación de linfocitos y la producción de IL-1 e IL-2 (Suquet y col., 1984; Leid y col., 1987), y que los polisacáridos sulfatados, que recubren la superficie del metacéstodo al ser secretados, activan y consumen el complemento a distancia (Letonja y Hammerberg, 1983). Las prostaglandinas E2 (PGE2) elaboradas por los metacéstodos de *T. taeniaeformis* disminuyen la inflamación y polarizan la respuesta hacia la producción de citocinas del tipo Th2 (Leid y McConnell 1983; Maizels y col., 1993;

Katamura y cols., 1995). Por otro lado, el tratamiento de ratones con PGE2 antes de la infección incrementa el crecimiento de metacéstodos de *T. crassiceps* disminuyendo las respuestas a Con A y la secreción de citocinas Th1 e incrementando los niveles de IL-6 e IL-10 (citocinas Th2) (Terrazas y col., 1999).

Se ha descrito un antígeno inmunodominante que secretan los metacéstodos de *T. solium* (antígeno B) de aproximadamente 95 kDa, que es una paramiosina y que inhibe la vía clásica de activación del complemento al unirse a C1q *in vitro* (Laclette y col., 1992; Landa y col., 1993) y un factor del metacéstodo (FM), de bajo peso molecular que es secretado *in vitro* y que modula la respuesta inmune. El FM inhibe la respuesta inmune contra antígenos de *Salmonella typhimurium in vivo* (Molinari y col., 1989); la proliferación de linfocitos humanos y murinos en respuesta a mitógenos (Molinari y col., 1990; Tato y col., 1995); la reacción inflamatoria alrededor de metacéstodos de *T. solium* implantados subcutáneamente en ratones y la respuesta humoral y celular contra antígenos del parásito (Tato y col., 1996). El FM también inhibe la producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-4 en células esplénicas de ratón y de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS e IFN- γ (Arechavaleta y col., 1998). Además, se ha descrito un factor tipo LPS que induce activación policlonal de linfocitos B (Sealey y col., 1981).

Los metacéstodos de *T. solium* producen cisteína-, aspártico-, y metalo-proteasas (White y col., 1992), se ha descrito que una cisteína proteasa secretada por *T. crassiceps* es la enzima predominante involucrada en la degradación de IgG (White y col., 1997b). Más aún, se ha mostrado que productos de expresión/secreción (E/S) de metacéstodos viables de *T. solium* con actividad de cisteína proteasa disminuyen *in vitro* la cantidad de linfocitos CD4⁺ importantes para la respuesta inmune del huésped (Molinari y col., 2000).

7. Vacunación de cerdos

La vacunación de cerdos puede ser una potente estrategia para la erradicación de la neurocisticercosis (Molinari y col., 1993a; Lightowlers, 1999; Plancarte y col., 1999). La capacidad inmunogénica de un extracto antigénico de metacéstodos fue evaluada en poblaciones de cerdos de una zona endémica de cisticercosis en el estado de Guerrero, México y se encontró que la cisticercosis en cerdos disminuyó su frecuencia de 5.2% a 0% en un primer estudio (Molinari y col., 1993a) y de 2.6% a 0.45% en un segundo (Molinari y col., 1997). El contar con muchas especies de *Taenia* que infectan diferentes mamíferos (roedores, ovinos y bovinos) ha permitido realizar estudios que demuestran que es posible adquirir inmunidad protectora contra la cisticercosis por medio de la vacunación. Estos estudios han utilizado diferentes antígenos como extractos crudos obtenidos de oncosferas, cisticercos o gusanos adultos y los resultados han mostrado que la inoculación de oncosferas vivas o sus antígenos ha sido el mecanismo más efectivo para prevenir la infección. Recientemente, con el uso de proteínas recombinantes y DNA como vacunas contra cisticercosis en roedores, ovinos y bovinos se han obtenido también altos grados de inmunidad (Johnson y col., 1989; Ito y col., 1991; Harrison y col., 1996; Lightowlers y col., 1996).

Resultados con diferentes antígenos para proteger a los cerdos contra el reto oral con huevos de *T. solium* se resumen en el Cuadro 2, donde se puede observar que los antígenos que se han utilizado son del metacéstodo completo, del escólex, fluido vesicular, secreciones y excreciones, huevos y oncosferas. Los mejores resultados se han obtenido con huevos y antígenos de oncosferas (91 y 95% de protección) probablemente porque la infección es controlada por la respuesta inmune muy tempranamente. Estos estudios indican que la cisticercosis porcina puede ser controlada

por vacunación y las expectativas para la producción de una vacuna efectiva son muy alentadoras, una de las estrategias usadas ha sido identificar proteínas nativas derivadas del parásito, las cuales tengan una alta probabilidad de inducir inmunidad protectora. El uso de proteínas recombinantes de oncosferas ha mostrado alta eficacia y ha resuelto el problema de tener que conseguir cisticercos para la producción de la vacuna.

Cuadro 2. Establecimiento de cisticercos de *T. solium* en cerdos vacunados y con diferentes antígenos.

Referencia	Vacuna	Cerdos	Desafío No. huevos	Porcentaje de establecimiento ³	Porcentaje de Protección
Herbert y Oberp/1974	Testigos	3	4,300	3.4	96.0
	¹ Huevos (2 dosis)	4	3,900	0.1	
Molinari/1983 ⁴	Testigos	5	8400	0.9	84.8
	Extracto crudo de metacístodos	6	8400	0.1	
Nascimento/1995	Testigos	4	10,000	9.3	65.0
	Extracto crudo de escólex	7	10,000	3.2	
Manoucharian/1996	Testigos	6	10,000	0.05	50.0
	Fluido vesicular	7	10,000	0.02	
	Proteínas (56. 66 y 74 Kda)	6	10,000	0.002	
Kumar/1987	Testigos	4	15,000	1.7	77.6
	² Pico2	4	15,000	0.4	
	² Pico1	4	15,000	0.04	
Pathak/1990	Testigos	8	15,000	2.5	94.9
	² E/S de oncosferas	8	15,000	0.1	
Plancart/1999	Testigos	5	25,000	0.7	77.3
	⁴ Proteína recomb.	5	25,000	0.2	
	Extracto crudo de oncosferas	5	25,000	0.06	

¹ Infección con huevos de *T. solium*

² Fracciones obtenidas de la cromatografía en Sephadex G-200 de antígenos de escólices

³ Productos de excreción/secreción

⁴ Proteína recombinante de *T. ovis*

⁵ Las diferencias entre los porcentajes de establecimiento en cada experimento se pueden deber a las condiciones de la infección y a la viabilidad de los huevos.

ANTECEDENTES

Se sabe que en muchas infecciones parasitarias, las respuestas que conllevan a la resolución o al progreso de la enfermedad dependen de la subpoblación de células CD4+, Th1 o Th2 que se induzcan. IFN- γ , IL-2 y TNF- β son citocinas producidas por la subpoblación Th1 mientras que, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 son producidas por Th2 (Mossman y Coffman, 1989). Los linfocitos Th1 son importantes para la inducción de inmunidad mediada por células. En contraste, las células Th2 median respuestas inmunes por anticuerpos (Pearce y Sher, 1989).

La eosinofilia y la producción de IgE (total y específica) son características inmunológicas que se presentan en la infecciones por helmintos (Okano y col., 1999; Bueno y col., 2000a; 2000b) y que dependen de una respuesta tipo Th2 (Sher y Coffman, 1992), ya que este grupo de linfocitos es fuente principal de IL-5 (encargada de controlar la producción de eosinófilos) (Clutterbuck y col., 1989; Sanderson 1990), y de IL-4 e IL-13 (que estimulan la producción de IgE) (Pene y col., 1988. Banhereau y Rousset, 1991; Punnonen y col., 1993). Se ha descrito en esquistosomiasis humana que la presencia de eosinofilia (Sturrock y col., 1983; Hagan y col., 1985) y respuestas elevadas por anticuerpos específicos IgE (Hagan y col., 1991; Dunne y col., 1992), se correlacionan con resistencia a la reinfección.

Los eosinófilos son las células efectoras en la inmunidad contra *Trichinella spiralis* (Kazura y Aikawa, 1980; Vallance y col., 2000), *Onchocerca volvulus* (Greene y col., 1981), *Brugia malayi* (Sim y col., 1982), *Toxocara canis* (Fattah y col., 1986), *Angiostrongylus costaricensis* (Sugaya y col., 2002), *Schistosoma mansoni* (Grezel y col., 1993; Dunne y col., 1993; Butterworth y col., 1977; Dombrowics y col., 2000) y *Taenia solium* (Molinari y col., 1983a, 1983b; Willms y Merchant, 1980).

Los anticuerpos IgE al igual que los IgG, contribuyen a la muerte de helmintos por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Capron y col., 1982). Este proceso ha sido definido y caracterizado en varios modelos experimentales *in vitro* (Butterworth y col., 1977; Butterworth 1984; Mehta y col., 1981; Chandrashekar y col., 1985; Gansmuller y col., 1987; Capron y Capron, 1992), aunque su relevancia *in vivo* no ha sido claramente establecida (Jennifer, 1998).

En cisticercosis, se han investigado los mecanismos de inmunidad que conducen a la eliminación y destrucción de los metacéstodos, ya que éstos pueden sobrevivir por largos periodos en los tejidos del huésped sin que se establezca una respuesta capaz de eliminarlos. Sin embargo, es posible inducir respuestas inmunes capaces de eliminar a los metacéstodos mediante la vacunación. Molinari y col. (1983a), demostraron que antígenos obtenidos de metacéstodos de *T. solium* inoculados en cerdos, son capaces de inducir respuestas de tipo celular que llevan a la muerte y destrucción de los parásitos, tanto en cerdos inmunizados e infectados experimentalmente con huevos del parásito como en cerdos naturalmente parasitados e inmunizados (Molinari y col., 1983b). La cinética de las respuestas inducidas por los antígenos de metacéstodos en cerdos se resumen a continuación. Después de la inmunización se observa un incremento de eosinófilos en sangre periférica (17%) (Molinari y col., 1983b). Los eosinófilos abandonan los vasos sanguíneos y migran por los tejidos hasta llegar al sitio donde se han establecido los parásitos. Por estudios de histopatología se ha mostrado que los antígenos inducen una intensa reacción inflamatoria alrededor de los metacéstodos, compuesta por eosinófilos, linfocitos, macrófagos, células epiteloides, células plasmáticas y fibroblastos (Molinari y col., 1983a, 1983b). Estas células inflamatorias infiltran el canal espiral del parásito y los gránulos liberados de los eosinófilos empiezan la destrucción del tegumento y parénquima del metacéstodo como se ha

documentado por estudios de microscopía de luz y electrónica (Molinari y col., 1983b, 1986). Finalmente, se produce la destrucción completa del parásito, se observa al parásito totalmente caseificado y con gran cantidad de células inflamatorias donde antes se encontraban sus estructuras (Molinari y col 1983a, 1983b). Estos antecedentes muestran que la presencia de eosinófilos inducidos por los antígenos de metacéstodos de *T. solium* juegan un papel importante como células efectoras en la degeneración y destrucción de los metacéstodos.

Se requiere de un estudio que permita entender las respuestas inducidas por los antígenos del metacéstodo de *T. solium*, y caracterizar a los antígenos responsables de esta inmunidad. Esto se ha dificultado por la falta de un modelo experimental accesible, ya que trabajar con el huésped intermediario (cerdo) es difícil y costoso, y la falta de accesibilidad de reactivos biológicos como anticuerpos anti-isotipos de inmunoglobulinas de cerdo (anti-IgE y subclases de IgG) para la evaluación de la respuesta inmune. Es por ello, que la finalidad del presente trabajo fue estudiar y caracterizar la respuesta inmune generada por los antígenos de metacéstodos de *T. solium* utilizando como modelo experimental ratones de la cepa Balb/c.

HIPÓTESIS

Existen evidencias de que los eosinófilos forman parte de la respuesta inmune inducida por componentes antigénicos del metacéstodo de *Taenia solium* en cerdos naturalmente parasitados e inmunizados y que estas células son responsables de la destrucción del parásito. Luego entonces, algunos antígenos del metacéstodo deben inducir la producción de citocinas Th2 relacionadas con la eosinofilia y relacionadas con la síntesis de anticuerpos específicos que median la degranulación de estas células.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue estudiar y caracterizar la respuesta inmune generada por los antígenos de metacéstodos de *T. solium* determinando los patrones de citocinas y de isotipos de anticuerpos que inducen en ratones de la cepa Balb/c.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estimar la eosinofilia en sangre periférica de ratones inoculados con los antígenos de metacéstodos de *Taenia solium*.
2. Determinar anticuerpos específicos de los isotipos IgE e IgG y de las subclases de IgG hacia los antígenos de metacéstodos de *Taenia solium* en suero de ratones inmunizados.

3. Identificar las proteínas de metacéstodos de *Taenia solium* que son reconocidas por los diferentes isotipos y subclases de anticuerpos.
4. Purificar proteínas de los metacéstodos de *T. solium* por cromatografía.
5. Determinar *in vitro* que fracciones incluyen proteínas que participan en la inducción de la síntesis de mensajeros para IL-4 e IL-5 en células esplénicas de ratones inmunizados con antígenos de metacéstodos de *T. solium*.
6. Investigar si las proteínas purificadas que inducen IL-4 e IL-5 estimulan la producción de anticuerpos IgE y eosinofilia *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de antígenos de metacéstodos de T. solium.

Los metacéstodos se disecaron cuidadosamente de carne de cerdos parasitados con metacéstodos de *T. solium* y fueron lavados exhaustivamente con agua desionizada. Posteriormente se colocaron en un mortero y se molieron con arena de vidrio utilizando un amortiguador de fosfatos de sodio 0.01 M pH 7.2, que contenía, además, cloruro de magnesio 0.012 M, sacarosa 0.25 M, desoxicolato de sodio 0.4% y cloruro de potasio 0.1 M. Una vez que se obtuvo una masa rosada, en la que no se observaban ya los escólices, se agregó desoxirribonucleasa 20 µg/ml y se incubó durante 1 h a 38°C. Al finalizar la incubación, el material se centrifugó a 15 000 rpm por 20 min y el material sobrenadante, se dializó contra un amortiguador de fosfatos de sodio 0.01 M, pH 7.2. Al término de la diálisis, el material se centrifugó a 15 000 rpm por 15 min a 4°C y el sobrenadante se filtró usando membranas de Millipore (Bedford, MA.) de 0.22 µm (Molinari y col., 1993). Al material filtrado se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976), se liofilizó y se conservó a 4°C hasta su uso.

Electroforesis (PAGE-SDS)

Con el fin de conocer cuantas proteínas y los pesos moleculares aproximados que tienen los antígenos de metacéstodos de *T. solium*, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en presencia de 0.4% SDS y en condiciones reductoras (β -mercaptoetanol) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Se depositaron 40 µg de proteína del antígeno de metacésto do por pozo. Se incluyeron estándares de peso molecular preteñidos (Bio-Rad, Hércules, CA.). El corrimiento se realizó a 100 V durante 2

h. Entonces, el gel fue teñido con azul de Coomassie al 5% durante toda la noche y se eliminó el exceso de colorante con una solución que contenía 10% de ácido acético y 15% de metanol hasta que se observaran con claridad las bandas, luego se secó para su análisis.

