

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD EN CIENCIAS BIOMEDICAS

"IDENTIFICACION DE PEPTIDOS INMUNODOMINANTES  
DEL AgB DE *TAENIA SOLIUM*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A :  
C. DR. HECTOR SAMUEL LOPEZ MORENO

COMITE TUTORAL  
DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRAN  
DR. JUAN PEDRO LACLATTE SAN ROMAN  
DR. VIANNEY FRANCISCO ORTIZ NAVARRETE

MEXICO, D.F. ABRIL 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a **Dios** por su generosidad al permitirme alcanzar esta meta.

De manera muy especial agradezco a mis padres: **Rosa Carmina** y **Héctor Samuel** (†) por su inmenso cariño e incondicional apoyo.

A **Angie** mi esposa, por su amor, entereza y comprensión que han sido mi motor en esta y en todas mis empresas.

A **Oziel** y **Byron** mis hijos, quienes con su sonrisa me impulsan a seguir adelante.

A mi comité tutorial, los Doctores **María Dolores**, **Juan Pedro** y **Vianney Francisco** por su invaluable asesoría académico-experimental y su valiosísima amistad.

A mis camaradas de laboratorio: Ricardo, Yolanda, América, Carlos, Dolores, Rossana, Alberto, Tony, Teresa, Roberto, Genaro, Benjamín, Víctor, Flaviano, Penélope, Irlanda, Ángela y Ricardo por sus sugerencias y discusión académica.

<b>ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS .....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II .....</b>	<b>8</b>
<b>Procesamiento y presentación de antígeno.....</b>	<b>11</b>
Procesamiento y presentación de antígeno por clase I .....	12
Procesamiento y presentación de antígeno por clase II .....	13
<b>Unión de péptidos al MHC.....</b>	<b>16</b>
<b>Características de los péptidos unidos a I-A<sup>d</sup> .....</b>	<b>17</b>
<b>El receptor del linfocito T (TCR) y el reconocimiento antigénico .....</b>	<b>19</b>
<b>Los linfocitos T cooperadores (Th) .....</b>	<b>22</b>
<b>Participación de los linfocitos Th en la cisticercosis.....</b>	<b>25</b>
Cisticercosis por <i>Taenia solium</i> .....	25
Cisticercosis experimental .....	28
Cisticercosis humana.....	32
<b>La paramiosina de <i>Taenia solium</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>37</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
<b>Producción y purificación de la rTPmy .....</b>	<b>39</b>
Expresión de la rTPmy .....	39
Purificación de la rTPmy .....	39
<b>Predicción de los determinantes antigénicos.....</b>	<b>40</b>
<b>Inmunización de ratones .....</b>	<b>41</b>
<b>ELISA .....</b>	<b>42</b>
<b>Western blot .....</b>	<b>43</b>
<b>Ensayo de proliferación celular.....</b>	<b>44</b>
<b>División antígeno-específica de linfocitos Th.....</b>	<b>44</b>

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>71</b>

**ABREVIATURAS EMPLEADAS EN ESTA TESIS**

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>AEP</b>	Asparagil endopeptidasa
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>APC</b>	Célula presentadora de antígeno
<b>Cat</b>	Catepsina
<b>CDR</b>	Región determinante de complementariedad
<b>CFSE</b>	5, 6 Carboxi-fluoresceín-succinimidil-éster
<b>CLIP</b>	Péptido de la cadena invariante asociado a clase II
<b>ER</b>	Retículo endoplásmico
<b>IFN</b>	Interferón
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>Ii</b>	Cadena invariante
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IPTG</b>	Isopropil-tio-galactopiranosido
<b>MHC</b>	Complejo principal de histocompatibilidad
<b>NC</b>	Neurocisticercosis
<b>pMHC</b>	Péptido acoplado a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad
<b>STAT</b>	Activador transcripcional de transducción de señales
<b>TCR</b>	Receptor del linfocito T
<b>Th</b>	Linfocito T cooperador

<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Tp</b>	Péptido derivado de la paramiosina de <i>Taenia solium</i>
<b>TP<sub>my</sub></b>	Paramiosina de <i>Taenia solium</i>

## RESUMEN

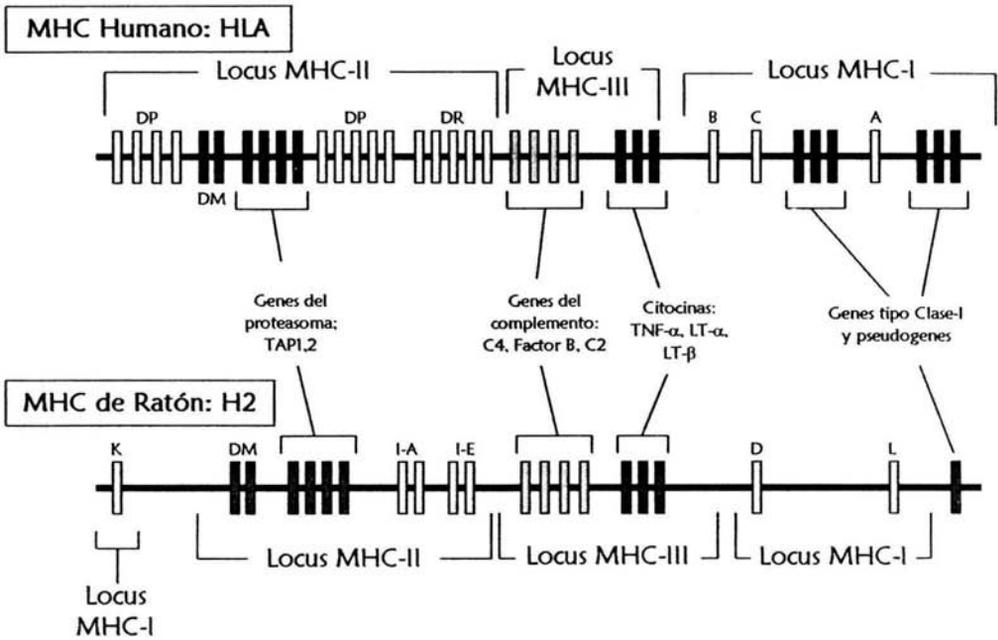
En diferentes reportes se ha demostrado la participación de los linfocitos Th (Th1 y Th2) en el curso de la cisticercosis experimental de ratón. Sin embargo, en ninguno de ellos se ha identificado algún determinante antigénico que evoque dicha respuesta. Esto refleja nuestro escaso conocimiento en torno a la respuesta inmune celular en la cisticercosis. En la presente tesis, se seleccionó al antígeno B (AgB), uno de los antígenos más inmunodominantes para humanos, cerdos y ratones con cisticercosis, como el antígeno idóneo para iniciar la identificación de los determinantes antigénicos que fueran presentados en el contexto de moléculas del MHC-II que evoquen una respuesta de linfocitos Th antígeno-específica. Actualmente se sabe que el AgB es la paramiosina de *Taenia solium* (TPmy), además se conoce su secuencia primaria y en base a ella, se predijeron y sintetizaron cinco péptidos con las características de unión para la molécula I-A<sup>d</sup> (MHC-II de ratón). Estos péptidos fueron nombrados como Tp176 DDLQRQMADANSAKSRL; Tp337 IKDLQAENEALAAENGE; Tp376 TVEINTLNSANSALEAD; Tp379 INTLNSANSALEADNMR; y Tp431 ANRRLTDLEALRSQLEA. Al evaluarlos mediante ensayos de proliferación celular y de división antígeno-específica empleando el fluorocromo 5,6 carboxi-fluoresceín-succinimidil-éster (CFSE), en esplenocitos se encontró lo siguiente: 1) que Tp176 induce una respuesta de linfocitos Th muy similar a la inducida por TPmy, lo cual sugiere que Tp176 es el epítipo inmunodominante derivado de la TPmy; 2) que Tp376 y Tp379 son epítipos subdominantes de la TPmy y, 3) que no obstante que Tp337 y Tp431 cumplen con los sitios de anclaje para I-A<sup>d</sup> no fue posible detectar una respuesta de linfocitos Th contra ellos, lo cual podría indicar que no existen clonas reactivas para estos determinantes antigénicos, al menos en ratones BALB/c, o que no son generados por el procesamiento antigénico *in vivo*. Nuestros resultados son la primera evidencia experimental de determinantes antigénicos derivados del cisticerco de *T. solium*, capaces de evocar una respuesta de linfocitos Th.