Se realizó una tinción para glicoproteínas con el fin de determinar cuantos de los polipéptidos presentaban carbohidratos asociados. Posterior al corrimiento electroforético, el gel se incubó en una solución de ácido acético al 7.5% durante 1 h a temperatura ambiente, después se transfirió a una solución de ácido peryódico al 0.2% en agua, incubando por 45 min a 4°C. Posteriormente, se eliminó el ácido periódico y se agregó el reactivo de Schiff y se incubó por 45 min a 4°C. El gel se destiñó con ácido acético al 10%, los geles se desecaron y se analizaron. Las bandas que contienen carbohidratos se tiñen de color rojo sobre un fondo rosa (Zacharius y col., 1969).

Purificación de proteínas

a) Cromatografía de intercambio iónico.

La purificación de proteínas se realizó por cromatografía de intercambio iónico empleando un sistema de FPLC (Pharmacia, Piscataway, NJ.), a este sistema se acopló una columna Hi-Trap Q de 5 ml. Se depositó una muestra de 15 mg de proteína (peso seco) por corrimiento, resuspendida en 1.5 ml de amortiguador Tris 9 mM, pH 7.6. La elución se llevó a cabo por un gradiente continuo de NaCl de 0 a 1 M en el amortiguador de Tris. Se colectaron fracciones de 1.5 ml y se mezclaron las fracciones que correspondían a los diferentes picos y se dializaron contra el amortiguador de Tris para quitar el exceso de sal. Se liofilizaron y se le determinó a cada pico la concentración de proteína utilizando el método de Bradford (1976). Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% en

presencia de SDS de cada pico para determinar grado de pureza y caracterizar las proteínas presentes.

b) Electroelución.

La electroelución se empleó también para la purificación de proteínas de los antígenos de metacéstodos siguiendo el método descrito por Bhaskar (2000) con algunas modificaciones. Brevemente, se prepararon geles (1.5 mm de grosor) de poliacrilamida al 8.5% con 0.4% de SDS. Se depositaron 200 μ g de proteína del antígeno de metacéstodo por cada pozo (1 cm) y el corrimiento se realizó a 130 V durante 1.5 h. Al término, el gel fue teñido con la tinción reversible Imidazol-SDS/Sulfato de Zinc. Se coloca el gel por 20 min en la solución de Imidazol 0.2M-SDS 0.047%, y se lava el gel con varios cambios de agua. Se le agrega una solución de Sulfato de Zinc 0.25 M hasta que se observen bandas transparentes sobre un fondo blanco. Se cortan las bandas, se destiñen con EDTA 0.5M, pH 8, se lavan con varios cambios de agua y se les agrega amortiguador de electroelución (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%).

Las bandas con las proteínas se cortan en fragmentos muy pequeños y se depositan en una cámara de electroelución (Modelo 420, Bio-Rad, Hércules CA.). La electroelución de las proteínas se lleva a cabo durante 4 h a 10 mA por tubo, en corriente constante. Para eliminar el exceso de SDS, se deja la electroelución media hora más en el amortiguador sin SDS.

Se recolectan las proteínas electroeluidas y concentradas en un volumen de 300-500 μ l y se mide su densidad óptica a 280 nm. Las proteínas purificadas se dializan contra un

amortiguador de Tris 1mM pH 7.6 y se realiza electroforesis para determinar la pureza de las proteínas obtenidas.

Inmunización de ratones Balb/c con antígenos del metacésto

Con el fin de estudiar la respuesta que inducen los antígenos de los metacésto de *T. solium* en los ratones, se inocularon por vía subcutánea grupos de 10 ratones Balb/c, hembras, de 6-8 semanas de edad, con 100 µg de antígeno (completo o semipurificado) suspendido en 0.1 ml de solución salina. Diez días después, se les aplicó una segunda dosis en las mismas condiciones. Se incluyeron grupos de animales testigo inoculados únicamente con solución salina.

Análisis de la eosinofilia en sangre periférica

La eosinofilia se midió diariamente por 10 días, iniciando 24 h después de aplicar la segunda dosis de antígenos. Los ratones inmunizados con el antígeno completo o semipurificado y testigos se sangraron por la vena de la cola y los eosinófilos fueron contados siguiendo la técnica descrita por Raphael (1983), que consiste en diluir la sangre (1:20) con el colorante de Hinkleman's (amarillo de eosina, formol al 40% y fenol al 95% en agua), el cual tinte los gránulos de los eosinófilos de color naranja. Para el conteo de los eosinófilos se utilizó un hemocitómetro y los resultados se expresaron como eosinófilos/mm³.

Ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación se llevaron a cabo con células de bazo de los ratones siguiendo el método descrito por Arechavaleta (1998). Quince días después de la segunda inmunización, los bazos provenientes de los ratones inmunizados y testigos se removieron en condiciones de esterilidad y se colocaron en cajas de petri conteniendo medio RPMI. Los bazos se perfundieron con 5 ml de medio utilizando una jeringa hasta conseguir una suspensión celular. las células esplénicas se lavaron una vez por centrifugación a 400 g por 10 min y después se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco BRL, Grand Island, NY.), 10UI/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomycin (RPMI completo). La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de azul de tripano y las suspensiones celulares se ajustaron a 5×10^6 células/ml. Alícuotas de 5×10^5 células se colocaron por triplicado en cajas de cultivo de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA.). Los antígenos de metacéstodos de *T. solium* se dispensaron en concentraciones de 0.5, 2.5 y 5 µg de proteína por pozo y por triplicado. Los cultivos se incubaron en una atmósfera de 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C por 7 días. Dieciseis horas antes de cosechar las células, se agregó 1 µCi de [H³]-thymidine (74 GBq/mmol: ICN, Irvine, CA.) a cada cultivo. Las células se cosecharon en papel filtro de microfibra de vidrio (Whatman 934-AH, Maidstone, England) y lavadas con agua destilada usando un multicosechador automático (Nunc, Roskilde, Denmark). La incorporación de tímida tritiada se midió en un contador de centelleo (Packard Tri-card 300 Beckman Instruments Inc. Fullerton, CA.). Los datos se expresaron como la media de las cuentas por minuto ± error estándar (ES).

Expresión de RNAs mensajeros de citocinas

Se determinó la expresión de RNAs mensajeros de citocinas por RT-PCR. Se indujo la expresión en células esplénicas (5×10^6 células/ml) de ratones inmunizados y testigos, mediante incubación a 37°C con 5% de CO₂ en cajas de cultivo de 24 pozos añadiendo 1 ml de RPMI completo con Con A (5 µg) por 4 h o con 1 ml de RPMI completo con antígenos de metacéstodos totales (5 µg) o 1 ml del material de los picos obtenidos (5 µg) de la cromatografía de intercambio iónico por 64 h. Los RNAs de las células esplénicas se extrajeron después de la incubación con Con A o con los antígenos de metacéstodos completos o semipurificados (columna Hi-trap Q) usando una técnica estándar (Chomezynski y Sacchi, 1987). En todos los casos, 0.5 a 1 µg de RNA total se usó en las reacciones con la enzima DNA polimerasa dependiente de RNA (transcriptasa reversa). Las secuencias de los iniciadores usados para PCR de las siguientes citocinas son las descritas por Cook (1993).

IL-2	5'-ATGTACAGCATGCAGCTCGCATC-3'
	5'-GGCTTGTTGAGATGATGCTTTGACA-3'
IL-4	5'-ATGGGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3'
	5'-GCTCTTTAGGCTTTCCAGGAAGTC-3'
IL-5	5'-TGGAGATTCCCATGAGCACAGTGG-3'
	5'-AGGAAGTCTTGCAGGTAATCCAGG-3'
IFN-γ	5'-TGAACGCTACACACTGCATCTTGG-3'
	5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG-3'

Todas las reacciones de amplificación se realizaron con 30 ciclos en un termociclador (MJ Research, Inc. Watertown, MA.). El programa de los ciclos para PCR

consistió en: desnaturalización por 1 min a 94°C, hibridización por 2 min a 60°C y extensión por 3 min a 72°C, terminando con una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (5µ/50 ml) en 0.5X TBE (Tris base 0.5 M, ácido bórico 0.9 M, EDTA 0.01 M) a 100 V por 45 min y fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta. Los productos esperados de amplificación eran: IL-2 502 pb, IL-4 399 pb, IL-5 304 pb e IFN-γ 460 pb. Se incluyeron estándares de peso molecular (Ready Load 100 bp DNA Ladder, Gibco BRL, Grand Island, NY.)

Determinación de isotipos de los anticuerpos específicos

Se realizaron pruebas de ELISA para cuantificar los anticuerpos específicos IgG e IgE en el suero de los ratones inmunizados. Se incubaron placas de 96 pozos, toda la noche a 4°C con los antígenos de metacéstodos (3 µg/ml) y se bloquearon durante 30 min a 37°C con leche semidescremada (Svelty) al 5% en PBS pH 7.4 que contenía 0.3% de Tween 20. Se colocaron en las placas las diluciones de los sueros (1:100) y se incubaron durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se depositaron los anticuerpos peroxidados anti-IgG de ratón policlonal de conejo (1:8000) (Sigma, St. Louis, MO.) o anti-IgE de ratón monoclonal de rata (1:1000) (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL.). Las subclases de IgG fueron también detectadas usando anticuerpos anti-ratón policlonales de conejo IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 (1:8000) (ZYMED Laboratories, Inc. San Francisco, CA.). Los anticuerpos específicos fueron visualizados usando o-fenilendiamina y agua oxigenada al 3% como sustrato de la peroxidasa. La actividad enzimática fue detenida con H₂SO₄ y la determinación de los valores se realizó en un lector de ELISA a una densidad óptica

(DO) de 492 nm. Los valores de corte fueron definidos como la media aritmética + 3 desviaciones estándar (DS) de las actividades de los anticuerpos en los sueros de animales testigos.

Inmunoelectrotransferencia

Para determinar las especificidades de los anticuerpos IgG e IgE y de las subclases de IgG, los antígenos de metacéstodos de *T. solium* fueron electrotransferidos a papel de nitrocelulosa siguiendo el método previamente reportado (Towbin y col., 1979), pero a 18 V por 57 min y en una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad, Hércules, CA.). Los sitios libres de la membrana fueron bloqueados con leche semidescremada (Svelty) al 5% en agitación constante por 2 h a temperatura ambiente. Se cortaron tiras de 3 mm y se incubaron individualmente con los sueros de ratones inmunizados y testigos, diluidos 1/100 en PBS pH 7.4 que contenía 0.3% de Tween 20, en agitación constante por 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos unidos fueron visualizados al incubar en agitación constantes por 2 h a temperatura ambiente con los anticuerpos de conejo anti-IgG de ratón o anti-subclases de IgG peroxidados en una dilución 1:1500 en el mismo amortiguador o con anticuerpos de rata anti-IgE de ratón en una dilución 1:1000. Las proteínas reconocidas por los diferentes isotipos fueron visualizadas con el sistema substrato H₂O₂/ortocloronaftol. El peso molecular de las proteínas se estimó usando un equipo Office Jet G85 (Hewlett Packard, México) para digitalización y un programa Labworks (Media cybernetics v 3.0).

RESULTADOS

Análisis Electroforético

Los ensayos electroforéticos mostraron que los antígenos de los metacéstodos de *T. solium* contienen al menos 18 polipéptidos diferentes con pesos moleculares entre 220 y 7 kDa como se puede observar en la Figura 2.

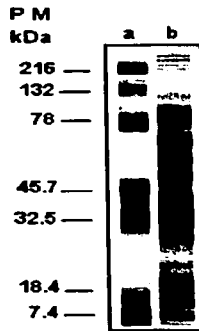


Figura 2. Electroforesis de los antígenos de metacéstodos de *T. solium* en gels de poliacrilamida en presencia de SDS. a) Marcadores de peso molecular: miosina (216 kDa), β -galactosidasa (132 kDa), albúmina sérica bovina (78 kDa), anhidrasa carbónica (45.7 kDa), inhibidor de tripsina (32.5 kDa), lisosima (18.4 kDa) y aprotinina (7.4 kDa). b) Antígenos de metacéstodos.

Con el fin de determinar cuales de los antígenos de metacéstodos eran glicoproteínas se realizó otra electroforesis en las mismas condiciones pero el gel se tiñó con PAS, los resultados mostraron que al menos 7 polipéptidos son glicoproteínas (35, 42, 56, 66, 76 y 80 kDa) y que 5 de ellos corresponden a antígenos inmunodominantes (35, 56, 66, 76 y 80 kDa) (Fig. 3).

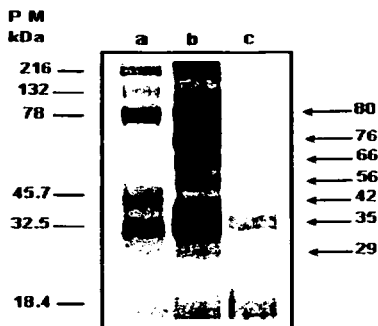


Figura 3. Electroforesis de los antígenos de metacéstodo de *T. solium* en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. a) Marcadores de peso molecular. Antígenos de metacéstodos teñidos con: b) Azul de Coomassie y c) PAS

Para determinar si en la preparación antigénica teníamos antígenos conocidos de *T. solium* como la paramiosina y en vista de que teníamos una banda con peso molecular de 95 kDa, se realizó una inmunotransferencia y se reveló con suero anti-paramiosina (amablemente donado por Dr. Abraham Landa). Los resultados mostraron que el suero anti-paramiosina reconoció 2 bandas con pesos moleculares aproximados de 95 y 85 Kda (Fig. 4).

Por otro lado, se determinó si entre los antígenos de metacéstodos también se encontraban proteínas del cerdo como albúmina sérica e inmunoglobulinas, para lo cual realizamos otra inmunotransferencia pero ahora revelamos con anticuerpos anti-albúmina sérica de cerdo y anti-IgG de cerdo. Los resultados mostraron que el suero anti-albúmina de

cerdo reconoció una banda de aproximadamente 74 kDa y el anti-IgG de cerdo 4 polipéptidos con pesos moleculares de 68, 60, 42 y 35 kDa (Fig. 4).

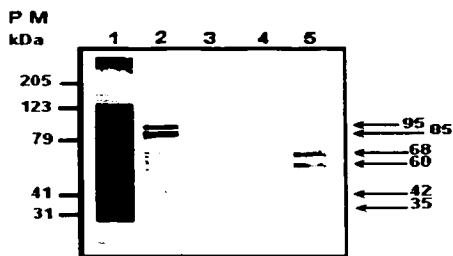


Figura 4. Inmunotransferencia de antígenos de metacéstodos de *T. solium*. Línea 1: Suero anti-antígenos de metacéstodos. Línea 2: Suero anti-paramiosina. Línea 3: Suero anti-albúmina de cerdo. Línea 4: Albúmina de cerdo revelada con anti-albúmina de cerdo. Línea 5: Suero anti-IgG de cerdo.