## INTRODUCCIÓN

### Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase I y II

Los análisis de los ratones congénicos que fueron seleccionados por su capacidad para rechazar injertos provenientes de otros, mostraron que una región genética particular era la responsable del rechazo del tejido injertado. Esta región correspondía al complejo principal de histocompatibilidad (del inglés "Major Histocompatibility Complex" o MHC). Este locus identificado inicialmente en ratones por Snell's *et al.*, se localiza en el cromosoma 17 del ratón y codifica un grupo sanguíneo de antígenos polimórficos llamados antígenos H-2, por lo que esta región fue llamada histocompatibilidad-2 o H-2 (revisado en Abbas *et al.*, 2003). Posteriormente en el cromosoma 6 de los seres humanos se identificó su MHC, el cual fue llamado sistema de antígenos leucocitarios humanos (del inglés "Human Leucocyte Antigens o HLA) (Abbas *et al.*, 2003). Tanto el MHC de ratón como el del ser humano comprenden tres locus llamados MHC de clase I (MHC-I), MHC-II y MHC-III. Solo los dos primeros están involucrados en la presentación antigénica a linfocitos T. El MHC-I comprende los locus K, D y L en ratón y por los locus A, B y C en el ser humano; el MHC-II está formado por I-A e I-E en ratón y en el ser humano: DP, DQ y DR. Además en ambas especies este locus contiene: el gen de la molécula no polimórfica llamada DM; los genes del proteasoma y de los transportadores de péptidos TAPs. El MHC-III corresponde tanto en el ratón como en el ser humano a algunas proteínas del sistema de

complemento como a citocinas de la familia del factor de necrosis tumoral o TNF (TNF- $\alpha$  y las linfoquinas) Figura 1 (Abbas *et al.*, 2003).



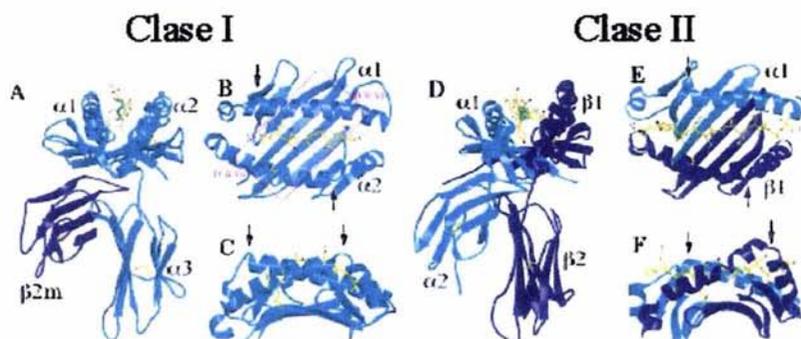
**Figura 1.** Esquema sintetizado del mapa genético de los loci del MHC de ratón y del ser humano. El tamaño de los genes y su separación no son mostrados a escala. El MHC-III no codifica para moléculas presentadoras de antígeno a linfocitos T (Modificado de Abbas *et al.*, 2003)

Las moléculas del MHC son glicoproteínas que pueden agruparse de manera general en dos clases: MHC clase I y MHC clase II (MHC-I, MHC-II respectivamente). Las moléculas de clase I se encuentran prácticamente en todas las células del organismo. Ellas presentan proteínas procesadas en el citosol, alertando al sistema inmune de la presencia de patógenos intracelulares como *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis*, virus, etc., (Pearce *et al.*, 1999). En general los complejos MHC

clase I-péptido son reconocidos por linfocitos T citotóxicos que expresan el co-receptor CD8, resultando en la eliminación de la célula blanco. En cambio las moléculas del MHC-II son expresadas en un número más limitado de células, llamadas células presentadoras de antígeno (del inglés "Antigen Presenting Cell" o APC) involucradas en las interacciones con linfocitos T que expresan el co-receptor CD4. Las moléculas del MHC-II unen péptidos derivados de antígenos exógenos, tales como proteínas endocitadas por un macrófago. El reconocimiento de un complejo MHC-II-péptido (pMHC-II) por un linfocito T CD4<sup>+</sup> puede contribuir a la activación de un linfocito B para la producción de anticuerpos, o activar a un macrófago infectado para destruir un protozoario intracelular (Bjorkman 1997; Ohta *et al.*, 2000).

Las moléculas de MHC-I y II tienen una estructura tridimensional muy similar, ambas contienen una porción distal a la membrana que constituye el nicho de unión al antígeno conformado por 8 hojas  $\beta$ -plegadas y dos  $\alpha$ -hélices (Figura 2). En cada molécula, esta región está formada por dos dominios ( $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  en clase I;  $\alpha 1$  y  $\beta 1$  en clase II), cada uno está compuesto de 4 hojas  $\beta$ -plegadas y una  $\alpha$ -hélice. Los péptidos antigénicos que se unen a moléculas del MHC clase I tienen una longitud de 8 o 9 residuos; en tanto que para clase II la longitud va de 14 a 20 residuos (Buss *et al.*, 1986; Sette *et al.*, 1988; Rudensky *et al.*, 1991; Hunt *et al.*, 1992; Baños *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 1998). Las características estructurales de las moléculas del MHC clase I y II solo permiten que el péptido antigénico se asocie en una sola dirección (Bjorkman 1997). Adicionalmente en cada

molécula del MHC existen posiciones de anclaje fundamentales para que se formen complejos estables MHC-péptido (Sette *et al*, 1988; Rudensky *et al*, 1991; Bartnes *et al*, 1997; Scott *et al*, 1998; Hural *et al*, 2002).



**Figura 2. Estructuras de las moléculas del MHC clase I y II.** Los puntos más altos de las  $\alpha$ -hélices están indicados por las flechas en (B), (C), (E) y (F). En (A) y (D) se pueden observar la gran semejanza entre las estructuras de las moléculas del MHC de clase I y II. En (B) y (E) se observa una vista superior del sitio de unión al antígeno de las moléculas de clase I y II. En (C) y (F) se observa una vista lateral del sitio de unión al antígeno. En amarillo se observa el acomodo del determinante antigénico. El rectángulo rosa observado en (B) indica la posición de contacto con el TCR. (Figura modificada de Bjorkman 1997).

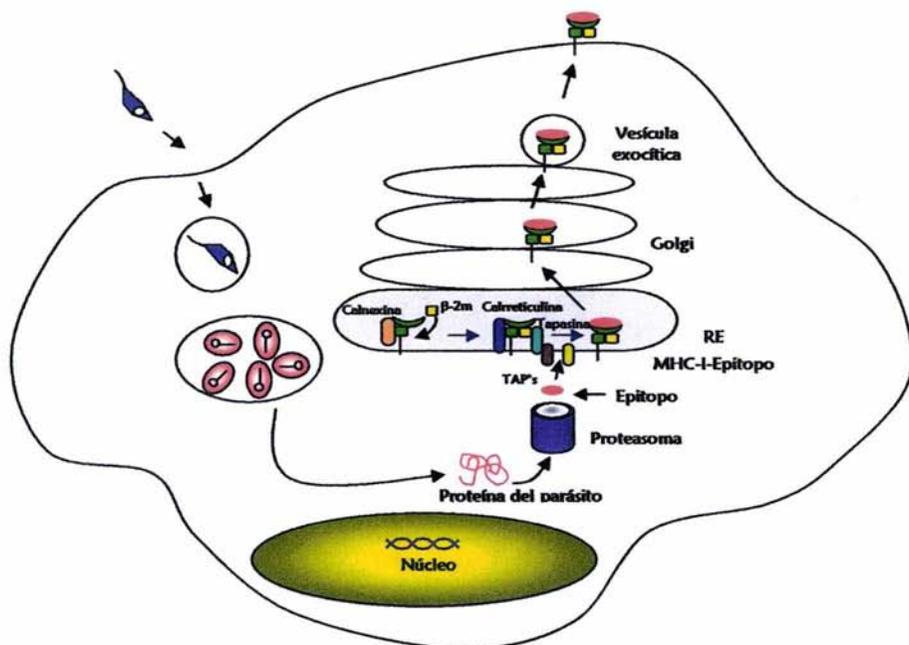
### Procesamiento y presentación de antígeno

Las células degradan antígenos proteicos mediante dos vías principales que implican la participación de diferentes compartimentos subcelulares. Una de estas vías opera en el citosol y núcleo mediante la participación de complejos multienzimáticos conocidos como proteasomas, mientras que la otra opera en compartimentos endocíticos, particularmente en lisosomas. Cada una de estas vías tiene participaciones diferentes en la presentación

antigénica (Rock *et al.*, 2002; Wolf *et al.*, 2002) y por ende, diferentes repercusiones en la generación de la respuesta de linfocitos T.

#### Procesamiento y presentación de antígeno por clase I

La vía proteolítica del citosol y núcleo es la responsable de la degradación de una gran variedad de proteínas endógenas incluyendo antígenos proteicos derivados de microorganismos patógenos intracelulares. Las proteínas a ser degradadas por el proteasoma adquieren una señal de "destrucción" mediante la unión covalente al carboxilo terminal de una proteína pequeña conocida como ubiquitina. A la ubiquitina unida se le pueden adicionar 3 o 4 moléculas más de ubiquitina (poliubiquitinación) y con ello la proteína es blanco de la degradación por el proteasoma (Rock *et al.*, 2002). Los fragmentos peptídicos generados por el proteasoma son translocados al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante un transportador dependiente de ATP que se encuentra anclado a su membrana, conocido como TAP (del inglés "Transporter associated with Antigen Processing"). De manera simultánea en el RE se están sintetizando los complejos de cadena pesada de clase I- $\beta$ -2-microglobulina asociados con tapasina. Cuando péptidos de 8, 9 o 10 aminoácidos entran al RE, se pueden asociar al sitio de anclaje de la molécula del MHC-I, una vez que esto ha ocurrido el complejo MHC-I-péptido (pMHC-I) entra a la vía exocítica del aparato de Golgi para anclarse a la membrana celular donde puede ser reconocido por un linfocito T CD8<sup>+</sup> (Ver esquema en Figura 3).



**Figura 3. Procesamiento y presentación de antígeno por MHC clase I.** Cuando un patógeno intracelular se replica algunas de sus proteínas acceden al citosol donde pueden ser degradadas por el complejo multicatalítico llamado proteasoma, los péptidos antigénicos que se generan son traslocados al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante unos transportadores llamados TAP's. En el RE se sintetizan la cadena pesada de la molécula de MHC clase I la cual se encuentra interaccionando con calnexina, posteriormente se asocia con la  $\beta$ 2-microglobulina, este complejo es estabilizado por calreticulina y tapasina, posteriormente la molécula se asocia con los péptidos antigénicos recién traslocados con lo cual el complejo MHC-I-peptido viaja a la superficie de la membrana plasmática donde puede ser reconocido por un linfocito T CD8<sup>+</sup>.

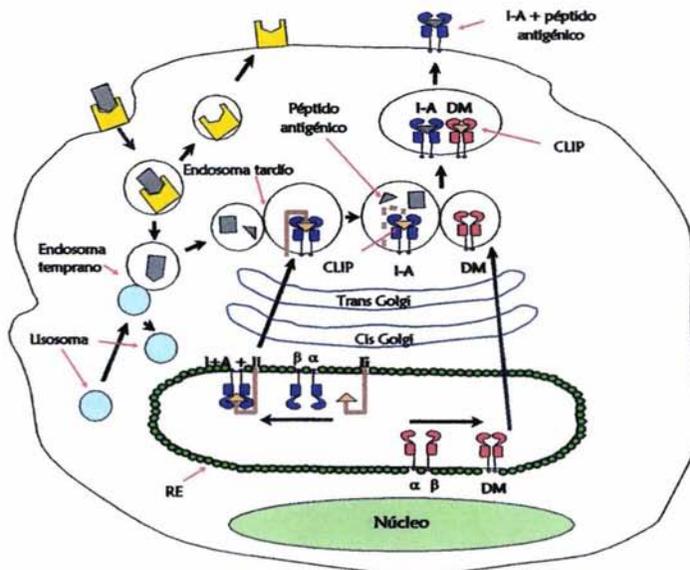
### Procesamiento y presentación de antígeno por clase II

Las proteasas que residen en la vía endocítica (endosoma/lisosoma) son las enzimas clave para la degradación de proteínas. Estas proteasas usualmente funcionan a pH bajo, sin embargo algunas de ellas tienen un amplio rango de actividad a pHs menos ácidos. Las proteasas de esta vía se clasifican en cuatro grupos principales de acuerdo con el aminoácido clave

en el sitio activo: cisteína, ácido aspártico, serina y metaloproteasas. Alrededor de 16 proteasas intracelulares que funcionan a pH ácido, definidas como Catepsinas (Cat) y clasificadas dentro de los cuatro grupos funcionales. Cat B, C, D, E, F, H, K, L, O, S, V y Z han sido identificadas en varias APCs. De éstas, las Cats D y E son aspartil proteasas, mientras que el resto son cisteína proteasas de la familia de la papaína. Cabe señalar que Cat S es la única enzima que se ha descrito con actividad a pH neutro. Adicional a las Cats las APCs tienen una cisteína proteasa, asparaginil endopeptidasa (AEP) miembro de la familia de las legumainas, la cual es una de las enzimas más específicas en función de su selectividad por los sitios de corte (Riese *et al.*, 1996; Wolf *et al.*, 2002).

Al igual que las moléculas del MHC clase I, las moléculas del MHC-II también se sintetizan y ensamblan en el RE, allí tres heterodímeros de éstas, se asocian con tres homotrímeros de cadena invariante (Ii) formando un complejo que al ensamblarse adquiere la señal de tráfico para dirigirse hacia la vía endocítica. Una vez que los complejos MHC-II-Ii entran a los compartimentos endosomales la Ii es degradada por una combinación de aspartil y cisteína proteasas (Cat S, L y F) en CLIP (del inglés "Class II-associated Ii derived Peptides") o en Iip10, los cuales interactúan con el sitio de unión al péptido. Posteriormente el CLIP (o Iip10) es liberado por la interacción de la molécula de clase II no polimorfa DM, permitiendo la unión de péptidos ahí presentes, incluyendo aquellos generados a partir de los antígenos endocitados. Estos antígenos son previamente desdoblados

posiblemente por la acción de la tior-reductasa GILT y posteriormente degradados por AEP, Cat B, Cat L, Cat H, Cat S y/o Cat E, las cuales son las enzimas más importantes que se han descrito para la generación de péptidos antigénicos que son presentados en el contexto de clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup> (ver Figura 4).



**Figura 4. Procesamiento y presentación de antígeno por MHC-II.** Cuando un antígeno exógeno es endocitado inicia su viaje a través de los endosomas/lisosomas donde es degradado por proteasas (catepsinas). Mientras tanto en el retículo endoplásmico se están sintetizando las moléculas del MHC de clase II (I-A en este ejemplo). Una vez que se ha formado el heterodímero  $\alpha\beta$  se asocia con la cadena invariante (Ii) para adquirir su señal de viaje hacia la vía endosomal. El complejo I-A-Ii al entrar al endosoma, la Ii es degradada en CLIP, al ocurrir esto, una molécula de DM se asocia con I-A para intercambiar al CLIP por un péptido antigénico y finalmente el nuevo complejo viaja a la membrana celular para presentar el antígeno a un linfocito Th.

## Unión de péptidos al MHC

La identificación de las moléculas del MHC como las encargadas de la presentación de los antígenos a los linfocitos T ha hecho que diferentes investigadores de todo el mundo hayan canalizado sus investigaciones en el esclarecimiento de las bases moleculares de las interacciones de los complejos pMHC y las características de esos péptidos que le permiten la unión al MHC (Abbas *et al.*, 2003). Definir cada uno de los aspectos anteriores resulta muy importante no solo para enriquecer nuestro conocimiento en torno a la biología del reconocimiento antigénico del linfocito T, sino también para definir las propiedades que hacen que una proteína inmunogénica (Abbas *et al.*, 2003). Para esto, dicha debe contener péptidos que sean capaces de unirse al MHC de ese individuo. Esta información puede ser usada para el diseño de vacunas, pudiendo insertar esas secuencias de aminoácidos dentro de los antígenos empleados en la inmunización (Abbas *et al.*, 2003).

Se han empleado diferentes métodos para estudiar las interacciones de los péptidos antigénicos con moléculas del MHC:

1. Los primeros estudios se basaron en el desarrollo de ensayos funcionales de linfocitos T cooperadores o citotóxicos provenientes de ratones inmunizados reestimulándolos *in vitro* con una serie de péptidos sintéticos que abarcaban la totalidad de la secuencia del antígeno empleado en la inmunización de los ratones (Sette *et al.*, 1988).

2. Después de la purificación del MHC fue posible estudiar las interacciones de los complejos pMHC empleando soluciones de dichos péptidos marcados radiactivamente en ensayos de diálisis de equilibrio o filtración en gel (Buss *et al.*, 1986; Abbas *et al.*, 2003).

3. La naturaleza de los péptidos unidos al MHC generados *in vivo* fue esclarecida mediante el aislamiento de los complejos MHC-péptido por cromatografía de afinidad a partir de lisados de células presentadoras de antígeno pulsadas previamente con el antígeno de interés, posteriormente esos complejos se separaban por calor y ácido para finalmente secuenciar los péptidos eluidos mediante espectroscopia de masas (Demontz *et al.*, 1989; Rudensky *et al.*, 1991).

4. El análisis de los complejos pMHC mediante cristalografía de rayos X ha aportado información invaluable en el conocimiento de la posición y las características de los residuos peptídicos que interaccionan con el "nicho" de unión al antígeno del MHC (Scott *et al.*, 1998).

#### **Características de los péptidos unidos a I-A<sup>d</sup>**

El péptido contra el cual se evoca una respuesta de linfocitos T debe contener en su secuencia ciertos residuos con características específicas para su unión con el MHC así como otros residuos clave para su reconocimiento por el linfocito T (Sette *et al.*, 1988; Bartnes *et al.*, 1991).

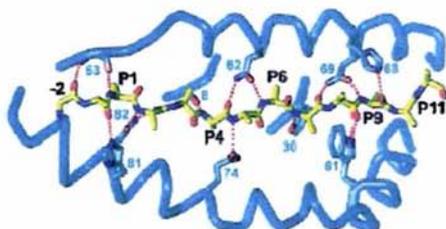
De manera general, las interacciones MHC-péptido presentan las características siguientes:

1. Cada molécula de MHC-I o II tiene un solo sitio de unión al antígeno, sin embargo éste es polimórfico, lo cual le permite interactuar con muchos péptidos diferentes.
2. Los péptidos que se unen al MHC tienen rasgos estructurales (residuos de anclaje) que le permiten esa interacción (Sette *et al.*, 1988; Bartnes *et al.*, 1997; Reizis *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1998; Tripp *et al.*, 2001), estas características difieren para cada alelo.
3. Las interacciones MHC-péptido son saturables, de baja afinidad (con una constante de disociación  $[K_d]$  cercana a  $10^{-6}$  M) con una baja velocidad de asociación y una muy baja velocidad de disociación (Abbas *et al.*, 2003).
4. Las moléculas del MHC de un individuo unen péptidos endógenos y extraños (Rudensky *et al.*, 1991).