Ensayos de Proliferación

Las respuestas proliferativas de esplenocitos de ratón a Con A y a los antígenos de metacéstodos totales fueron determinadas 20 días después de la última inmunización. Se encontró que la incorporación de timidina tritiada inducida por Con A no mostró diferencias entre las células de animales testigos y de los inmunizados y los valores fueron mucho más altos que los obtenidos al estimular con los antígenos (datos no mostrados). Los antígenos de metacéstodos indujeron proliferación de las células esplénicas de ratones inmunizados, de una manera dosis dependiente, en comparación con los animales testigo en los cuales la captura de timidina tritiada fue similar a la observada en células cultivadas con medio de cultivo RPMI. Las diferencias en la incorporación de timidina tritiada fueron estadísticamente

significativa ($P < 0.02$) en todas las dosis probadas cuando se compararon con sus testigos (Fig. 5), lo que demuestra que los antígenos indujeron una respuesta celular.

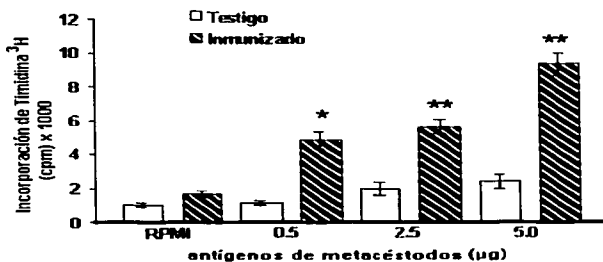


Figura 5. Proliferación de células esplénicas estimuladas con antígenos de metacístodos. Las células esplénicas de ratones inmunizados y testigos fueron estimuladas con diferentes dosis de los antígenos de metacístodos. * $P < 0.02$; ** $P < 0.003$. Los resultados mostrados son representativos de 3 experimentos.

Determinación de RNAm de citocinas

Los RNAm de citocinas fueron determinadas por RT-PCR a partir de células esplénicas de ratones inmunizados (20 días después de la segunda inmunización) y testigos estimuladas con Con A o con los antígenos totales del parásito. Los resultados mostraron que las células, tanto de animales inmunizados como testigos, estimuladas con Con A produjeron RNAm para IL-2, IFN- γ e IL-4 (Fig. 6A). Por otro lado, la estimulación con los antígenos mostró que las células de animales inmunizados produjeron RNAm de IFN- γ , IL-4 e IL-5 mientras que, las células de los animales testigos no presentaron mensajeros (Fig. 6B).

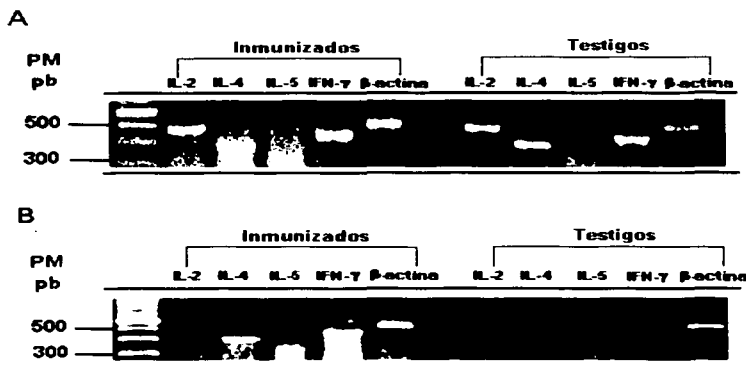


Figura 6. Perfil de RNA mensajeros de citocinas. La determinación de RNAm de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- γ se realizó en células esplénicas de ratones inmunizados con antígenos de metacéstodos de *T. solium* y testigos. A) Estimuladas con Con A (5 μ g/ml). B) Estimuladas con antígenos (5 μ g/ml). Los productos de amplificación de PCR fueron analizados usando geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El peso molecular esperado de los productos de PCR fue: IL-2: 502 pb; IL-4: 399 pb; IL-5: 304 pb; IFN- γ : 460 pb; β -actina: 514 pb.

Cinética de eosinofilia en sangre periférica

Los valores normales de eosinófilos en ratones fluctúan entre 200 y 500 por mm^3 . Los antígenos de metacéstodos de *T. solium* indujeron en ratones un incremento transitorio de eosinófilos en sangre periférica. La eosinofilia empezó el segundo día después de la segunda inmunización y alcanzó su nivel mas alto al tercer día (1383 eosinófilos/ mm^3) ($P < 0.01$). La diferencia observada entre los animales inmunizados y testigos al cuarto y quinto día, fue también estadísticamente significativa ($P < 0.01$). Los eosinófilos regresaron a sus valores normales al séptimo día (Fig. 7).

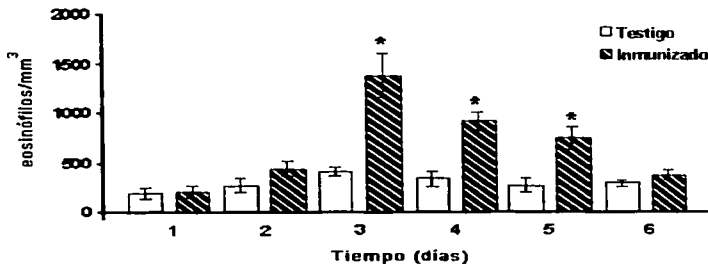


Figura 7. Eosinofilia en sangre periférica de ratones inmunizados y testigos. Los eosinófilos fueron cuantificados diariamente en cada ratón después de la segunda inmunización con antígenos de metacéstodos. * $P < 0.01$.

Determinación de isotipos de anticuerpos

Anticuerpos IgG e IgE específicos contra antígenos de metacéstodos fueron detectados por ELISA en sueros de ratones inmunizados (20 días después de la segunda inmunización) y testigos. Los resultados mostraron que la absorbancia a 492 nm de los sueros de ratones inmunizados fueron similares para IgG e IgE. Los sueros de animales testigos mostraron una absorbancia por debajo de 0.06 (Fig.8A). Al medir las subclases de IgG se encontró que IgG1 fue la más elevada, aunque IgG2b e IgG3 también estaban incrementadas en los sueros de ratones inmunizados ($P < 0.02$) mientras que, la IgG2a permaneció sin cambio. Las subclases de IgG en los sueros de animales testigos (no inmunizados) presentaron absorbancias por debajo de 0.2 (Fig. 8B).

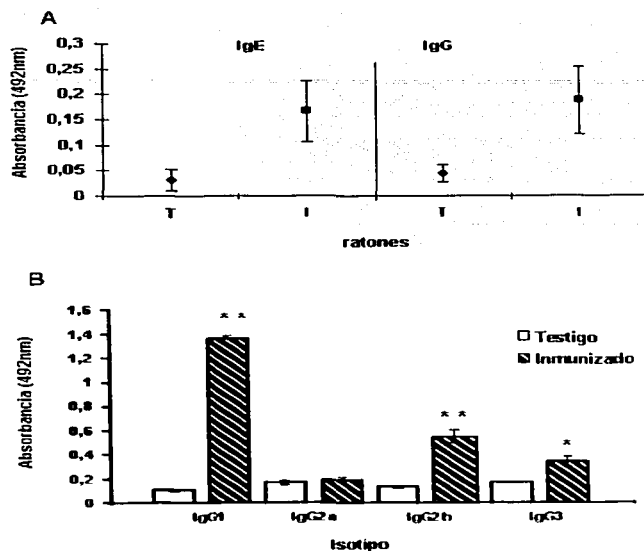


Figura 8. Respuestas de anticuerpos específicos contra antígenos de metacéstodos de *T. solium* determinadas por ELISA. **A)** IgE e IgG (T: testigos e I: inmunizados) y **B)** Subclases de IgG. Los resultados están expresados como la media de la absorbancia a 492nm \pm DS. * $P < 0,012$ y ** $P < 0,0007$.

Determinación de la inmunoreactividad de los anticuerpos IgG e IgE

Tres antígenos de metacéstodos con pesos moleculares de 95, 85 y 7 kDa fueron reconocidos por todas las subclases de IgG y por IgE. Una proteína de aproximadamente 57 kDa fue reconocida por IgG1, IgG2a, IgG2b e IgE. Otros antígenos (52, 30 y 20 kDa) fueron reconocidos por IgG1 e IgG2b (Fig. 9). El segundo anticuerpo y el sustrato al igual que los sueros normales no reaccionaron con los antígenos de metacéstodos como se puede observar

en la Figura 9 (líneas 1, 2 y 3). Dos de las 4 bandas (68 y 60 kDa) que fueron reconocidas por el suero anti- IgG de cerdo (Fig. 3) fueron reconocidas también por los antisueros contra todas las subclases de IgG y por la IgE (Fig. 9).

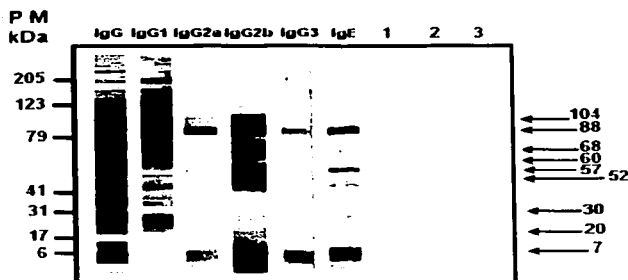


Figura 9. Inmunoreactividad de los anticuerpos IgG e IgE. Tiras de nitrocelulosa que contenían los antígenos de metacéstodos fueron incubadas con sueros de ratones inmunizados y testigos y la inmunoreactividad fue visualizada usando anticuerpos anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 y anti-IgE de ratón. Línea 1: incubada con suero normal y revelada con anti-IgG de ratón. Línea 2: incubada con el segundo anticuerpo. Línea 3: incubada con la solución de sustrato. Se incluyeron marcadores de peso molecular.

Cromatografía de intercambio iónico de los antígenos de metacéstodo

Los antígenos de metacéstodos se separaron en una columna Hi-trap Q y los resultados mostraron que se eluyeron 7 picos a las siguientes molaridades de cloruro de sodio: Pico 1 – 0; Pico 2 – 0.08; Pico 3 – 0.18; Pico 4 – 0.29; Pico 5 – 0.38; Pico 6 – 0.55; y Pico 7 – 1.0. Un perfil de elución típico se puede observar en la Figura 10.

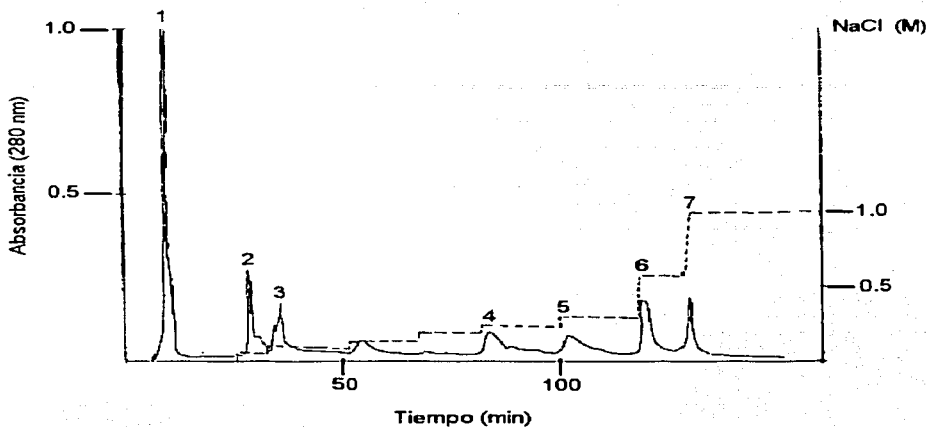


Figura 10. Perfil de elución de los antígenos de metacéstodos separados en una columna Hi-trap Q de intercambio iónico. En este perfil de elución se puede observar la separación de 7 picos y las molaridades a las cuales se obtuvieron.

Se realizó electroforesis de los 7 picos, los resultados de los primeros 5 aparecen en la Figura 11, donde se puede observar que comparten proteínas entre ellos. El análisis de los gels de electroforesis de los 7 picos se puede observar en el Cuadro 3 y muestra que las proteínas de 66, 56 y 35 Kda, fueron eluidas en todos los picos excepto el 6 y 7. Proteínas con pesos moleculares por debajo de 24 Kda son compartidas por todos los picos excepto por el 7, mientras que proteínas de 95 y 80 Kda fueron separadas con alta concentración en el pico 4 junto con proteínas tanto de alto y bajo peso molecular.

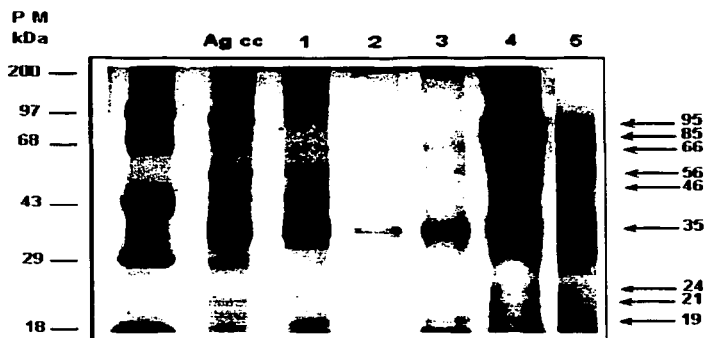


Figura 11. Electroforesis de los picos obtenidos de la cromatografía de intercambio iónico en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. En la primera columna se observan los pesos moleculares y en la segunda los antígenos de metacéstodos completos. Líneas 1-5 contienen el material de los picos 1-5.

Cuadro 3. Proteínas contenidas en los picos obtenidos por cromatografía de intercambio iónico de los antígenos de metacéstodos y estudiadas por electroforesis en presencia de SDS.

PM (kDa)	Ag.CC	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7
210	X	X		X	X			X
190	X	X			X			X
170	X				X			
156	X				X			
95	X				X			
85	X				X			X
73	X				X			
66	X	X	X	X	X	X		
56	X	X	X	X	X	X		
46	X	X		X	X			
38	X				X			
35	X	X	X	X	X	X		
29	X	X				X		
27	X	X		X				
24	X	X			X	X	X	
21	X	X		X	X		X	
19	X	X	X	X				

En este cuadro se puede observar que los picos 2, 3 y 5, contienen 3 proteínas con pesos moleculares de 66, 56 y 35 kDa. Con la finalidad de determinar si estas proteínas inducían la expresión de RNAs mensajeros de citocinas, se realizaron ensayos de PCR utilizando células de bazo de animales inmunizados con los antígenos completos (20 días después de la segunda inmunización) y estimuladas con estos picos (5 µg/ ml de cada uno) y se incubaron durante 44 y 66 h. Los resultados mostraron que los picos 2 y 3 indujeron la expresión de RNAm para IL-5 a las 44 h en los esplenocitos de animales inmunizados mientras que, las células de animales testigos no mostraron la expresión de ningún mensajero para citocinas (datos no mostrados). El pico 5 indujo la expresión de este mensajero hasta las 66 h pero también la expresión de IL-4 e IFN-γ tanto en los animales inmunizados como en los testigos (Fig. 12).

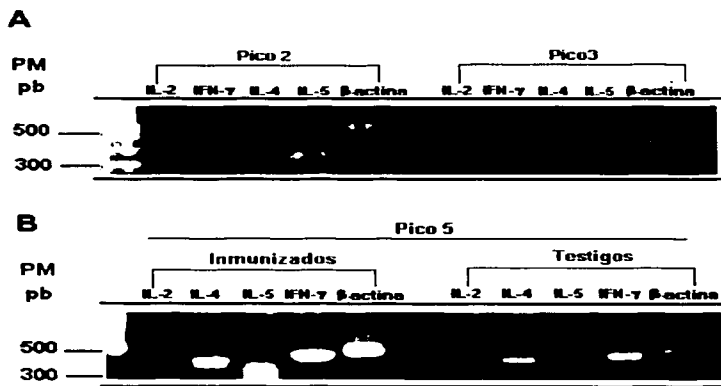


Figura 12. Expresión de RNAm de citocinas inducidos por los picos 2, 3 y 5. Células de bazo de ratones inmunizados con antígenos totales de metacéstodos o de ratones testigos fueron estimuladas con **A:** Picos 2 y 3 (células de animales inmunizados) y **B:** Pico 5 (células de animales inmunizados y testigos). Los productos de amplificación que se obtuvieron fueron los siguientes: IL-5 304 pb, IL-4 399 pb, IFN-γ 460 pb.

Con estos resultados, se decidió determinar su actividad *in vivo* para lo cual se inmunizaron 4 ratones con 100 µg de proteína del Pico 2 en 0.1 ml de solución salina por vía subcutánea y 10 días después se les dio un refuerzo en las mismas condiciones. Se determinó la eosinofilia en sangre periférica a los días 1, 3 y 5 después de la segunda inmunización. Se incluyó como testigo positivo animales inmunizados con antígenos del metacéstodo. Los resultados mostraron que el pico 2 indujo eosinofilia significativa en sangre periférica ($P=0.02$) con un valor máximo al tercer día de 650 eosinófilos/mm³ (Fig. 13) al igual que los antígenos de metacéstodos ($P=0.004$).

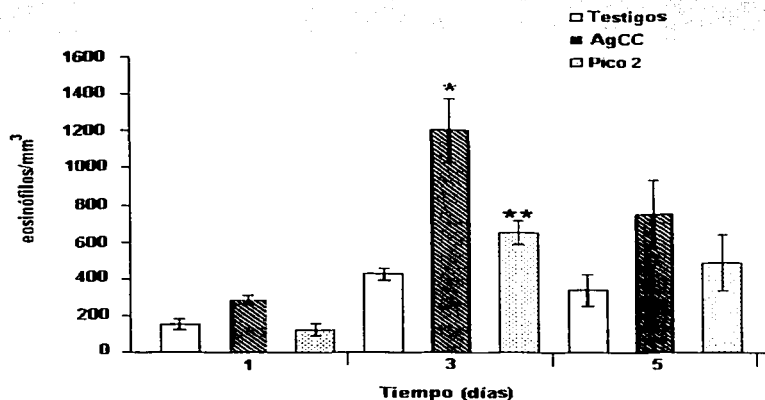


Figura 13. Eosinofilia de sangre periférica de ratones inmunizados con Pico 2. Se determinó la eosinofilia en sangre de periférica de animales testigos, inmunizados con antígenos de cisticercos y con el pico 2. * $P=0.004$; ** $P=0.02$.

DISCUSIÓN

La inmunidad contra las infecciones parasitarias por helmintos se caracteriza por eosinofilia e IgE elevadas, respuestas controladas por linfocitos cooperadores (CD4⁺). Las respuestas de las subpoblaciones Th1 y Th2 de células CD4⁺ han sido bastante bien caracterizadas en modelos murinos de infecciones causadas por *S. mansoni*, *A. costaricensis*, y *T. crassiceps* (Grzych y col., 1991; Sugaya y col., 1997; Terrazas y col., 1998; Toenjes y col., 1999), sin embargo no hay estudios realizados en cisticercosis por *T. solium*.

Se ha reportado que los antígenos usados en este trabajo, indujeron protección en cerdos contra la infección con huevos de *T. solium* y en cerdos naturalmente parasitados (Molinari y col., 1983a, 1983b). En ratones, estos antígenos indujeron un proceso granulomatoso alrededor de metacéstodos implantados subcutáneamente que destruyen al parásito (Tato y col., 1996, Molinari y col., 1998). En todos estos trabajos, se han encontrado eosinófilos (respuesta Th2) en las reacciones inflamatorias que rodean a la larva y estas células se han relacionado con el daño al parásito.

Aquí se describe el perfil de RNA mensajeros de citocinas producido por esplenocitos de ratones inmunizados estimulados con antígenos de metacéstodo de *T. solium* y su correlación con las respuestas inmunes inducidas *in vivo*. Los resultados mostraron que los esplenocitos de ratones inmunizados estimulados con antígenos del metacéstodo producen RNAm de IL-5 e IL-4 lo cual correlaciona bien con la eosinofilia y la síntesis de anticuerpos específicos IgG1 e IgE (respuestas Th2). Mas aún, los anticuerpos IgG2b se produjeron en forma significativa ($P < 0.0007$) y el cambio hacia este isotipo está determinado por TGF- β (Stavnezer, 1996), otra citocina producida por Th2. Nuestros resultados mostraron que el RNAm de IFN- γ se indujo por los antígenos de *T. solium* lo que correlaciona con la producción significativa de IgG3 encontrada (Respuesta Th1) ($P < 0.012$) (Stavnezer, 1996).

En nuestros experimentos, el RNAm de IL-2 no fue detectado en los esplenocitos estimulados con los antígenos del metacéstono, sin embargo se observó proliferación, la cual puede ser debida a otros factores de crecimiento como IL-4 (Janeway y col., 1999). Este resultado es apoyado por la baja producción de IL-2 en respuesta a antígenos de helmintos que ha sido reportada (Soboslay y col., 1999; Pit y col., 2001). Sin embargo, sería interesante corroborar este resultado realizando experimentos para determinar citocinas intracelulares con citometría de flujo.

La regulación cruzada por citocinas se ha propuesto como el mecanismo por el cual Th1 y Th2 permanecen en balance y alteran su función mutuamente (Gajewski y Fitch, 1988; Peleman y col., 1989; Martínez y col., 1990). En cisticercosis experimental, se ha descrito que las respuestas inmunes que controlan el crecimiento de las larvas son Th1 (Bojalil y col., 1993; Terrazas y col., 1998). Por otro lado, la susceptibilidad a la infección se ha asociado con una respuesta de tipo Th2 (Larralde y col., 1995; Villa y Khun, 1996; Terrazas y col., 1998). Se ha reportado que las células involucradas en las reacciones granulomatosas que rodean a la larva de *T. crassiceps* expresan tempranamente IFN- γ y se ha sugerido que esta citocina juega un papel en la eliminación del parásito (Robinson y col., 1997). Estos investigadores también encontraron que IL-4 se expresaba hasta que el parásito estaba completamente destruido sugiriendo que IL-4 modula los estados tardíos de la respuesta. Aunque muchas investigaciones se han enfocado en el efecto inhibitorio de algunas citocinas producidas por estas poblaciones de células T cooperadoras, se ha observado que en algunas infecciones parasitarias coexisten respuestas mixtas. Por ejemplo, la estimulación de células de exudado peritoneal de ratones BALB/c infectados con *T. crassiceps* con antígenos del parásito, mostraron un incremento en la producción de IFN γ e IL-4 durante la infección y a nivel sistémico, se ha observado también una respuesta mixta Th1/Th2 con una producción incrementada en suero de IFN- γ e IL-4, en etapas tardías de la infección (Toenjes y col.,

1999), lo que sugiere que no existe una polarización de la respuesta inmune hacia un solo tipo de respuesta. En forma similar, nuestros resultados mostraron que los esplenocitos de ratones inmunizados y estimulados con antígenos totales del metacéstono de *T. solium* expresaron los RNAs mensajeros para IFN- γ (respuesta Th1), IL-4 e IL-5 (respuesta Th2). Sin embargo, en estos experimentos, los efectos biológicos dirigidos por IL-4 predominaron *in vivo* ya que se produjeron anticuerpos específicos IgE e IgG1 en mayor cantidad en comparación con IgG3.

Por otro lado, en neurocisticercosis humana (NCC) se ha reportado que IL-5 e IL-10 (respuestas Th2) son las principales citocinas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad activa (Rodríguez y col., 2000). Mientras que, células mononucleares de sangre periférica de pacientes con NCC mostraron un perfil de citocinas Th1 cuando se estimularon con antígenos del metacéstono (Grewal y col., 2000). Finalmente, se ha mostrado que en granulomas de cerebro de pacientes con NCC, prevalecieron citocinas Th1 (IFN- γ e IL-18) aunque citocinas Th2 también se encontraron presentes (IL-4, IL-10 e IL-13) (Restrepo col., 2001).

En estos experimentos no se determinó la presencia de RNAm para IL-10 a pesar de que su presencia se ha documentado en granulomas alrededor de los metacéstonos en ratones infectados con *T. crassiceps* así como en pacientes con cisticercosis por *T. solium* (Robinson y col., 1997; Terrazas y col., 1998; Restrepo y col., 2001). Aunque su papel no ha sido dilucidado, se ha reportado que carbohidratos del metacéstono de *T. crassiceps* inducen la producción de IL-6 e IL-10 en ausencia de IL-4 e IL-5 (Dissanayake y col., 2002). Por otro lado, se ha descrito que IL-10 inhibe la síntesis de IgE inducida por IL-4 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes alérgicos (Punnonen y col., 1993; Jeannin y col., 1998) e induce apoptosis en los eosinófilos (Takanashi y col., 1994). Ya que nuestros resultados mostraron que la inmunización con antígenos indujo respuestas controladas por IL-

4 e IL-5, era poco probable que indujeran la producción de IL-10, aunque hubiera sido conveniente determinar la presencia de esta citocina en los ratones inmunizados.

Trabajos previos en cerdos inmunizados han mostrado que los antígenos de metacéstodos de *T. solium* inducen eosinofilia en cerdos naturalmente parasitados (Molinari y col., 1983b) y que estas células se relacionan con la destrucción de los parásitos (Willms y Merchant, 1980; Molinari y col., 1986). Los eosinófilos se han relacionado con la protección en otras infecciones por helmintos donde se ha documentado la participación de los gránulos de los eosinófilos en la destrucción del parásito (Behm y Ovington, 2000; Vallance y col., 2000; Herbert y col., 2000; Sugaya y col., 2002). Nuestros resultados mostraron que los antígenos de metacéstodos también producen eosinofilia en ratones ya que después de la segunda inmunización, se observó un incremento significativo de los valores de eosinófilos en sangre periférica en comparación con los valores de eosinófilos en sangre de animales normales. Se ha descrito que la IL-5 incrementa el número de eosinófilos en la médula ósea y promueve su maduración así como la eosinofilia en sangre periférica en presencia de alérgenos o antígenos de parásitos (Dombrowics y Capron, 2001). Aunque los antígenos totales del metacéstodo no indujeron conspicuamente la expresión del mensajero para IL-5 *ex vivo*, encontramos una respuesta regulada por IL-5 que fue la eosinofilia en sangre periférica. Por otro lado, los picos 2, 3 y 5 obtenidos de la cromatografía contienen alguna o algunas proteínas que inducen la producción del mensajero para IL-5 en forma importante, de hecho el pico 2 indujo *in vivo* eosinofilia en sangre periférica de ratones BALB/c mostrando que algunos antígenos en este complejo inmunogénico preferencialmente inducen la expresión de mensajeros relacionados con la protección. Por otro lado, el pico 5 indujo la producción de IL-4, IFN- γ en animales inmunizados y en testigos, lo cual sugiere que alguna o algunas de las proteínas que lo constituyen pueden estar actuando como un mitógeno. Sin embargo, la IL-5 solo se indujo en los animales inmunizados, sugiriendo que probablemente la proteína de 60

kDa participe en la inducción de esta citocina. Debido a que se ha reportado la presencia de eosinófilos en los granulomas de cerdos cisticercosos (Molinari y col., 1983a; 1983b) y el incremento de IL-5 y eotaxina en suero de pacientes (Evans y col., 1998) sería interesante determinar si los antígenos de metacéstodos inducen quimiocinas como eotaxina y RANTES para atraer a los eosinófilos a los tejidos.

También se encontró que los antígenos totales de metacéstodos de *T. solium* indujeron la producción de anticuerpos específicos IgG1 en los ratones aunque también fueron detectados IgE e IgG2b. Estas respuestas de anticuerpos junto con la eosinofilia en sangre periférica son compatibles con una respuesta inmune de tipo Th2. Resultados similares han sido reportados en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* ya que, cantidades incrementadas de IgG1 e IgG2b específicas fueron detectadas conforme la infección progresó, especialmente IgG1. Anticuerpos IgG2a específicos (respuesta Th1) se incrementaron tempranamente en la infección pero posteriormente fueron regulados negativamente en forma importante (Terrazas y col., 1998).

Como parte de una caracterización preliminar de los antígenos de metacéstodos, se buscó la presencia del antígeno B o paramiosina que ha sido descrito en la literatura como un antígeno inmunodominante (Flisser y col., 1980; Lacleite y col., 1992). Se encontró que los antígenos de metacéstodos contienen 2 proteínas (95 y 85 kDa) que son reconocidas por el suero anti-paramiosina en los ensayos de inmunoelectrotransferencia, la primera tiene el peso molecular reportado y la segunda (mas pequeña) pudiera corresponder a un producto de degradación como se ha reportado previamente (Lacleite y col., 1990). También se encontró que los antígenos de metacéstodos estaban contaminados con proteínas del huésped intermediario ya que los anticuerpos anti-albúmina y anti-IgG de cerdo reconocieron algunas proteína. Finalmente, algunos de los antígenos de metacéstodos obtenidos por el método

utilizado en este trabajo son glicoproteínas como los descritos en la literatura y usadas en el diagnóstico de neurocisticercosis (Tsang y col., 1989).

Nuestros resultados confirman que estos antígenos protectores de *T. solium* inducen respuestas mixtas Th1/Th2 *ex vivo* y que *in vivo* predominan las respuestas controladas por Th2, las cuales son protectoras. Contrariamente, los resultados de la investigación con *T. crassiceps* han sugerido que las respuestas protectoras son Th1 (Terrazas y col., 1998, 1999).

Finalmente, los resultados mostraron que los antígenos de metacéstodos de *T. solium* indujeron una respuesta mixta Th1/Th2 en ratones (IFN- γ , IL-4 e IL-5) aunque las respuestas inmunes controladas por Th2 predominaron *in vivo* (eosinofilia, y anticuerpos IgE, IgG1 e IgG2b). Por lo tanto, el modelo murino usando antígenos de metacéstodos de *T. solium* que se reporta en este trabajo puede ser útil en un mejor entendimiento de las respuestas inmunes protectoras contra la cisticercosis.