Aunque el ratón BALB/c expresa los alelos de MHC-II, I-A<sup>d</sup> e I-E<sup>d</sup>. I-E<sup>d</sup> ha sido menos estudiado y aún no se han definido las posiciones de anclaje ni los aminoácidos involucrados en la unión a esta molécula de clase II, por lo que I-E<sup>d</sup> no fue abordada en esta tesis, sin embargo, no se descarta su análisis en futuros estudios, por lo que a partir de este momento nos enfocaremos exclusivamente a I-A<sup>d</sup>.

La resolución cristalográfica de la estructura molecular de I-A<sup>d</sup> complementada con diferentes trabajos previos permitieron dilucidar las características fundamentales que poseen los péptidos que interactúan con el sitio de unión al antígeno que posee esta molécula de clase II (Scott *et al.*, 1998), ver Figura 5. Estos trabajos han mostrado que los determinantes

antigénicos tienen una longitud que oscila entre 16 y 18 aminoácidos, de ellos los 9 residuos centrales están involucrados directamente tanto en la unión con I-A<sup>d</sup> como con el reconocimiento por el receptor de antígeno (TCR) del linfocito T CD4<sup>+</sup>. De ese núcleo nonamérico existen cuatro posiciones esenciales: la posición 1 (P1), P4, P6 y P9. En P1 se puede anclar cualquier aminoácido con cadena lateral, por lo cual la glicina es la única que no es útil por lo que la P1 se considera como degenerada; en P4 el residuo debe tener carácter alifático; en P6 el residuo debe ser alanina; en P9 pueden ser alanina o serina (Reizis *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1998).



**Figura 5. Vista superior de la molécula I-A<sup>d</sup> interactuando con un péptido antigénico.** Pueden apreciarse los puentes de hidrógeno (líneas punteadas en rojo) que establece el péptido con los residuos de la molécula de clase II. Nótese la indicación de las posiciones de anclaje (P1 a P9) críticas para la unión con I-A<sup>d</sup>. Modificado de Scott *et al.*, 1998.

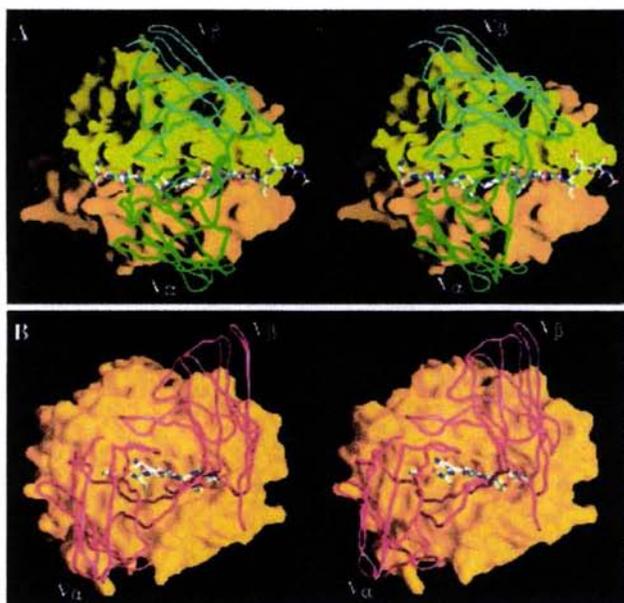
### **El receptor del linfocito T (TCR) y el reconocimiento antigénico**

Los estudios cristalográficos del receptor del linfocito T (TCR) han permitido conocer detalladamente las características estructurales de este receptor de antígeno (García *et al.*, 1999; Reinherz *et al.*, 1999). Gracias a estos datos sabemos que el TCR de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (cooperadores) y CD8<sup>+</sup>

(citotóxicos) es un heterodímero formado por dos cadenas polipépticas transmembranales llamadas  $\alpha$  (40-50 KDa) y  $\beta$  (35-47 KDa), éstas están unidas covalentemente por un puente disulfuro. Tanto la cadena  $\alpha$  como la  $\beta$  constan de dos dominios tipo inmunoglobulina, uno variable (en el extremo aminoterminal), y el otro constante, además poseen una región transmembranal hidrofóbica y una región citoplásmica corta (Abbas *et al.*, 2003). La estructura tridimensional del TCR asemeja al fragmento Fab (fragmento de unión al antígeno) de un anticuerpo de forma tal que cada cadena  $\alpha$  y  $\beta$  consta de un dominio canónico variable tipo inmunoglobulina (Ig) y uno constante. Al igual que en la molécula de Ig, las asas que unen las hojas  $\beta$  de los dominios variables de ambas cadenas ( $V\alpha$  y  $V\beta$ ) forman las regiones hipervariables conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDRs) que constituyen el sitio para el reconocimiento del complejo pMHC (Bjorkman 1997; García *et al.*, 1999; Reinherz *et al.*, 1999; Abbas *et al.*, 2003).

Los linfocitos T reconocen péptidos generados del procesamiento de proteínas propias o derivadas de agentes patógenos como virus, bacterias, hongos, células tumorales y parásitos, cuando éstos son presentados en el asociación con moléculas del MHC expresadas en la membrana plasmática de las APCs (Bjorkman 1997; Davis *et al.*, 2003). Este reconocimiento lo realizan a través de su TCR en combinación con el co-receptor CD8 cuando los péptidos son presentados por moléculas del MHC-I o bien, en combinación del co-receptor CD4 cuando los péptidos son presentados por moléculas del

MHC-II (García *et al.*, 1999; Davis *et al.*, 2003). Los estudios de 17 estructuras cristalográficas de TCRs intactos, supercomplejos TCR-pMHC y fragmentos del TCR o cadenas aisladas han confirmado que el TCR está estructuralmente relacionado con el fragmento Fab de un anticuerpo, su sitio de unión al pMHC esta formado por tres CDRs o asas de los dominios variables. Los dominios V $\alpha$  y V $\beta$  están restringidos a la unión del amino y carboxilo terminal del péptido respectivamente (Davis *et al.*, 2003). Los análisis cristalográficos del TCR interactuando con diferentes complejos pMHC tanto para clase I (pMHC-I) como para clase II indican que el reconocimiento antigénico se lleva a cabo de formas definidas, para los complejos pMHC-I el reconocimiento se realiza en forma diagonal en tanto que para los complejos pMHC-II el reconocimiento se efectúa en forma ortogonal ver Figura 6 (revisado en Bjorkman 1997; Reinherz *et al.*, 1999). Aunado a esos estudios, otros análisis cristalográficos del TCR en estado unido o no unido han permitido definir que las CDRs adoptan diferentes conformaciones, de ellas la CDR3 es la región que presenta los mayores cambios conformacionales. Esta flexibilidad conformacional puede ser la responsable del alto grado de promiscuidad o de reactividad cruzada evidenciada en el reconocimiento del complejo pMHC (Davis *et al.*, 2003). Los datos teóricos y experimentales sugieren que cada TCR puede reconocer 10<sup>5</sup> diferentes complejos de pMHC, permitiendo que el repertorio disponible de “especificidades” del TCR en un individuo sea mucho mayor que el repertorio de complejos pMHC que puedan ser presentados en dicho individuo (Davis *et al.*, 2003).



**Figura 6. Comparación de las formas de reconocimiento del TCR sobre los complejos pMHC clase I versus pMHC-II.** A) Modelaje estérico del reconocimiento de la región V $\alpha$ V $\beta$  TCR D10 restringido para el péptido de conalbúmina presentado en el contexto de la molécula de clase II I-A<sup>k</sup>. La cadena  $\alpha$  molécula I-A<sup>k</sup> es mostrada en color verde claro en tanto que la cadena  $\beta$  es mostrada en color naranja. El péptido es mostrado en formato de esferas y barras. La región variable (V) del TCR es mostrada en formato de diagrama de "gusano", con la cadena  $\alpha$  en color verde y la  $\beta$  en azul. B) Modelaje estérico del reconocimiento del TCR 2C restringido para el autopéptido denominado dEV8 presentado en el contexto de la molécula K<sup>b</sup>. La cadena pesada de la molécula K<sup>b</sup> es mostrada en amarillo. El péptido es mostrado en el mismo formato que en A. La región V es mostrada en formato de "gusano", con las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  en color rosa. (Modificado de Reinherz *et al.*, 1999).