Además de identificar proteínas que están relacionadas con la protección en cisticercosis, el reconocer proteínas que induzcan especialmente un tipo de respuesta inmune, en este caso una respuesta Th2, puede ser útil para dirigir la respuesta inmune de otros antígenos no relacionados hacia un tipo especial de respuesta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

1. El ratón parece ser un buen modelo para estudiar las respuestas inmunes contra antígenos de metacéstodos de *T. solium* ya que reproducen respuestas que se observan en el cerdo y en humano.
2. Los antígenos de metacéstodos inducen respuestas de citocinas mixtas Th1/Th2 *in vitro* que correlacionan con las respuestas observadas *in vivo*.
3. En las respuestas inmunes observadas *in vivo* predominan las que están controladas por Th2.
4. Los antígenos de metacéstodos inducen la síntesis de anticuerpos de los isotipos IgE e IgG1 (respuestas controladas por Th2).
5. Se determinó que alguna de las proteínas de los Picos 2, 3 y 5 (probablemente 66, 56 y 35 Kda) inducen la síntesis de mensajeros para IL-5 y alguna de las contenidas en el Pico 2 inducen eosinofilia *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allan JC, Soto de Alfaro H, Torres-Alvarez R (1996) Epidemiology of intestinal taeniasis in four rural Guatemalan communities. *Ann Trop Med Parasitol* 90:157-165
2. Aluja A (1982) Frequency of porcine cysticercosis in México. En: *Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds) Academic Press, New York
3. Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette JP, Larralde C, Madrazo I, Velásquez V, Willms K (1987) *Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por Taenia solium*. Fondo de Cultura Económica, México
4. Aluja AS, Vargas G (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 28:65-77
5. Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP (1994) Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch Med Res* 25:325-330
6. Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P (1998) A *Taenia solium* metacystode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84:117-122
7. Banchereau J, Rousset F (1991) Functions of interleukin-4 on human B-lymphocytes. *Immunol Res* 10:423-427
8. Behm CA, Ovington KS (2000) The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 16:202-209
9. Bhaskar S, Dutt S, Mukherjee R (2000) A simple method of electroelution of individual protein bands from SDS polyacrylamide gels for direct study in cellular assays. *J Immunoassay* 21:355-375
10. Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C (1993) Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 79:384-389.
11. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
12. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramento JA (2000a) Total IgE detection in paired cerebrospinal fluid and serum sample from patients with neurocysticercosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42:67-70

13. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramento JA (2000b) Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. *Arq Neuropsiquiatr* 58:18-24
14. Butterworth AE, Remolt HG, Houba V, David JR, Franks D, David TH, Sturrock RF (1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni* mediated by IgG, and inhibition by antigen-antibody complexes. *J Immunol* 118:2230-2236
15. Butterworth AE (1984) Cell-mediated damage to helminths. En: *Advances in Parasitology*. Baker Jr, Muller R (eds). Academic Press, London
16. Capron A, Dessaint JP, Haque A, Capron M. (1982) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against parasites. *Prog Allergy* 31:234
17. Capron M, Capron A (1992) Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 suppl 4:167-70
18. Carpio A, Plascencia M, Santillán F, Escobar A (1994) A proposal for classification of neurocysticercosis. *Can J Neurol Sci* 21:43-47
19. Chandrashekar R, Rao UR, Subrahmanyam D (1985) Serum dependent cell-mediated immune reactions to *Brugia pahangi* infective larvae. *Parasite Immunol* 7:633-641
20. Cho SY, Kim SI, Kang SY, Park AJ (1988) Intracranial synthesis of specific IgG antibody in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. *Korean J Parasitol* 26:15-26
21. Chomeczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
22. Cisneros V, Dehesa R, Montes J (1982) Dosificación de la IgE total y específica en cisticercosis humana. *Alergia* 29:77-82
23. Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ (1989) Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. *Blood* 73:1504-1512
24. Cook GA, Metwali A, Blum A, Mathew R, Weinstock JV (1993) Lymphokine expression in granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Cell Immunol* 152:49-58
25. Corona T, Pascoe D, González-Barranco D, Abad P, Landa L, Estanol B (1986) Anticysticercus antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 49:1044-1049

26. Correa D, Tovar A, Espinoza B, Plancarte A, Flisser A (1989) Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parasito. En: Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. Flisser A, Malagón F (eds) Limusa-Noriega, México
27. Cruz ME, Schantz PM, Cruz I (1998) Epilepsy and neurocysticercosis in an Andean community. *Int J Epidemiology* 28: 799-803
28. Del Brutto OH, Sotelo J (1988) Neurocysticercosis: An Update. *Rev Inf Dis* 10:1075-1087
29. Del Brutto OH, Sotelo J, Roman GC (1997) Neurocysticercosis: A Clinical Handbook. Lisse, Swets & Zeitliger
30. Díaz JF, Verástegui M, Guílman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Gallo C, García HH, Torres P, Montenegro T, Miranda E (1992) Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 46:610-613
31. Díaz-Camacho S, Candil-Ruiz A, Uribe-Beltrán M, Willms K (1990) Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 84:563-566
32. Díaz-Camacho S, Candil-Ruiz A, Suate-Peraza V, Zazueta-Ramos MN, Félix-Medina M, Lozano R, Willms K (1991) Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with Praziquantel in a rural village of Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 45:522-531
33. Dissanayake S, Khan N, Shahin A, Wijesinghe S, Lukin M (2002) Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by *Taenia crassiceps* metacestode carbohydrates. *Immunology* 107:411-419
34. Dixon HBF, Lipscomb FM (1961) Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. *Prion Council Med Res Special Rep Ser.* 229:158
35. Dombrowicz D, Quantannens B, Papin JP, Capron A, Capron M (2000) Expression of a functional Fc epsilon R1 on rat eosinophils and macrophages. *J Immunol* 165:1266-1271
36. Dombrowicz, Capron M (2001) Eosinophils, allergy and parasites. *Curr Opin Immunol* 13:716-720
37. Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, Capron A, Pierce RJ, Sturrock RF (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection *Eur J Immunol* 22:1483-1494

38. Dunne DW, Richardson BA, Jones FM, Clarck M, Thorne KJ, Butterworth AE (1993) The use of mouse/human chimaeric antibodies to investigate the roles of different antibody isotypes, including IgA2, in the killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils. *Parasite Immunol* 15:181-185
39. Escobar A (1983) The pathology of Neurocysticercosis. En: Cisticercosis of the Central Nervous System. Palacios E, Rodríguez-Carbajal J, Taveras JM (eds). Charles C Thomas, Springfield, IL
40. Escobedo F, García-Ramos G, Sotelo J (1983) Parasitic disorders and epilepsy. *Prog Clin Biol Res* 124:227-233
41. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval M, Plancarte A, Flisser (1986) Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 24:536-541
42. Estanol B, Juárez J, Irigoyen MC, González-Barranco D, Corona T (1989) Humoral Immune response in patients with cerebral parenchymal cysticercosis treated with praziquantel. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 52:254-257
43. Evans CAW, García HH, Hartnell A, Gilman RH, Jose PJ, Martínez M, Remick DG, Williams TJ, Friedland JS (1998) Elevated concentrations of Eotaxin and Interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun* 66: 4522-4525
44. Fattah DI, Maizels RM, Mc Laren DJ, Spry CJ (1986) *Toxocara canis*: interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Exp Parasitol* 61:421-431
45. Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Carrillo-Meza RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G (2003) High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 22:139-145.
46. Flisser A, Woodhouse E, Larralde E (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin Exp Immunol* 39:27-37
47. Flisser A (1988) Neurocysticercosis in México. *Parasitol Today* 4:131-137
48. Flisser A (1994) Taeniosis and cisticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol* 4:77-116
49. Flisser A (1998) Larval Cestodes. En: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Arnold. Great Britain
50. Gajewski TF, Fitch FW (1988) Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 40:4245-4252

51. Gansmuller A, Aneunis A, Venturiello SM, Bruschi F, Binaghi RA (1987) Antibody dependent in vitro cytotoxicity of newborn *Trichinella spiralis* larvae: nature of cells involved. *Parasite Immunol* 9:281-292
52. García HH, Gilman RH, Gonzales AE (1996) Epidemiología de la cisticercosis en el Perú. En: *Taeniosis/Cisticercosis por T. solium*. García HH, Martínez SM (eds). Universo SA, Lima
53. García HH, Araos R, Gilman RH (1999) Increased prevalence of cysticercosis and taeniasis among profesional fried pork vendors and the general population of a village in the Peruvian highlands. *Am J Trop Med Hyg* 59:902-905
54. García HH, Martínez SM (1999) *Taenia solium* Taeniosis/Cisticercosis. Universo. Lima, Perú
55. García-Noval J, Moreno E, De Mata F (2001) An epidemiological study of epilepsy and epileptic seizures in two rural Guatemalan communities. *Ann Trop Med Parasitol* 95: 167-175
56. Geffner JR (1998) Antibody-dependent cellular cytotoxicity. En: *Encyclopedia of Immunology Vol 1*. Delves PJ, Roitt IM (eds). Academic Press, London
57. Gorodezky C, Diaz ML, Escobar A, Flisser A (1987) IgE concentration in sera of patients with neurocysticercosis. *Arch Invest Med (Mex)* 18:225-227
58. Greene BM, Taylor HR, Aikawa M (1981) Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *J Immunol* 127:1611-1618
59. Grewal JS, Kaur S, Bhatti G, Sawhney IM, Ganguly NJ, Mahajan RC, Malla N (2000) Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 86:500-503
60. Grezel D, Capron M, Grzygc JM, Fontaine J, Lecocq JP, Capron A (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur J Immunol* 23:454-460
61. Grisolia JS, Wiederholt (1982) CNS cysticercosis. *Arch Neurol* 39: 540-44
62. Grogl M, Estrada JJ, MacDonald G, Khun RE (1985) Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis. *J Parasitol* 71:433-442
63. Grzych J, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine shistosomiasis. *J Immunol* 146:1322-1327
64. Gutierrez I (1990) Cysticercosis, and Sparganosis. En: *Diagnostic Pathology of Parasitic infection with clinical correlation*. Lea& Febiger, Philadelphia

65. Hagan P, Wilkins HA, Blumenthal UJ, Hayes RJ, Greenwood BM (1985) Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man Parasite Immun 7:625-632
66. Harrison GBL, Heath DD, Dempster RP, Gaucci C, Newton SE, Cameron WG, Lawrence SB, Lightowlers MW, Rickard MD (1996) Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. Int J Parasitol 26:195-204
67. Hayunga EG, Summer MP, Letonja T (1989) Evidence for selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniaeformis*. J Parasitol 75:638-642
68. Herbert IV, Oberg C (1974) Cysticercosis in pigs due to infection with *Taenia solium* Linnaeus 1758. En: Parasitic Zoonosis, Soulsby E JL (ed). Academic Press. New York
69. Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D (2000) Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. J Immunol 165:4544-4551
70. Hernández-Jáuregui PA, Marquez-Monter H, Sastre-Ortiz S (1983) Cysticercosis of the central nervous system in hogs. Am J Vet Res 34:451-453
71. Ito A, Bogh HO, Lightowlers MW, Mitchel GF, Takami T, Kamiya M, Onitake K, Rickard MD (1991) Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody responses. Mol Biochem Parasitol 44:43-52
72. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD (1999) Immunobiology. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, London, UK/New York, USA.
73. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY (1998) IgE verus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. J Immunol 160:3555-3561
74. Johnson KS, Harrison GBL, Lightowlers MW, O'Hoy KL, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JC, Heath DD, Rickard MD (1989) Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature 338:585-587
75. Kalinna B, McManus (1993) An IgG Fc gamma-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. Parasitology 106:289-296
76. Katamura K, Yamauchi T, Fudui T, Ohshima Y, Mayumi M, Furushi K (1995) Prostalandin E2 at priming of naïve CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. J Immunol 155:4604-4612
77. Kazura JW, Aikawa M (1980) Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse eosinophil-mediated destruction of the newborn larvae in vitro. J Immunol 124:355-361

78. Kramer LD, Locke GE, Byrd SE, Daryabagi J (1989) Cerebral cysticercosis: Documentation of natural history with CT. *Radiology* 171:459-462
79. Kumar D, Gaur SNS, Pathak ML (1987) Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and second peaks of *cysticercus cellulosae* scolex antigen. *Indian J Anim Sci* 57:932-935
80. Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K (1982) Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds). Academic Press. New York, USA
81. Laclette JP, Alagon A, Willms K, Torre-Blanco A (1990) Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 76:273-275.
82. Laclette JP, Shoemaker C, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A (1992) Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 148:124-128
83. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
84. Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB (1993) cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol* 60:343-347
85. Larralde C, Morales J, Terrazas LI, Govezensky T, Romano M (1995) Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 52:575-580
86. Leid RW, McConnell LA (1983) PGE₂ generation and release by the larval stage of the cestode, *Taenia taeniaeformis*. *Prostaglandins Leukotrienes. Med* 11:317-323
87. Leid RW, Grant RF, Suquet CM (1987) Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol* 17:1349-1353
88. Letonja T, Hammerberg B (1983) Third component of complement, immunoglobulin deposition, and leukocyte attachment related to the surface sulfate of larval *Taenia taeniaeformis*. *J Parasitol* 69:637-644
89. Lightowlers MW (1996) Vaccination against cestode parasite. *Int Parasitol* 26:819-824
90. Lightowlers MW (1999) Erradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int J Parasitol* 29:811-817
91. Mahajan RC (1982) Geographical distribution of human cysticercosis. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds) Acad Press, New York

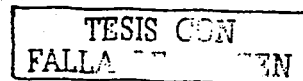
92. Maizels RM, Bundy DAP, Selkik ME, Smith DF, Anderson RM (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365:797-805
93. Mandujano A, Vela M, Alcantara P, Correa D (1990) Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium* cysticerci. Abstracts VII International Congress Parasitology. *Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie* 8:578
94. Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E (1996) Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 82:250-254
95. Marquez H (1971) Cisticercosis. En: Pathology of Protozoal and Helminths diseases. Marcial R (ed) Williams & Wilkins, Baltimore
96. Martínez OM, Gibbons RS, Garavoy MR, Aronson FR (1990) IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2 dependent proliferation of human T cells. *J Immunol* 144:2211-2215
97. Medina MT, Rosas E, Rubio-Donnadieu F, Sotelo J (1990) Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Arch Intern Med* 150:325-327
98. Medina-Escutia E, Morales-Lopez Z, Proano JV, Vazquez J, Bermúdez V, Ortiz-Navarrete Vianney, Madrid-Marina V, Lacleste JP, Correa D (2001) Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: lack of immunosuppression. *J Parasitol* 87:587-590
99. Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A and Willms K. (1998) *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol* 84:681-685
100. Metha K, Subrahmanyam D, Hopper K, Nelson Ds, Rao CK (1981) IgG-dependent human eosinophil-mediated adhesion and cytotoxicity of *Litomosoides carinni* larvae. *Indian J Med Res* 74:226-230
101. Mitchell GF, Goding JW, Rickard MD (1977) Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyroid mice to *Taenia taeniaeformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Aust J Exp Bio Med Sci* 55:165-186
102. Mitchell GF (1982) Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host-protective immunity and immune evasion. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larraalde C, Ridaura C, Beltran F (eds). Academic Press, New York
103. Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P, Retana A (1983a) *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. *Exp Parasitol* 55:340-357

104. Molinari JL, Meza R, Tato P (1983b) *Taenia solium*: Cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. Exp Parasitol 56:327-338
105. Molinari JL, Tato P, Sepulveda J, Carabez A (1986) Ultrastructure evidence for damage of *Taenia solium* cysticerci from naturally parasitized, immunized hogs. Rev Lat amer Microbiol 28:47-61
106. Molinari JL, Tato P, Valles Y (1987) inmunodepresión de linfocitos T en cerdos modulado por *Cysticercus cellulosae*. Rev Lat amer Microbiol 29:293-300
107. Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, León-Cazares JM (1989) Modulation effects on mice response to a *Salmonella typhimurium* infection by a *Taenia solium* cysticerci product of low molecular weight. Rev Lat amer Microbiol 31: 327-333
108. Molinari JL, Tato P, Reynosa OA, Cazares JML (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. Ann Trop Med Parasitol 84:205-208.
109. Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepúlveda J, Palet A (1993a) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. Am J Trop Med Hyg 49:502-512
110. Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, White AC Jr. (1993b) Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* onchospheres. J Parasitol 79:124-127
111. Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S (1997) Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. Vet Parasitol 69:55-63
112. Molinari JL, Tato P., Rodríguez D., Solano S., Rubio M. and Sepúlveda J. (1998) Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide. A scanning electron-microscopy study. Parasitol Res 84:173-180.
113. Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P (2000) *Taenia solium*: A cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. Exp Parasitol 94:133-142
114. Mosmann TR, Coffman RL (1989) Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Ann Rev Immunol 7:145-173
115. Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tabares CA (1995) Effective immune protection of pigs against cysticercosis. Vet Immunol Immunopathol 45:127-137

116. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki J, Abe M, Ham DA Jr (1999) Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* eggs antigens. *J Immunol* 163:6712-6717
117. Ostrosky-Zeicher LE, García-Mendoza E, Ríos C, Sotelo J (1996) Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch Med Res* 27:513-517
118. Pathak KML, Gaur SNS (1990) Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol* 34:353-356
119. Pearce GJ, Sher A (1989) Immunity to helminths. *Curr Opin Immunol* 2:375-379.
120. Peleman R, Wu J, Fargeas C, Delespesse G (1989) Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med* 170:1751-1756
121. Pene J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J, de Vries JE (1988) IgE production by normal lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6880-6884
122. Perez Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos Nelly, Aluja A (2002) *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res* 88:150-152
123. Pit DSS, Polderman AM, Baeta S, Schulz-Key H, Soboslay PT (2001) Parasite-specific antibody and cellular immune responses in humans infected with *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum*. *Parasitol Res* 87:722-729
124. Plancarte A, Flisser A, Gauci ChG, Lightowlers MW (1999) Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 29:643-647
125. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Wall Malefyt R, de Vries JE (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3730-3734
126. Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Cancino F (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds), Academic Press. New York
127. Raphael SS (1983) Lynch's medical laboratory technology. WB Sanders, Philadelphia

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

128. Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM (1998) Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunology* 89:64-72.
129. Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM (2001) Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 69:4554-4560
130. Richards FO Jr, Schantz PM, Ruiz-Tiben E, Solvillo FJ (1985) Cysticercosis in Los Angeles county. *JAMA* 254:3444-3448
131. Rickard MD, Williams JF (1982) Hydatidosis/cysticercosis: Immune mechanisms and immunization against infection. *Adv Parasitol* 21:229-296
132. Ridaura Sanz C (1987) Host response in childhood neurocysticercosis: some pathological aspects. *Child Nerv Syst* 3:206-207
133. Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White AC (1997) Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 65:2925-2931
134. Rodrigues V, de-Mello FA, Magalhaes EP, Ribeiro SBF, Marquez JO (2000) Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res* 33:1059-1063
135. Rosas N, Sotelo J, Nieto D (1986) ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch Neurol* 43:353-356
136. Sakai H, Sone M, Castro DM (1998) Seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs in a rural community of Honduras. *Vet Parasitol* 78:233-238
137. Sánchez AL, Gomez O, Allebeck P (1997) Epidemiological study of *Taenia solium* infections in a rural village in Honduras. *Ann Trop Med Parasitol* 91:163-171
138. Sánchez AL, Lindback J, Schantz PM (1999) A population-based case-control study on *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Ann Trop Med Parasitol* 93:247-258
139. Sanderson CJ (1990) The biological role of interleukin 5. *Int J Cell Cloning* 8:147-153
140. Sarti GE, Gutierrez Espina I (1986) La taeniasis y cisticercosis en México. *Salud Publica, Mex* 28:556-563
141. Sarti E, Schantz PM, Aguilera J, López SA (1992a) Epidemiological observations on porcine cysticercosis in a rural community of Michoacan State, Mexico. *Vet Parasitol* 41:195-201
142. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Lopez AS, Roberts J, Flisser A (1992b) Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and



- cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 46:677-685
143. Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez OI, Aguilera J, Roberts J, Flisser A (1994) Epidemiologic investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 88:49-52.
 144. Schantz PM, Sarti GE (1989) Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden* 57:153-163
 145. Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM (1992) Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City. *N Engl J Med* 327:692-695
 146. Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A (1994) Community-Based Epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin Inf Dis* 18:879-885
 147. Schenone H, Villaroel F, Rojas A, Ramirez R (1982) Epidemiology of human cisticercosis in Latin American. En *Cisticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds) Acad Press, New York
 148. Sealey M, Ramos C, Willms K, Ortiz-Ortiz L (1981) *Taenia solium*: Mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes. *Parasite Immunol* 3:299-307
 149. Shandera WX, White AC, Chen JC, Diaz P, Armstrong R (1994) Neurocysticercosis in Houston, Texas. *Medicine* 73:37-52
 150. Sher A, Coffman RL (1992) Regulation of immunity to parasite by T cells and T-cell derived cytokines. *Ann Rev Immunol* 10:385-409
 151. Short JA, Heiner DC, Hsiao RL, Andersen FL (1991) Immunoglobulin E and G4 antibodies in cysticercosis. *J Clin Microbiol* 28:1635-1639
 152. Sim BK, Kwa BH, Mak JW (1982) Immune responses in human *Brugia malayi* infections: serum dependent cell-mediated destruction of infective larvae in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76:362-370
 153. Soboslay PT, Luder CG, Riesch S, Geiger SM, Banla M, Batchassi E, Stadler A, Schultz-Key H (1999) Regulatory effects of Th1-type (IFN-gamma, IL-12) and Th2-type cytokines (IL-10, IL-13) on parasite-specific cellular responsiveness in *Onchocerca volvulus* infected humans and exposes endemic controls. *Immunology* 97:219-225
 154. Stavnezer J (1996) Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 8:199-205

155. Sturrock RF, Kimani R, Cottle BJ, Butterworth AE, Seitz HM, Siogok TK (1983) Observations on possible immunity to reinfection among kenyan school children after treatment for *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hyg 77:363-371
156. Sugaya H, Aoki M, Abe T, Ishida K, Yoshimura K (1997) Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Parasitol Res 83:10-15
157. Sugaya H, Graeff-Teixeira C, Ishida K, Matsuda S, Katahira K, Yoshimura K (2002) Interleukin-5 transgenic mice show augmented resistance to *Angiostrongylus costaricensis* infection. Parasitol Res 88:350-355
158. Suquet C, Green-Edwards C, Leid RW (1984) Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacystode proteinase inhibitor. Int J Parasitol 14:165-172
159. Takanashi S, Nonaka R, Wing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M (1994) Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. J Exp Med 180:711-715
160. Tato P, Valles Y, Rolón R, Molinari JL (1987) Efecto de la inmunización en cerdos inmunodeprimidos, naturalmente parasitados con *Cysticercus cellulosae*. Rev Lat amer Microbiol 29:67-71
161. Tato P, Castro AM, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL (1995) Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacystode. Parasitol Res 81:181-187
162. Tato P, White AC, Willms K, Rodríguez D, Solano S, Sepulveda J, Molinari JL (1996) Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T solium* metacystodes. Parasitol Res 82:590-597
163. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol 84:74-81
164. Terrazas LI, Bojalil R, Rodríguez-Sosa M, Govezenski T, Larralde C (1999) *Taenia crassiceps* cysticercosis: A role for prostaglandin E2 in susceptibility. Parasitol Res 85:1025-1031
165. Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE (1999) The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. Parasitology 118:623-633
166. Toenjes SA, Kuhn RE (2003) The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. Parasitol Res 89:407-413
167. Towbin HT, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76:4350

168. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*) J Infect Dis 159:50-59
169. Tsang VCW, Wilson M (1995) *Taenia solium*: an under recognized but serious public health problem. Parasitol Today 11:124-126
170. Vallance BA, Matthaei KI, Sanovic S, Young IG, Collins SM (2000) Interleukin-5 deficient mice exhibit impaired host defense against challenge *Trichinella spiralis* infections. Parasite Immunol 22:487-492
171. Velasco-Suarez M (1983) Cysticercosis: Personal impact and socioeconomic significance. En: Cysticercosis of the Central Nervous System. Palacios E, Rodriguez-Carbajal J, Taveras JM (eds): Charles C Thomas, Springfield, IL,
172. Villa OF, Kuhn RE (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 122:561-570
173. Villagran UJ, Rabiela JE (1989) Cisticercosis humana. Estudio clinico y patológico de 481 casos de autopsia. Patología 26:149-156
174. White AC, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA (1992) Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacystode proteases. J Parasitol 78:281-287
175. White AC Jr (1997a) Neurocysticercosis: A common cause of neurologic disease worldwide. Clin Infect Dis 24:101-113
176. White AC Jr, Robinson P, Kuhn R (1997b) *Taenia solium* Cysticercosis: Host-Parasite interactions and the Immune Response. Chem Immunol 66:209-30
177. Williams JF (1982) Cestode infections. En Immunology of parasitic infections. Cohen S, Warren KS (eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford
178. Willms K, Merchant MT (1980) The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle:ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol 2:261-275
179. Yoshino K (1933a) Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium* Part II. On the migratory course of the onchosphera of *Taenia solium* within the intermediate host. J Med Ass Formosa 32:155-158
180. Yoshino K (1933b) Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium* Part III. On the development of *Cysticercus cellulosae* within the definitive intermediate host. J Med Ass Formosa 32:166-169
181. Zhacarius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. Anal Biochem 30:148-152

182. Zini D, Farell VJR, Wadee AA (1990) The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 53:656-661

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APENDICE

TESIS CON
FALLA EN EL EXAMEN

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Parasitology Research
Founded as Zeitschrift für Parasitenkunde
© Springer-Verlag 2003
10.1007/s00436-003-0855-0

Original Paper

***Taenia solium* metacestode antigens which are protective for pigs induce Th1/Th2 mixed responses in mice**

Isabel Cortes¹, Jose Luis Molinari², Sandra Solano¹, Lilian Hernandez-Mendoza³,
Antonio Ramirez¹ and Patricia Tato¹ 

- (1) Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Av. Universidad 3000, 04510 Mexico City, Mexico
- (2) Department of Molecular Genetics, Institute of Cellular Physiology, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico
- (3) General Hospital of Mexico, Mexico City, Mexico

 **Patricia Tato**
Email: tato@servidor.unam.mx
Fax: +52-55-56232382

Received: 12 April 2002 **Accepted:** 12 February 2003 **Published online:** 26 March 2003

Abstract The purpose of this study was to determine the Th1 and Th2 cytokine responses induced by *Taenia solium* metacestode antigens in mice and correlate them with the immune responses elicited in vivo. To assess this aim, mice were inoculated with metacestode antigens. RNA was obtained from spleen cells of immunized or control mice incubated with metacestode antigens and used to determine the cytokine profile. Peripheral blood eosinophilia was measured daily in each mouse and specific serum antibody levels were determined. Results showed that metacestode antigens induce the synthesis of IL-4, IL-5 and IFN- γ mRNAs in spleen cells. They also induced peripheral blood eosinophilia and elicited specific IgE and IgG antibodies, especially IgG1. Three antigens were recognized by all IgG subclasses and by IgE (104, 88 and 7 kDa), and a 57-kDa protein was recognized by IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgE. IgG1 and IgG2b recognized 52, 30 and 20 kDa antigens. Immune responses elicited in vivo and the cytokine profile showed

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

good correlation.

Introduction

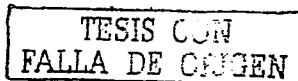
T cells mediate many responses relevant to immunity against parasitic infections. Recent research has focused on the role of T helper (Th) subsets and the cytokines they release in response to helminths, especially of Th2 cells (Sher and Coffman 1992). Eosinophilia and elevated IgE are hallmarks of helminth infections (Okano et al. 1999; Bueno et al. 2000a, 2000b). Th2 cytokines induce most notably the production of IgE (IL-4 and IL-13) (Pene et al. 1988; Bancheureau and Rousset 1991; Punnonen et al. 1993) and eosinophilia (IL-5) (Clutterbuck et al. 1989; Sanderson 1990) and they are in turn regulated by a network of cross-regulatory cytokines supplied by Th subsets (Kimata et al. 1992; King et al. 1995) like IL-10 that modulates IFN- γ and IL-5 production (Boros and Whitfield 1998).

An association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection with *Schistosoma* has been demonstrated (Hagan et al. 1991; Dunne et al. 1992). Studies in an endemic focus of *Schistosoma mansoni* suggest that the acquired resistance seems to be IgE-mediated (Van Dam et al. 1996).

On the other hand, eosinophils are important as effector cells in immunity against *Trichinella spiralis* (Kazura and Aikawa 1980; Vallance et al. 2000), *Onchocerca volvulus* (Greene et al. 1981), *Brugia malayi* (Sim et al. 1982), *Toxocara canis* (Fattah et al. 1986), *Angiostrongylus costaricensis* (Sugaya et al. 2002), *S. mansoni* (Butterworth et al. 1977; Dunne et al. 1993; Grezel et al. 1993; Dombrowicz et al. 2000), and *T. solium* larvae (Molinari et al. 1983a, 1983b).

Immunization of pigs with antigens obtained from *T. solium* metacestodes induced a high level of protection against the larval stage, both in pigs challenged with *T. solium* eggs (Molinari et al. 1983a) and in naturally parasitized pigs (Molinari et al. 1983b, 1993). Histopathological studies of metacestodes removed from immunized pigs showed an intense inflammatory reaction surrounding metacestodes in different stages of deterioration or completely destroyed. These inflammatory sites were mainly composed of eosinophils, although macrophages, lymphocytes, epithelioid cells, plasma cells and fibroblasts were also observed. Eosinophils were found infiltrating parasite structures. Moreover, these antigens induced peripheral blood eosinophilia and IgG antibodies in naturally parasitized pigs (Molinari et al. 1983a, 1983b). To find out whether mice would be useful in the study of the T-cell helper immune responses induced by *T. solium* metacestode antigens, we immunized mice, determined Th1 and Th2 cytokine responses and correlated these with the immune responses elicited in vivo and those reported in pigs. Here, we report that *T. solium* metacestode antigens induce mixed Th1 and Th2 cytokine responses, although the prominent immune responses elicited in vivo correlate especially with the Th2 profile (eosinophilia, IgE and IgG1 synthesis).