### Los linfocitos T cooperadores (Th)

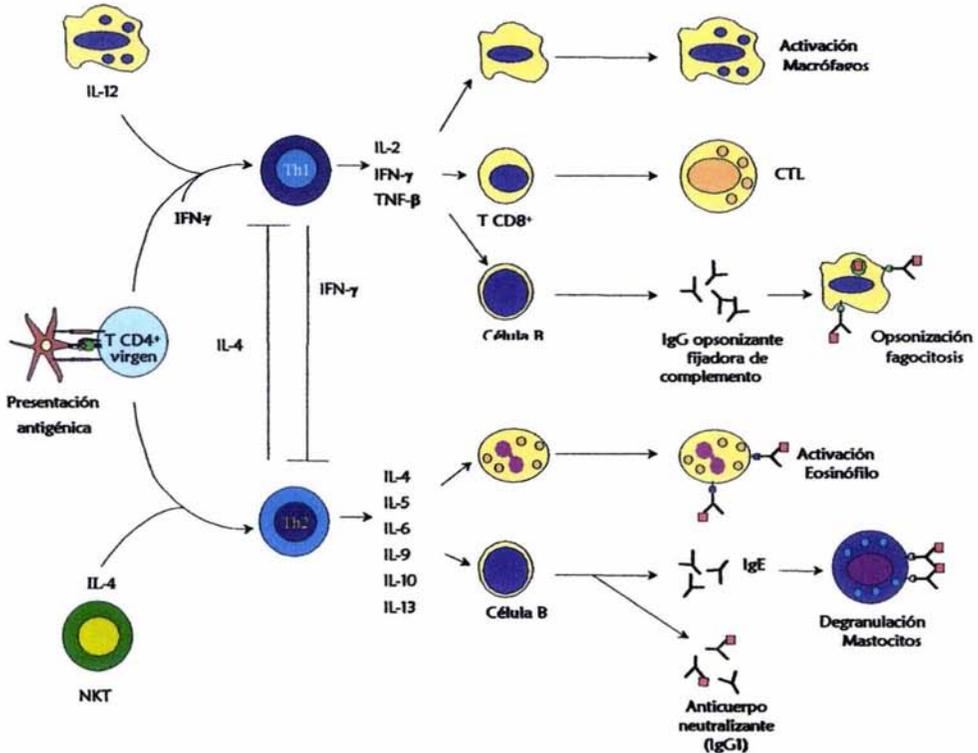
La fase de activación de los linfocitos T vírgenes CD4<sup>+</sup> o Th (del inglés "helper") está dada por el reconocimiento de determinantes antigénicos presentados por moléculas del MHC de clase II expresadas sobre APCs

profesionales, tales como células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. La especificidad de la respuesta inmune estimulada por estos linfocitos Th está dada por la expansión selectiva de las clonas capaces de reconocer dichos determinantes antigénicos y de diferenciarse en células efectoras que contribuyen a la protección del organismo contra diferentes agentes infecciosos. Las parasitosis humanas continúan siendo uno de los principales problemas de salud en el mundo. No obstante el gran esfuerzo invertido por diferentes grupos de investigación aún no se dispone de una vacuna comercial contra ninguna parasitosis humana. Lo cual apunta claramente al insuficiente entendimiento que se tiene acerca de los mecanismos inmunes protectores contra los parásitos, como también ilustra los sofisticados mecanismos de evasión inmune de los parásitos. Últimamente se han hecho avances muy importantes en el conocimiento de la respuesta inmune contra parásitos. Una de las observaciones clave del control o el favorecimiento de las parasitosis es la polarización de la respuesta inmune de los linfocitos Th en Th1 o Th2 (Pearce *et al.*, 1999). Esta clasificación se realizó de acuerdo al patrón de citocinas producidas por estas células (Figura 7) (Mossman *et al.*, 1986). Los linfocitos Th1 secretan interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ , también llamado linfotoxina  $\alpha$ ). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la producción de inmunoglobulina G subtipo 2a (IgG2a) en ratón. Por su parte, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, cooperando con la activación de linfocitos B y el cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción

de IgE e IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos), y promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos. Debido a estas funciones, el fenotipo Th2 se ha asociado con alergias. Existe otra subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que produce una mezcla de citocinas Th1/Th2 a la cual se le ha denominado Th0 (Reiner y Locksley 1993; Romagnani 1994; Abbas *et al.*, 1996; Constant y Bottomly 1997; O'Garra 1998).

Esta dicotomía de los linfocitos Th (Th1/Th2) se puso en evidencia en clones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón y posteriormente se demostró *in vivo* en ratones infectados con *Leishmania major* (Sher *et al.*, 1992; Pearce *et al.*, 1999).

En términos generales, la polarización de la respuesta inmune en Th1 o Th2 es más evidente en el caso de las parasitosis producidas por protozoarios o bien por nemátodos intestinales en donde abundan ejemplos ampliamente documentados (Pearce *et al.*, 1999). No es el caso para las parasitosis tisulares, dentro de las cuales *Schistosoma mansoni* ha sido ampliamente estudiado (Pearce *et al.*, 1999). El estudio inmunológico de parasitosis ocasionadas por céstodos de los géneros *Taenia* y *Echinococcus* se inició después. En la presente sección nos enfocaremos al conocimiento de la respuesta inmune en la cisticercosis experimental y humana.



**Figura 7. Polarización de las células Th.** Cuando un linfocito Th virgen reconoce un determinante antigénico en el contexto de moléculas del MHC-II puede diferenciarse en Th1 o Th2 dependiendo de las citocinas presentes en el microambiente. Esta polarización evoca diferentes respuestas efectoras sobre diferentes poblaciones celulares (modificado de López-Moreno 2002).

## Participación de los linfocitos Th en la cisticercosis

### Cisticercosis por *Taenia solium*

*Taenia solium* es uno de los céstodos de la familia *Taenidae* que pueden parasitar al ser humano. El ciclo de vida de esta especie requiere de dos hospederos para completarse. El estadio adulto se desarrolla

exclusivamente en el intestino delgado del ser humano (llamada teniasis), mientras que el metacéstodo puede desarrollarse tanto en el cerdo (hospedero intermediario), como en el ser humano (hospedero accidental), produciendo una infección conocida como cisticercosis. La fase embrionaria, u oncosfera, es la única que puede subsistir en el ambiente (ver Figura 8).

El ciclo vital de *T. solium* inicia cuando un individuo ingiere carne de cerdo insuficientemente cocida e infectada con cisticercos. Cuando los cisticercos entran en contacto con las enzimas digestivas y con el pH ácido que impera en el tracto digestivo, evaginan, su excólex u órgano de fijación se ancla firmemente en la pared del intestino delgado mediante una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. A partir del escólex se desarrolla una larga cadena de proglótidos (o segmentos) conocidos como estróbilo. Los proglótidos se diferencian en tres tipos de acuerdo a su grado de maduración: los más próximos al escólex son proglótidos inmaduros, los ubicados en la parte media son proglótidos maduros y los distales son los proglótidos grávidos, en cada uno de los cuales se alojan cientos de miles de huevecillos. Cuando un individuo infectado defeca al aire libre, elimina huevecillos o proglótidos grávidos con las heces, favoreciendo la posibilidad de que éstos sean ingeridos por un cerdo. Las enzimas digestivas y sales biliares del hospedero intermediario liberan a la oncosfera protegida por el huevecillo, la cual penetra la pared intestinal y alcanza los capilares linfáticos y sanguíneos que la conducen a una gran variedad de órganos y tejidos (como son el tejido subcutáneo, el músculo esquelético, el cerebro y

los ojos), en donde se desarrolla hasta convertirse en cisticerco o metacéstodo. El ciclo se completa cuando un individuo ingiere cisticercos viables al consumir carne de cerdo parasitada. En la Figura 8 se observa un esquema del ciclo vital de *T. solium*.

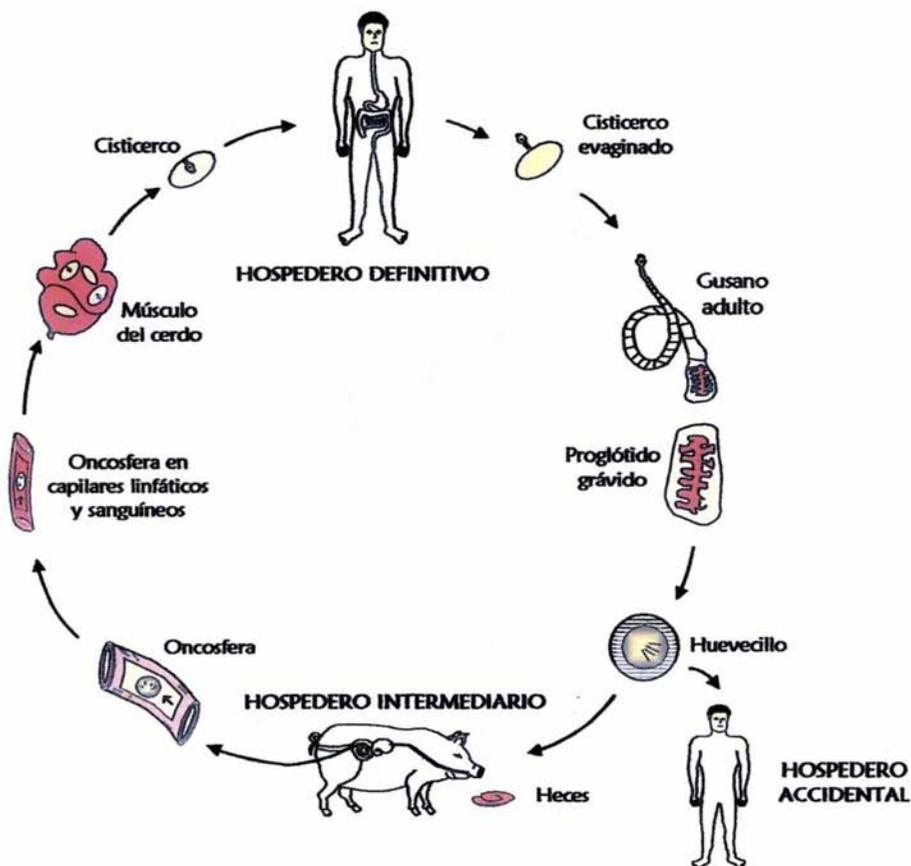


Figura 8. Ciclo vital de *Taenia solium*. El ciclo inicia cuando un humano que alberga en su intestino a la forma adulta de *T. solium* libera proglótidos grávidos o huevecillos en su materia fecal, si estos son ingeridos por un cerdo (el hospedero intermediario), sus jugos gástricos permiten la liberación de la oncosfera, la cual atraviesa la pared intestinal para alcanzar la circulación sistémica pudiéndose implantar en cualquier órgano o tejido del cerdo (principalmente en el músculo), desarrollándose en cisticerco y cuando otro individuo ingiere carne de cerdo con cisticercos viables, éstos evaginan en el intestino donde se implantan gracias a sus estructuras de fijación formadas por cuatro ventosas y una doble corona de ganchos, ello le permite proveerse de los nutrientes necesarios para completar su

desarrollo a tenia adulta cerrando el ciclo en el hospedero definitivo. Alternativamente el humano puede fungir como hospedero intermediario accidental al ingerir agua o alimentos contaminados con huevecillos de *T. solium*. (Modificado de López-Moreno 2002).

### Cisticercosis experimental

Los principales modelos experimentales empleados para el estudio de la cisticercosis son *T. taeniaeformis* en rata y ratón, y *T. crassiceps* en ratón. Otro modelo que también ha sido empleado es el de *T. pisiformis* en conejo, sin embargo este último modelo tiene desventajas, ya que es substancialmente más caro y no ofrece la homogeneidad genética que proporcionan las cepas de roedores (Williams *et al.*, 1982).

El modelo de cisticercosis por *T. taeniaeformis*, asemeja en mucho a la infección natural. En este modelo se observó que la destrucción del estadio oncosferral del parásito, lo que previene el desarrollo de los cisticercos, está mediada principalmente por anticuerpos del subtipo IgG2a y complemento (Leid y Williams 1974; Williams *et al.*, 1982; Mitchell 1982). Además, esta resistencia puede ser transferida pasivamente a roedores receptores (Leid y Williams 1974). Debido a dificultades metodológicas con el modelo de *T. taeniaeformis*, actualmente el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* en ratón es el más empleado para estudiar la participación de los linfocitos Th en esta parasitosis (Bojalil *et al.*, 1993; Villa y Kuhn 1996; Robinson *et al.*, 1997; Terrazas *et al.*, 1998; Terrazas *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999b; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). La importancia de la respuesta inmune timo-dependiente se puso en evidencia al infectar ratones BALB/c

timectomizados con cisticercos de *T. crassiceps* observándose un gran incremento en la carga parasitaria con respecto a ratones testigo (Bojalil *et al.*, 1993). Estos resultados sugirieron la importancia de los linfocitos Th para limitar el desarrollo del cisticerco de *T. crassiceps*.

Diversos estudios se han orientado a caracterizar el fenotipo de la respuesta inmune Th1/Th2 con base en los perfiles de citocinas (Villa y Kuhn 1996; Robinson *et al.*, 1997; Terrazas *et al.*, 1998; Terrazas *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999b). En las etapas tempranas de esta infección experimental, alrededor de la primera semana postinfección (p.i.), el tipo de respuesta inmune predominante es Th1, la cual está asociada con un desarrollo limitado del parásito (Robinson *et al.*, 1997; Terrazas *et al.*, 1998). A medida que la infección progresa, la respuesta inmune se polariza hacia un fenotipo Th2 con un incremento concomitante en la carga parasitaria (Terrazas *et al.*, 1998). A la fecha no se conocen con detalle los mecanismos que modulan el cambio en la subpoblación predominante; sin embargo se postula que tanto factores del hospedero como del parásito podrían jugar un papel relevante. Lo anterior quedó confirmado por Terrazas *et al.*, en 1998, quienes demostraron que al tratar ratones infectados con IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes o con anticuerpos anti-IL-10, se incrementaba la resistencia a la parasitosis a las 4 semanas p.i. ya que el número de cisticercos disminuía significativamente (Terrazas *et al.*, 1999). En analogía con lo que se ha descrito para *Schistosoma*, en donde el cambio de

Th1 a Th2 modula la progresión de los granulomas, Robinson *et al.*, en 1997 proponen que la respuesta Th1 pudiera jugar un papel muy importante tanto en la patogénesis de la enfermedad como en la destrucción inicial del parásito. Toenjes *et al.*, en 1999 detectaron un incremento en la población de linfocitos T<sub>H</sub>1 en los exudados peritoneales de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* a partir de los 10 días p.i., lo que condujo a estos autores a pensar que esta población de linfocitos T podría tener un papel relevante en la cisticercosis por *T. crassiceps*. Sin embargo, cuando estos autores probaron su hipótesis empleando ratones deficientes para la cadena  $\delta$ , esta idea quedó descartada ya que al evaluar los niveles séricos de las citocinas de las subpoblaciones Th (IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) así como el grado de carga parasitaria no se encontraron diferencias con respecto a los ratones de tipo silvestre. Lo anterior sugiere que esta población de linfocitos T no participa en la inmunidad contra el metacéstodo (Toenjes *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999b).

Cardona *et al.*, 1999 describieron un nuevo modelo de cisticercosis experimental para estudiar la neurocisticercosis (NC). Este modelo se basó en la infección intracraneal de ratones BALB/c con el metacéstodo del parásito *Mesocestoides corti*. Mediante cinéticas p.i. Cardona *et al.*, evaluaron la distribución del metacéstodo en el cerebro de los ratones infectados, las poblaciones celulares del sistema inmune presentes en el cerebro de estos ratones, así como los perfiles de citocinas que predominaban. Los resultados

mostraron que a partir de la tercera semana p.i. más del 50% de los metacéstodos se localizaban en el parénquima. En tanto que, a partir de la primera semana p.i., la población de linfocitos T que predominaba en la región extraparenquimal o parenquimal, era del fenotipo T $\gamma\delta$ , cuyo repertorio está constituido predominantemente por V $\delta$ 4, V $\gamma$ 4 y V $\delta$ 6.3. De acuerdo con el perfil de citocinas a partir de la primer semana p.i. el fenotipo predominante fue Th1, siendo esto más claro en la región extraparenquimal, donde se detectaron IL-2, IL-12, IL-15 e IFN- $\gamma$  mientras que solo fueron detectados IL-12 e IFN- $\gamma$  en el parénquima aunque en menor proporción. A diferencia de lo que ocurre en el peritoneo, en este modelo predominaron los linfocitos T $\gamma\delta$ ; no obstante, los autores no van más allá de la simple descripción de sus datos y omiten mencionar la integridad o el daño de los metacéstodos. Esta información podría ser complementada realizando estudios en ratones deficientes de linfocitos T $\gamma\delta$  (Cardona *et al.*, 1999).

Recientemente Rodríguez-Sosa y sus colaboradores confirmaron que la respuesta Th1 participaba en el control parcial de la cisticercosis experimental (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). Estos autores emplearon ratones deficientes en el factor de transcripción STAT6, el cual está involucrado en la transcripción del gen de la IL-4, por lo que en estos ratones el fenotipo Th que predomina es Th1. En forma específica sus datos muestran una disminución de la carga parasitaria asociada con altos niveles de IgG2a. Sin embargo, en ese trabajo tampoco se identifica algún determinante antigénico

derivado del cisticerco que esté involucrado en la generación de dicha respuesta Th.

#### Cisticercosis humana

Los datos que se tienen sobre la respuesta inmune celular en cisticercosis humana son escasos.

Del Brutto *et al.*, en 1991 tipificaron el patrón genético de HLA en un grupo de pacientes mexicanos mestizos con NC. Una de las diferencias más notables fue que los pacientes tenían una baja frecuencia del alelo DQw2 con respecto al grupo testigo (4.2% contra 31.7%) (Del Brutto *et al.*, 1991). Ostrosky-Zeichner *et al.*, en 1996 encontraron que las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 estaban aumentadas en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con NC con respecto al grupo testigo, lo cual no es sorprendente ya que solo estudiaron formas activas de NC (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 1996). Por su parte, Evans *et al.*, en 1998 encontraron un aumento en los niveles de IL-5 en LCR de pacientes con NC comparado con el grupo testigo. El incremento de esta citocina en los pacientes sugiere que, al igual que en la cisticercosis experimental, el fenotipo Th2 está relacionado con el establecimiento de la enfermedad (Evans *et al.*, 1998). Restrepo *et al.*, en 1998 reportaron que la respuesta de linfocitos Th en pacientes con NC podría ser Th1. Estos resultados deben tomarse con reserva, ya que de los 4 pacientes incluidos en el estudio, solamente a uno de ellos se le realizó el análisis de las citocinas de ambos

fenotipos (Restrepo *et al.*, 1998). Recientemente Grewal *et al.*, publicaron un análisis de la respuesta Th en pacientes con NC utilizando células mononucleares de sangre periférica, no obstante que los autores proponen que la respuesta inmune está polarizada hacia Th1 sus datos no son muy contundentes, ya que las concentraciones de las citocinas que evaluaron, (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) en 15 pacientes con NC, son muy similares a las obtenidas con el grupo testigo (Grewal *et al.*, 2000).