Materials and methods



Mice

Female inbred BALB/c mice were used in this study. They were given food and water ad libitum.

T. solium metacestode antigens

Antigens were prepared according to the method described previously (Molinari et al. 1992) with slight modifications. Briefly, metacestodes were carefully dissected from the muscles of cysticercotic pigs, washed three times with sterile 0.15 M sodium chloride solution and blended for 6 s in a Sorvall Omni-mixer (Ivan Sorvall, Norwalk, Conn.). Metacestodes were washed seven times with sterile distilled water and centrifuged at 1,500 g for 10 min, the pellet was suspended in 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.4% sodium deoxycholate (Merck), deoxyribonuclease (20 µg/ml) and protease inhibitors (0.5 mM EDTA, 5 µg/ml leupeptin and 10 µg/ml E-64) (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, Ind.) and ground with glass sand in a mortar for 2 h at room temperature. The material was centrifuged at 1,500 g for 10 min in a Sorvall MC-5B refrigerated centrifuge at 4°C and the supernatant incubated for 1 h at 37°C with constant stirring. It was then dialyzed against 0.02 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) for 6 days with daily changes. Afterwards, the extract was centrifuged (15,000 g, 30 min), the supernatant lyophilized, and its protein concentration was determined (Bradford 1976).

SDS-PAGE

T. solium metacestode antigens were analyzed by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as described by Laemmli (1970) using 10% polyacrylamide gels. Pre-stained molecular mass markers (Bio-Rad) were included. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie blue.

Immunizations

Ten mice were inoculated subcutaneously with 100 µg of *T. solium* metacestode antigen suspended in 0.1 ml of sterile isotonic saline solution. At 10 days after the first immunization, a booster under the same conditions was given. Control mice (n=10) were inoculated with sterile isotonic saline solution. All experiments were carried out in triplicate.

Spleen cell isolation and proliferation assays

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Spleens were removed under sterile conditions from immunized and control mice 20 days after the second immunization and placed in RPMI medium. Single-cell suspensions were obtained by flushing spleens with 5 ml of medium. Spleen cells were washed once by centrifugation at 400 g for 10 min and then suspended in RPMI containing 10% fetal bovine serum (Gibco), penicillin at 10 IU/ml, and streptomycin at 10 μ g/ml (complete medium). Cell viability was determined by

trypan-blue dye exclusion and cell suspensions were adjusted to 5×10^6 cells/ml. Proliferation assays were performed according to Arechavaleta (1998). Aliquots of 5×10^5 cells were plated in triplicate in 96 well plates (Costar). *T. solium* metacestode antigens were added at concentrations of 0.5, 2.5 and 5 μ g of protein/well. Cultures were incubated in an atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C for 7 days. At 16 h before harvesting, 1 μ Ci of [³H]-thymidine (74 GBq/mmol; ICN, Irvine, Calif.) was added to each culture. Cells were harvested onto glass microfiber filters (Whatman 934-AH) and washed with distilled water using a multiple automated sample harvester (Nunc, Denmark). Tritiated thymidine incorporation was measured by liquid scintillation counting (Packard Tri-card 300 Beckman Instruments, Fullerton, Calif). Data are expressed as mean counts per minute \pm SE.

Total RNA extraction and RT-PCR

Spleen cells (5×10^6 cells/ml) from control or immunized mice were incubated in 24-well flat-bottom plates with 1 ml of ConA (5 μ g/ml) for 4 h or with 1 ml of metacestode antigens (5 μ g/ml) for 64 h at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂. RNA was extracted from spleen cells after incubation with ConA or metacestode antigens using a standard procedure (Chomczynski and Sacchi 1987). In all instances, 0.5 μ g of total RNA was used in the reverse transcription reactions. The sequences of the lymphokine PCR primers were those described by Cook et al. (1993):

IL-2, 5'-ATGTACAGCATGCAGCTCGCATC-3';
5'-GGCTTGTTGAGATGATGCTTTGACA-3'

IL-4, 5'-ATGGGTCTCAACCCCGAGCTAGT-3';
5'-GCTCTTTAGGCTTTCCAGGAAGTC-3'

IL-5, 5'-TGGAGATTCCCATGAGCACAGTGG-3';
5'-AGGAAGTCTTGCAGGTAATCCAGG-3'

IFN- γ , 5'-TGAACGCTACACACTGCATCTTGG-3';
5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCTGAG-3'

All amplification reactions were done for 30 cycles in a thermal cycler (MJ Research).

Watertown, Mass.). The PCR cycling program consisted of denaturation for 1 min at 94°C followed by annealing at 60°C for 2 min, extension at 72°C for 3 min, denaturation for 1 min at 94°C, and ending with a final extension for 7 min at 72°C. PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide (5 $\mu\text{g}/50\text{ ml}$) in 0.5 \times TBE (0.5 M Tris, 0.9 M boric acid, 0.01 M EDTA) at 100 V for 45 min.

Measurement of peripheral blood eosinophilia

Eosinophilia was measured for 10 days starting 24 h after the booster. All immunized and control mice were bled daily from the tail vein and eosinophils were counted following a standard technique (Raphael 1983). Blood was diluted (1:20) with Hinkleman's dye solution and eosinophils were counted in a hemocytometer. Results were expressed as eosinophils/mm³.

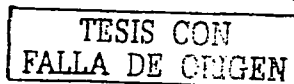
Determination of specific serum antibodies

IgG and IgE specific antibodies were detected in sera from immunized and control mice by ELISA. The metacestode antigen used in all the ELISAs was the same preparation employed for immunization. Briefly, plates were coated overnight at 4°C with metacestode antigens (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and blocked with 3% nonfat milk in PBS for 30 min at 37°C. Plates were incubated with serum dilutions (1:100) and then with commercial horseradish peroxidase-conjugated rabbit polyclonal anti-mouse IgG (1:8,000) (ZIMED Laboratories, San Francisco, Calif.) or with rat monoclonal anti-mouse IgE (1:1,000) (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Ala.). IgG subclasses were also detected by using peroxidase rabbit polyclonal anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 antibodies (1:8,000) (ZIMED).

Specific antibodies were visualized using the *o*-phenyldiamine peroxidase substrate system at an optical density of 492 nm on an ELISA reader (Labsystems Multiskan, Finland). The cut-off levels were defined as the arithmetic mean+3SD of the antibody activity of the control sera.

Western blot analysis

Electrophoresis was performed as described above using 18 $\mu\text{g}/\text{well}$ of metacestode antigen and Western blot analysis was performed according to the method described by Tsang et al. (1989). In order to determine the specificities of IgG, IgG subclasses, and IgE antibodies, *T. solium* metacestode antigens were electroblotted (100 V for 45 min) onto nitrocellulose by using a Trans-blot SD semi-dry transfer cell according to the recommendations of the manufacturer (Bio-Rad). The blots were incubated with immunized or control sera (1:100) and bound antibodies were visualized with a 1:1,500 dilution of polyclonal rabbit anti-mouse IgG or IgG subclasses or with a 1:1,000 dilution of monoclonal rat anti-mouse IgE conjugated to horseradish



peroxidase. Proteins recognized by the different isotypes were visualized with the H_2O_2 4-cloro-1-naphtol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mich.) substrate system. Protein masses were estimated from band positions relative to molecular weight markers.

Statistical analysis

Results were analyzed using the Student's *t*-test. *P* values <0.05 were considered significant.

Results

SDS-PAGE

Electrophoretic assays showed that the *T. solium* metacestode antigens contain at least 18 different polypeptides with molecular weights ranging between 7 and 220 kDa (Fig. 1).

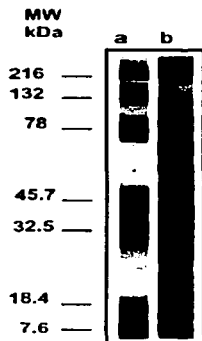


Fig. 1. . SDS-polyacrylamide electrophoresis of *Taenia solium* metacestode antigens. a Molecular mass markers, b metacestode antigens

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Proliferation assays

Proliferative responses of splenocytes to metacestode antigens were determined 20 days after the last immunization. It was found that metacestode antigens induced spleen cell proliferation in a dose-dependent manner in immunized mice in contrast with control animals in which tritiated thymidine uptake was similar to that observed in cells cultivated with RPMI medium. Tritiated thymidine incorporation was statistically significant with all the doses tested when compared with their controls (Fig. 2).

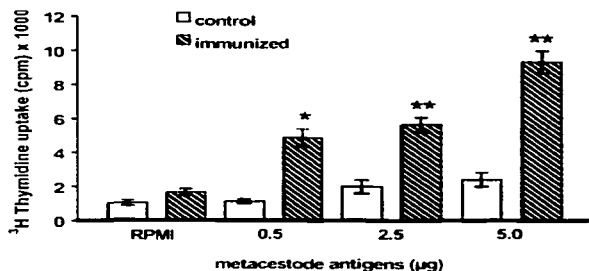


Fig. 2. Tritiated thymidine uptake by spleen cells stimulated with metacestode antigens. Spleen cells from immunized and control mice were stimulated with different doses of metacestode antigens. * $P < 0.02$; ** $P < 0.003$

Cytokine mRNA production

RT-PCR analysis of spleen cells from immunized and control mice stimulated with ConA showed similar results producing IL-2, IFN- γ , and IL-4 mRNAs (Fig. 3A). Meanwhile, RT-PCR analysis showed that spleen cells from immunized mice stimulated with metacestode antigens induced the expression of IFN- γ , IL-4, and IL-5 mRNA in contrast to cells from control animals stimulated under the same conditions which did not show any cytokine mRNA production (Fig. 3B).

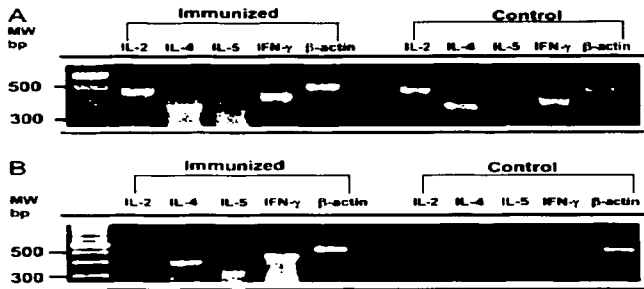


Fig. 3. Cytokine mRNA profile. Determination of IL-2, IL-4, IL-5, and IFN- γ mRNAs of spleen cells from immunized and control mice stimulated with: **A** Concanavalin A, and **B** *T. solium* metacastode antigens. PCR products were analyzed using 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. Molecular mass of the PCR products: IL-2 502 bp, IL-4 399 bp, IL-5 304 bp, and IFN- γ 460 bp

Kinetics of peripheral blood eosinophilia

T. solium metacastode antigens induced a transient increase of blood eosinophilia in mice which started the second day after the last immunization. The highest level (1,383 eosinophils/mm³) was reached on the 3rd day, although the increases on the 4th and 5th days were also statistically significant. Eosinophils return to normal values by the 7th day (Fig. 4).

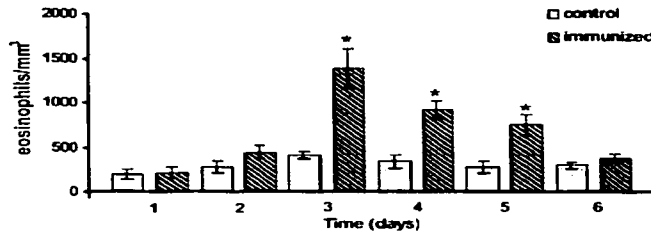


Fig. 4. Peripheral blood eosinophilia of immunized and control mice. Eosinophils were measured daily after the second immunization with metacastode antigens. * $P < 0.01$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Antibody isotype determination

ELISA detected high levels of specific IgG and IgE serum antibodies in immunized mice (Fig. 5A). IgG subclasses were measured and it was found that although, IgG1, IgG2b, and IgG3 were significantly increased in immunized mouse sera ($P < 0.02$), the IgG1 value was the highest and IgG2a remained unchanged (Fig. 5B).

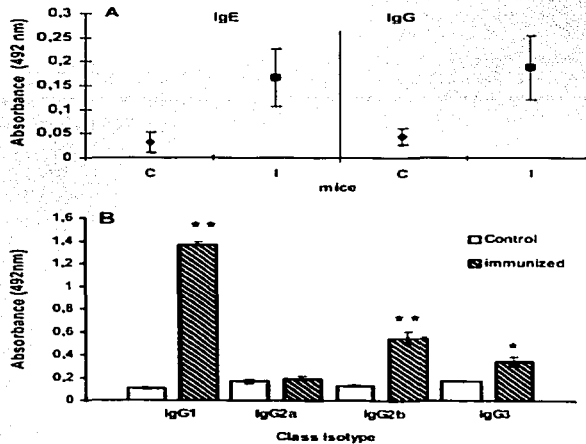


Fig. 5. Specific antibody isotype responses against *T. solium* metacestode antigens detected by ELISA. **A** IgE and IgG responses. **C** Sera from control non-immunized mice, **I** sera from immunized mice. **B** IgG subclasses. Results are expressed as the mean absorbance values ($A_{492\text{nm}}$) \pm SD. * $P < 0.012$ and ** $P < 0.0007$

Determination of the immunoreactivities of IgG and IgE antibodies

Three antigens were recognized by all IgG subclasses and by IgE (104, 88 and 7 kDa) meanwhile a 57-kDa protein was recognized by IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgE (Fig. 6). IgG1 and IgG2b recognized 52, 30 and 20 kDa antigens. Second antibody and substrate controls as well as normal sera showed no bands (Fig. 6 lines 1, 2 and 3). Since, it has been reported that *T. solium* metacestodes bind IgG molecules (Landa et al. 1994), we incubated a nitrocellulose strip containing metacestode antigens with polyclonal rabbit anti-pig IgG serum conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich) in order to look for IgG molecules in our antigen preparation. Four bands (68, 60, 42 and 35 kDa) were found. Two of them (68 and 60 kDa) were recognized by most of the IgG subclasses and IgE.