Medina-Escutia *et al.*, en un estudio de casos-testigos compararon las poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, los cocientes de CD4/CD8, los índices de proliferación y la presencia de los mRNA de IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- $\gamma$  empleando 37 muestras de sangre periférica de los pacientes y de los testigos. Sus resultados muestran diferencias en la respuesta antígeno-específica, pero no encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de los parámetros evaluados. Es importante señalar que los pacientes no habían recibido tratamiento alguno (cestocida e inmunosupresor) al momento de la toma de las muestras por lo que los resultados obtenidos serían un reflejo más fiel del fenotipo Th predominante en la cisticercosis. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas, lo cual sugiere un equilibrio hospedero-parásito (Medina-Escutia *et al.*, 2001).

Recientemente Chavarría *et al.*, 2003 reportaron que en la cisticercosis humana asintomática el perfil de citocinas correspondía a Th2 para ello, reestimularon células mononucleares aisladas de sangre periférica de pacientes no tratados y testigos con la fracción soluble de un extracto

crudo de cisticercos de *T. solium*. Sus resultados muestran un incremento de IL-4, IL-5, e IL-13 en el grupo de los pacientes comparado con el grupo testigo. Es importante señalar que los pacientes estudiados tenían calcificaciones y de acuerdo con la evidencia indirecta reportada previamente en la cisticercosis porcina, la calcificación de los metacéstodos se desarrolla posterior una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos posiblemente activados mediante IFN- $\gamma$  y TNF, es decir, un perfil Th1. Posterior a este evento el organismo tendería a la homeostasis, por lo que suponemos que se incrementarían los niveles de las citocinas que controlan esta respuesta, o sea del tipo Th2. En este contexto los resultados obtenidos por estos autores serían los esperados (Chavarría *et al.*, 2003).

### La paramiosina de *Taenia solium*

Flisser *et al.*, en 1980, definieron que la IgG era la clase predominante en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con NC. Ellos también identificaron un antígeno inmunodominante contra el cual, el 85% de los pacientes tenían anticuerpos específicos. A ese antígeno le denominaron antígeno "B" (AgB), de acuerdo con su movilidad inmunoelectroforética (Flisser *et al.*, 1980). Posteriormente mediante ELISA se confirmó su carácter inmunodominante empleando muestras de suero y LCR de pacientes. Los resultados de estos experimentos mostraron una positividad del 73% en sueros y 85% en LCR (Espinoza *et al.*, 1986). A fin de conocer su localización en el metacéstodo se realizó un estudio histoquímico

donde se determinó que el AgB es sintetizado por los citones tegumentarios y excretado a través de la membrana tegumentaria al interior de los tejidos del hospedero (Laclette *et al.*, 1987). El AgB fue purificado inicialmente por procedimientos bioquímicos (Guerra *et al.*, 1982), y posteriormente con mayor eficiencia aprovechando su afinidad por la colágena, lo que permitió obtener altas concentraciones de AgB (Laclette *et al.*, 1990). Gracias a ello, se caracterizó al AgB como una proteína de 100KDa con un contenido de aminoácidos típico de una proteína  $\alpha$ -hélice (Guerra *et al.*, 1982; Landa *et al.*, 1993), conservada en otros platelmintos (Olivo *et al.*, 1988). En un estudio comparativo entre el AgB y la paramiosina del trematodo *Schistosoma mansoni* se encontró una identidad del 75% en la secuencia de ambas proteínas (Landa *et al.*, 1993) definiendo al AgB como la paramiosina de *T. solium* (TPmy) (Laclette *et al.*, 1991). Por lo que a partir de este momento en esta tesis solo se citará como TPmy. En la actualidad se conoce completamente su secuencia de aminoácidos, de la cual, el 95% mantiene el patrón característico de las paramiosinas y otras proteínas con estructura de  $\alpha$ -hélice. Esta estructura expone residuos hidrofóbicos que favorecen la formación homodimérica de una proteína superenrollada. Solamente 15 residuos de la región amino terminal y 20 residuos la región carboxilo terminal siguen otro patrón. Posteriormente se clonó como proteína recombinante en *Escherichia coli* (rTPmy), permitiendo obtener antígeno puro, el cual se ha demostrado que conserva las funciones de la TPmy nativa:

su afinidad a colágena, su capacidad de inhibir al C1q y su capacidad de reaccionar con anticuerpos humanos y de ratones (Landa *et al.*, 1993). También se pueden obtener por expresión recombinante, tres fragmentos de este antígeno: uno que contiene al amino terminal (VW 2-1), otro que corresponde a la región central (VW 3-3) y un tercero que contiene al carboxilo terminal (VW 4-1) (Vázquez-Talavera *et al.*, 2001). Recientemente se reportó un estudio del gene de la TPmy donde se definió que estaba formado por 14 exones y 13 intrones a lo largo de 6,106 pb (Vargas-Parada y Laclette 2003).

Se ha demostrado que la TPmy inhibe la vía clásica del complemento *in vitro*, al unirse a la parte colagénica del C1q impidiendo el ensamblaje de C1r y C1s (Laclette *et al.* 1992). La habilidad de la TPmy para inhibir al C1 e impedir la producción de las anafilotoxinas generadas por la cascada del complemento, en especial C5a (Laclette *et al.* 1989), así como su inmunogenicidad y afinidad a la colágena del hospedero, pueden modular la respuesta inmune, sugiriendo que la TPmy ejerce un efecto de cortina de humo al desviar la respuesta humoral del hospedero.

Vázquez-Talavera *et al.*, reportaron que la respuesta linfoproliferativa de los pacientes con neurocisticercosis estaba dirigida principalmente contra el tercio amino-terminal (VW 2-1) en tanto que la respuesta humoral se centraba en el tercio carboxilo-terminal (VW 4-1) (Vázquez-Talavera *et al.*, 2001).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen varias evidencias que destacan el papel de los linfocitos Th en el establecimiento o en la disminución de la susceptibilidad a la cisticercosis, sin embargo a la fecha no se ha identificado ningún determinante antigénico derivado de algún antígeno del cisticerco que contribuya al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que se evocan en una respuesta inmune que ayude a eliminar al parásito o bien que favorezca su establecimiento.

La TPmy es el antígeno mejor caracterizado en céstodos, y es uno de los antígenos más prominentes del cisticerco por su carácter inmunodominante para la respuesta humoral así como por su capacidad para inducir la activación de linfocitos T en ratones inmunizados. Además, la TPmy está disponible como producto recombinante, lo cual abre la posibilidad de identificar los determinantes antigénicos que son presentados en el contexto del MHC-II que estimulen la proliferación específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y con ello incrementar nuestro conocimiento en torno a los mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la cisticercosis.

## **OBJETIVO**

Identificar los determinantes antigénicos para linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la paramiosina de *Taenia solium* que son presentados por I-A<sup>d</sup>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Producción y purificación de la rTP<sub>my</sub>

#### Expresión de la rTP<sub>my</sub>

La rTP<sub>my</sub> fue producida en un sistema de expresión bacteriano en *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pRSETB (Invitrogen™), en el cual fue insertado el cDNA que codifica para la TP<sub>my</sub> fusionada a un dominio de unión a metales (Vázquez-Talavera *et al.*, 2001). Para la transcripción de este gen fue requerida la RNA polimerasa T7 presente en la cepa bacteriana empleada, el gen de ésta está regulada por el promotor *lacZ* inducible por isopropil-thio-galactopiranosido (IPTG). A partir del momento de la inducción y cada 2 horas durante un espacio de 6, fue tomada una fracción de 1mL, esto con la finalidad de evaluar la cinética de la expresión de esta proteína recombinante (ver Figura 9). Los botones bacterianos de las fracciones colectadas fueron aislados por centrifugación; cada botón fue lisado por choque térmico; las muestras fueron resuspendidas en tampón de Laemmli. Finalmente fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras.

#### Purificación de la rTP<sub>my</sub>

Después de haber evaluado la cinética de expresión de la rTP<sub>my</sub> (Figura 9), el siguiente paso para la purificación de esta proteína, fue aislar los cuerpos de inclusión donde se acumula de forma insoluble (Landa *et al.*,

1993). El botón bacteriano fue colectado por centrifugación a 4000xg durante 10min. Las células recibieron un tratamiento hipotónico con H<sub>2</sub>O; fueron centrifugadas a 8000xg durante 10min para obtener el botón, el cual fue resuspendido en tampón P (PBS, leupeptina 1µg/mL, PMSF 0.5mM, 0.7mM de pepstatina A) y sonicado 3 veces durante 30 segundos a 50 W; a la muestra se le adicionaron 1500U de DNAasa I y RNAasa II para incubarse a temperatura ambiente durante 10min; al término de la incubación la muestra fue centrifugada a 13,000xg durante 10min; el botón obtenido fue resuspendido en tampón W (PBS, 25% de sacarosa y 1% de Tritón X-100) para someterse a 3 ciclos de resuspensión-centrifugación con este tampón. Finalmente el botón obtenido (cuerpos de inclusión) fue solubilizado en un tampón D (50mM Tris-HCl/pH 8.0 y cloruro de guanidina 5M) (Kane y Hartley, 1988). Una vez que los cuerpos de inclusión fueron solubilizados se procedió a purificar la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a metales, aprovechando que la rTPmy está fusionada a un péptido con seis histidinas que le confiere esta propiedad.

Con una fracción de la proteína eluida de la columna de afinidad fue evaluada su pureza mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% v/v teñido con azul de Commassie (ver Figura 10).

### **Predicción de los determinantes antigénicos**

Los determinantes antigénicos que se unen a las moléculas del MHC-II (o MHC-I) deben cumplir con características clave para una eficiente

interacción con el sitio de unión al antígeno del MHC. Estas características se han definido con base en la secuenciación de los determinantes antigénicos eluidos del MHC y se han complementado con los estudios de cristalografía de tales moléculas. Ello ha permitido conocer la longitud de los determinantes así como también ha permitido identificar aminoácidos críticos en posiciones específicas para el “anclaje” con la molécula del MHC en estudio. En el caso de la molécula de clase II, I-A<sup>d</sup> las posiciones de anclaje son la posición 1 (P1), P4, P6 y P9. En la P1 el determinante antigénico puede tener cualquier aminoácido distinto de glicina (G); en la P4 puede ser cualquier aminoácido con cadena lateral alifática; la P6 debe ser alanina (A) al igual que en la P9, alternativamente en la P9 se puede anclar una serina (S) y la longitud fluctúa entre 16 y 18 residuos. En este contexto, analizamos la secuencia de la TPmy y encontramos 5 heptadecapéptidos como posibles determinantes antigénicos con las posiciones de anclaje para I-A<sup>d</sup> (ver Cuadro 1). Posteriormente se sintetizaron los péptidos en un sintetizador automático modelo de Applied Biosystem mediante el sistema de fase sólida f-moc (fluoroenil metóxi carbonilo). Cada péptido fue desprendido de la resina y los aminoácidos fueron desprotegidos de acuerdo con las instrucciones sugeridas por el fabricante (PE<sup>TM</sup>) para finalmente conservarse liofilizados hasta su uso.

### **Inmunización de ratones**

En todos los experimentos se emplearon ratones BALB/cJ hembras de 6

a 8 semanas de edad. Cada ratón fue inmunizado intraperitonealmente con 25µg de TPmy por ratón emulsificados en adyuvante completo de Freund (CFA) en la primera dosis; en tanto que en la segunda y tercera dosis la TPmy se emulsificó en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Cada dosis se administró con un intervalo de 10 días. Alternativamente diferentes ratones fueron inmunizados subcutáneamente en la base de la cola con 100µg de alguno de los péptidos sintéticos emulsificados en CFA de acuerdo con Kuchroo *et al.*, 1995.

## ELISA

La respuesta humoral de los ratones inmunizados con TPmy fue evaluada de mediante ELISA de acuerdo con el siguiente esquema: Las placas de ELISA (Labsystem) fueron sensibilizadas con 100µL/pozo de una solución de 2µg/mL de TPmy (o rTPmy) resuspendidos en tampón de carbonatos (25mM) pH 9.5 a 37°C durante 1h. Una vez concluido el periodo de incubación, las placas fueron lavadas tres veces con PBS suplementado con Tween 20 al 0.05% v/v (PBS-T), posteriormente los pozos se bloquearon con 200µL de una solución de leche descremada al 5% p/v disuelta en PBS-T durante 1h a 37°C. Al término del bloqueo las placas se lavaron 3 veces como se describió arriba. Posteriormente las placas se incubaron 1h a 37°C con diferentes diluciones de suero de ratón preinmune o inmune. Las placas fueron lavadas al término de la incubación. La reacción antigénica fue amplificada por una incubación de 1h a 37°C con una anti-IgG de ratón

(Zymed) producida en cabra acoplada a peroxidasa diluida 1:20,000 en PBS-T. Una vez concluida la incubación, las placas fueron lavadas y la reacción fue revelada con una solución de 2mM de *o*-fenilendiamina más  $3 \times 10^{-4}$  % v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disueltos en tampón de citratos 100mM pH 5.6. Finalmente, la reacción se paró con 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5M. Las muestras se leyeron a 492nm en un lector de placas de ELISA.

### Western blot

Aproximadamente 30µg de TPmy fueron separados en un gel preparativo de poliacrilamida al 10% v/v y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.2µm, posteriormente la membrana se bloqueó con una solución de leche descremada al 5% p/v en PBS-T y después segmentada en tiras de aproximadamente 0.4cm de ancho. Algunas tiras fueron incubadas durante 1h a 37C con suero de ratón preinmune y otras con suero inmune diluido 1:1000 en PBS-T. Al finalizar la incubación, las tiras fueron lavadas 3 veces con PBS-T. Después las tiras se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa diluido 1:10000 en PBS-T. Finalmente las tiras fueron lavadas y las bandas se pusieron de manifiesto empleando una solución al 350µM de diaminobencidina más  $3 \times 10^{-4}$  % v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disueltos en PBS, la reacción fue detenida mediante la adición de agua corriente.

## **Ensayo de proliferación celular**

Los esplenocitos o gangliocitos de los poplíteos provenientes de ratones inmunizados o no inmunizados con TP<sub>my</sub> o Tps fueron colocados en pozos de placas de cultivo de 96 pozos (Nunc) de fondo plano en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (HyClone), aminoácidos no esenciales (Gibco), gentamicina (Sigma) 40µg/mL y 50µM de β-mercaptoetanol (Sigma). Posteriormente los cultivos fueron estimulados durante 72h (a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>), con TP<sub>my</sub> (10µg/mL) o con alguno de los Tps (1µg/mL). Dieciocho horas antes de concluido el periodo de incubación, a cada pozo se le adicionó 1µCi de timidina tritiada. Al terminar la incubación las células fueron cosechadas en papel de fibra de vidrio (ICN) empleando un cosechador automático (Skatron). Las membranas fueron colocadas en viales especiales a los cuales se les adicionaron 5mL de líquido de centelleo para posteriormente leerse en un contador de radioactividad-β y determinar la respuesta proliferativa mediante cuentas por minuto (c.p.m).

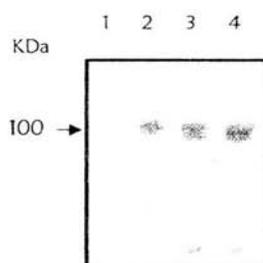
## **División antígeno-específica de linfocitos Th**

Cincuenta millones de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados o no inmunizados fueron marcados con 1mM del fluorocromo 5, 6 Carboxi-Fluoresceín-Succinimidil-Éster (CFSE) (Molecular Probes) durante 10min en 1mL de PBS sin suero fetal bovino (Lyons y Parish 1994), posteriormente las células fueron colocadas en botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> en 5mL de medio DMEM (suplementado como se mencionó arriba), y restimuladas con TP<sub>my</sub> o con

alguno de los Tps durante 72h, al finalizar este periodo, las células fueron triplemente teñidas con anti-CD4 (diluido 1:100) de ratón conjugado a ficoeritrina (PE), más anti-CD3 conjugado con alofococianina (APC) más anti-CD44 conjugado a cycrom (Cy). Se registraron, o adquirieron, 10<sup>6</sup> células/muestra en un FACSCalibur (Becton Dickinson), posteriormente las muestras se analizaron con el software WinMidi versión 2.8.

## RESULTADOS

Una vez que el cultivo de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pRSETB-TP<sub>my</sub> alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.6 a 600nm, se indujo la expresión de la TP<sub>my</sub> con isopropil-tio-galactopiranosido (IPTG) de acuerdo a lo descrito en Material y Métodos. La cinética de inducción de la rTP<sub>my</sub> fue evaluada electroforéticamente mediante geles de poliacrilamida. Los resultados obtenidos indican que a partir de las 2h de iniciada la inducción ya es posible observar la presencia de una banda prominente de 100KDa correspondiente al peso de la rTP<sub>my</sub>, la cual no se observa antes de iniciar la inducción de esta proteína recombinante. La rTP<sub>my</sub> alcanza su máxima expresión a las 6h (Figura 9). Empleando periodos de incubación mayores a 6h no fue posible incrementar los niveles de inducción posiblemente debido al agotamiento de los inductores o más probablemente al agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo; o bien, debido a un acumulo de proteína recombinante en el citoplasma que conduciría a la lisis bacteriana.

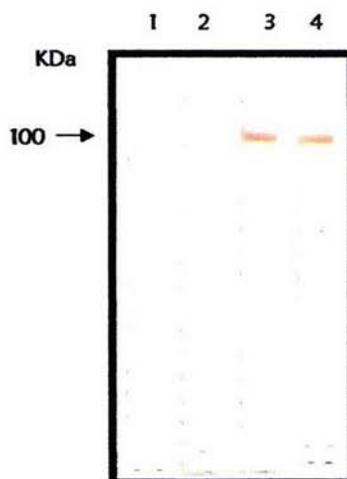


**Figura 9. Cinética de la expresión de la rTP<sub>my</sub>.** Gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie donde se observa en la línea 1) fracción colectada antes del inicio de la inducción; línea 2) fracción colectada a las 2 horas; línea 3) fracción colectada a las