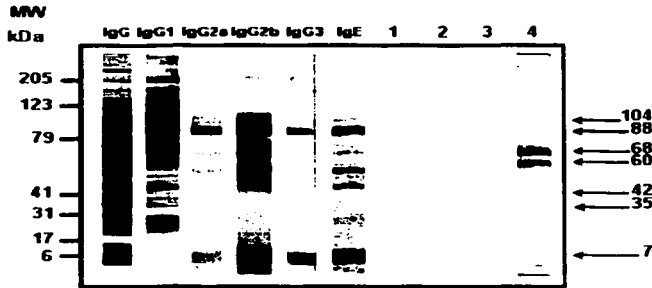


Fig. 6. Immunoreactivities of IgG and IgE antibodies. Nitrocellulose strips were incubated with sera from immunized and control mice and immunoreactivities were visualized using antibodies anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, and IgE. *Line 1* Strip incubated with normal serum and revealed with anti-mouse IgG; *line 2* second antibody control; *line 3* substrate control; and *line 4* strip incubated with anti-pig IgG conjugated to peroxidase. Molecular mass markers are specified

Discussion

Immunity against parasitic helminth infections is characterized by eosinophilia and elevated serum IgE. The Th1/Th2 CD4+ responses have been fairly well characterized in murine models of infections caused by *S. mansoni*, *A. costaricensis*, and *Taenia crassiceps* (Grzych et al. 1991; Sugaya et al. 1997; Terrazas et al. 1998; Toenjes et al. 1999), but no work has been done on *T. solium* cysticercosis. Here, we describe the mRNA cytokine profile produced by splenocytes from immunized mice stimulated with *T. solium* metacestode antigens and its correlation with the immune responses elicited in vivo. Results showed that splenocytes from immunized mice stimulated with metacestode antigens produced IL-5 and IL-4 mRNAs which correlated well with the eosinophilia and synthesis of IgG1 and IgE specific antibodies (Th2-responses). IgG2b

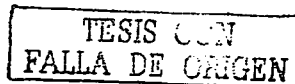
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

was also significantly produced. Its switching is induced by TGF- β (Stavnezer 1996), another cytokine produced by Th2 cells. Our results showed that IFN- γ mRNA was induced by *T. solium* antigens and a significant production of IgG3 was found (Th1 response) (Stavnezer 1996). In our experiments, IL-2 mRNA was not detected in splenocytes stimulated with *T. solium* antigens. This agreed with the low production of IL-2 in response to helminth antigens that has been reported (Soboslay et al. 1999; Pit et al. 2001).

Cross-regulation by cytokines has been proposed as the mechanism by which Th1 and Th2 stay in balance and alter each other's function (Gajewski and Fitch 1988; Peleman et al. 1989; Martinez et al. 1990). But, although much work has focused on the inhibitory effect of some cytokines produced by these Th cell populations, mixed responses coexist in some parasitic infections. For instance, the systemic immune response of BALB/c mice infected with *T. crassiceps* is a mixed Th1/Th2 response since an increased production of IFN- γ and IL-4 was observed throughout infection when cells were stimulated with larval antigens (Toenjes et al. 1999). Similarly, our results showed that splenocytes stimulated with *T. solium* metacystode antigens expressed IFN- γ (Th1 response), IL-4 and IL-5 (Th2 responses) mRNAs. However, in these experiments, the biological effects driven by IL-4 predominated *in vivo* since IgE and IgG1 specific antibodies were produced to a greater extent in comparison with IgG3. In human neurocysticercosis (NCC), IL-5 and IL-10 (Th2 responses) are reported to be the major cytokines in the cerebrospinal fluid of patients with active disease (Rodrigues et al. 2000). Meanwhile, peripheral blood mononuclear cells from NCC patients showed a Th1 cytokine profile when they were stimulated with metacystode antigens (Grewal et al. 2000). Finally, it has been reported that in brain granulomas from human NCC, Th1 cytokines (IFN- γ and IL-18) were prevalent but Th2 cytokines (IL-4, IL-10 and IL-13) were also present (Restrepo et al. 2001).

The presence of IL-10 in the granulomas around the metacystodes has been documented in *T. crassiceps* as well as in patients with *T. solium* cysticercosis (Robinson et al. 1992; Terrazas et al. 1998; Restrepo et al. 2001), but its role has not been elucidated. It has been reported that *T. crassiceps* metacystode carbohydrates induce the production of IL-6 and IL-10 with the absence of IL-4 and IL-5 (Dissanayake et al. 2002). Moreover, IL-10 inhibits IL-4 induced IgE synthesis by peripheral blood mononuclear cells from healthy and allergic patients (Punnonen et al. 1993; Jeannin et al. 1998), and induces apoptosis in eosinophils (Takanaski et al. 1994). Since our results showed that immunization with antigens induced IL-4 and IL-5-driven responses, it would be unlikely that they induce IL-10 production.

Previous work on immunized pigs demonstrated that *T. solium* metacystode antigens induced eosinophilia (Molinari et al. 1983b) and that these cells have been related to the destruction of the cysts (Willms and Merchant 1980; Molinari et al. 1986). Eosinophils have been related to protection in other parasitic helminth infections (Behm and Ovington 2000; Herbert et al. 2000; Vallance et al. 2000; Sugaya et al. 2002). Our results showed that metacystode antigens also evoked eosinophilia in mice since, after the second immunization, increased levels of eosinophils were observed in the peripheral blood. IL-5 increases the eosinophil pool within the bone marrow and promotes eosinophil maturation as well as blood eosinophilia in the presence of allergen or parasitic antigens (Dombrowics and Capron 2001). Even though, metacystode antigens did not induce a conspicuous expression of IL-5 mRNA *ex vivo*, we found blood



eosinophilia, an IL-5 regulated response, suggesting that some antigens in this complex preferentially induced IFN- γ and IL-4 mRNA expression ex vivo.

It was also found that *T. solium* metacystode antigens predominantly induced the production of specific IgG1 in mice although specific IgE and IgG2b antibodies were also detected. These antibody responses along with the blood eosinophilia are compatible with a Th2-type immune response. Similar results on antibody levels have been reported in the *T. crassiceps* murine model, since increasing amounts of specific IgG1 and IgG2b were detected as infection progresses, especially IgG1. Specific IgG2a (Th1 response) was increased early in the infection but was later dramatically downregulated (Terrazas et al. 1998). Finally, the results showed that *T. solium* metacystode antigens induced a mixed Th1/Th2 response in mice (IFN- γ , IL-4 and IL-5), although, Th2-driven immune responses predominated in vivo (eosinophilia, and IgE, IgG1 and IgG2b antibodies).

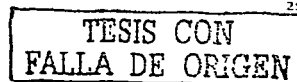
The antigens used in the present study induced protection in pigs against the infection with *T. solium* eggs and in naturally infected pigs (Molinari et al. 1993a, 1993b). In mice, they induced a granulomatous process around metacystodes implanted subcutaneously that destroyed the parasite (Tato et al. 1996; Molinari et al. 1998). In all of these works, eosinophils (Th2 response) have been found in the inflammatory reactions surrounding the larvae and they have been related to the damage to the parasite. Our results confirmed that *T. solium* protective antigens induced mainly Th2-driven responses ex vivo and in vivo. In contrast, results of research with *T. crassiceps* suggest that Th1 responses are protective (Terrazas et al. 1998, 1999).

The murine model using *T. solium* antigens seems to be helpful in the understanding of the protective immune responses against cysticercosis.

Acknowledgements We are grateful to Jimena Quinzaños and Jorge Luis Martínez-Tlahuel for their technical assistance. This research was funded by grants from Conacyt 30853-M, PAEP-UNAM 102313, and Dirección de Investigación, Hospital General de México O.D. The experiments described in this paper comply with the current laws of Mexico.

References

- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P (1998) A *Taenia solium* cysticercus factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84:117–122
- Banchereau J, Rousset F (1991) Functions of interleukin-4 on human B-lymphocytes. *Immunol Res* 10:423–427
- Behm CA, Ovington KS (2000) The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 16:202–209



Boros DL, Whitfield JR (1998) Endogenous IL-10 regulates IFN- γ and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in *Schistosomiasis mansonii* infected mice. Immunology 94:481-487

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254

Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramento JA (2000a) Total IgE detection in paired cerebrospinal fluid and serum sample from patients with neurocysticercosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 42:67-70

Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramento JA (2000b) Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. Arq Neuropsiquiatr 58:18-24

Butterworth AE, David JR, Franks D, Mahmoud AAF, David PH, Sturrock RF, Houba V (1977) Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ^{51}Cr -labeled schistosomula of *Schistosoma mansonii*: Damage by purified eosinophils. J Exp Med 145:136-150

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-159

Clutterbuck EJ, Hirst EM, Sanderson CJ (1989) Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6 and GM-CSF. Blood 73:1504-1512

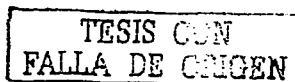
Cook GA, Metwali A, Blum A, Mathew R, Weinstock JV (1993) Lymphokine expression in granulomas of *Schistosoma mansonii*-infected mice. Cell Immunol 152:49-58

Dissanayake S, Khan N, Shahin A, Wijesinghe S, Lukic M (2002) Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by *Taenia crassiceps* metacestode carbohydrates. Immunology 107:411-419

Dombrowicz D, Capron M (2001) Eosinophils, allergy and parasites. Curr Opin Immunol 13:716-720

Dombrowicz D, Quantannens B, Papin JP, Capron A, Capron M (2000) Expression of a functional Fc epsilon R1 on rat eosinophils and macrophages. J Immunol 165:1266-1271

Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJ, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, Capron A, Pierce RJ, Sturrock RF (1992) Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between



IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* 22:1483-1494

Dunne DW, Richardson BA, Jones FM, Clark M, Thorne KJ, Butterworth AE (1993) The use of mouse/human chimaeric antibodies to investigate the roles of different antibody isotypes, including IgA2, in the killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils. *Parasite Immunol* 15:181-185

Fattah DI, Maizels RM, McLaren DJ, Spry CJ (1986) *Toxocara canis*: interaction of human blood eosinophils with the infective larvae. *Exp Parasitol* 61:421-431

Gajewski TF, Fitch FW (1988) Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation 1. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 40:4245-4252

Greene BM, Taylor HR, Aikawa M (1981) Cellular killing of microfilariae of *Onchocerca volvulus*: eosinophil and neutrophil-mediated immune serum-dependent destruction. *J Immunol* 127:1611-1618

Grewal JS, Kaur S, Bhatti G, Sawhney IM, Ganguly NK, Mahajan RC, Malla N (2000) Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 86:500-503

Grzel D, Capron M, Grzych JM, Fontaine J, Lecocq JP, Capron A (1993) Protective immunity induced in rat schistosomiasis by a single dose of the Sm28GST recombinant antigen: effector mechanisms involving IgE and IgA antibodies. *Eur J Immunol* 23:454-460

Grzych J, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A (1991) Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis. *J Immunol* 146:1322-1327

Hagan P, Blumenthal UJ, Dunn D, Simpson AJ, Wilkins HA (1991) Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 349:243-245

Herbert DR, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D (2000) Role of IL-5 in innate and adaptative immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol* 165:4544-4551

Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY (1998) IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol* 160:3555-3561

Kazura JW, Aikawa M (1980) Host defense mechanisms against *Trichinella spiralis* infection in the mouse eosinophil-mediated destruction of the newborn larvae in vitro. *J Immunol* 124:355-361

- Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Lindley I, Mikawa H (1992) Interleukin 8 (IL-8) selectively inhibits immunoglobulin E production induced by IL-4 in human B cells. *J Exp Med* 176:1227-1231
- King CL, Hakimi J, Shata MT, Medhat A (1995) IL-12 regulation of parasite antigen-driven IgE production in human helminth infections. *J Immunol* 155:454-461
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Landa A, Merchant MT, Willms K, Lacleite JP (1994) Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (Cestoda) cysticerci. *Int J Parasitol* 24:265-269
- Martinez OM, Gibbons RS, Garavoy MR, Aronson FR (1990) IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. *J Immunol* 144:2211-2215
- Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P, Retana A (1983a) *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. *Exp Parasitol* 55:340-357
- Molinari JL, Meza R, Tato P (1983b) *Taenia solium*: Cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp Parasitol* 56:327-338
- Molinari JL, Tato P, Sepulveda J, Carabez A (1986) Ultrastructure evidence for damage of *Taenia solium* cysticerci from naturally parasitized, immunized hogs. *Rev Lat-Am Microbiol* 28:47-61
- Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepúlveda J, Palet A (1993) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 49:502-512
- Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S (1997) Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 69:55-63
- Molinari JL, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M, Sepulveda J (1998) Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol Res* 84:173-180
- Okano M, Satoskar AR, Nishizaki J, Abe M, Ham DA Jr (1999) Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163:6712-6717

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Peleman R, Wu J, Fargeas C, Delespesse G (1989) Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. *J Exp Med* 170:1751-1756.
- Penc J, Rousset F, Briere F, Chretien I, Bonnefoy JY, Spits H, Yokota T, Arai N, Arai K, Banchereau J, de Vries JE (1988) IgE production by normal lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6880-6884
- Pit DSS, Polderman AM, Baeta S, Schulz-Key H, Soboslay PT (2001) Parasite-specific antibody and cellular immune responses in humans infected with *Necator americanus* and *Oesophagostomum bifurcum*. *Parasitol Res* 87:722-729
- Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Wall Malefyt R, de Vries JE (1993) Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3730-3734
- Raphael SS (1983) Lynch's medical laboratory technology. WB Sanders, Philadelphia
- Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM (2001) Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 69:4554-4560
- Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White AC (1997) Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 65:2925-2931
- Rodrigues V, de-Mello FA, Magalhaes EP, Ribeiro SBF, Marquez JO (2000) Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res* 33:1059-1063
- Sanderson CJ (1990) The biological role of interleukin 5. *Int J Cell Cloning* 8:147-153
- Sher A, Coffman RL (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T-cell derived cytokines. *Annu Rev Immunol* 10:385-409
- Sim BK, Kwa BH, Mak JW (1982) Immune responses in human *Brugia malayi* infections: serum dependent cell-mediated destruction of infective larvae in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76:362-370
- Soboslay PT, Luder CG, Riesch S, Geiger SM, Banla M, Batchassi E, Stadler A, Schulz-Key H (1999) Regulatory effects of Th1-type (IFN-gamma, IL-12) and Th2-type cytokines (IL-10, IL-13) on parasite-specific cellular responsiveness in *Onchocerca volvulus* infected humans and exposed endemic controls. *Immunology* 97:219-225

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Stavnezer J (1996) Immunoglobulin class switching. *Curr Opin Immunol* 8:199–205

Sugaya H, Aoki M, Abe T, Ishida K, Yoshimura K (1997) Cytokine responses in mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Res* 83:10–15

Sugaya H, Graeff-Teixeira C, Ishida K, Matsuda S, Katahira K, Yoshimura K (2002) Interleukin-5 transgenic mice show augmented resistance to *Angiostrongylus costaricensis* infection. *Parasitol Res* 88:350–355

Takanashi S, Nonaka R, Xing Z, O'Byrne P, Dolovich J, Jordana M (1994) Interleukin-10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *J Exp Med* 180:711–715

Tato P, White AC, Willms K, Rodriguez D, Solano S, Sepulveda J, Molinari JL (1996) Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T. solium* metacestodes. *Parasitol Res* 82:590–597

Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C (1998) Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 84:74–81

Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 85:135–141

Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE (1999) The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 118:623–633

Tsang VCW, Brand JA, Boyer AF (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 159:50–59

Van Dam GJ, Stelma FF, Gryseels B, Falcao Ferreira ST, Talla I, Niang M, Ratmans JP, Declerck AM (1996) Antibody response patterns against *Schistosoma mansoni* in a recently exposed community in Senegal. *J Infect Dis* 173:1232–1241

Vallance BA, Matthaei KI, Sanovic S, Young IG, Collins SM (2000) Interleukin-5 deficient mice exhibit impaired host defense against challenge *Trichinella spiralis* infections. *Parasite Immunol* 22:487–492

Willms K, Merchant MT (1980) The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig

muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol 2:261-275

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN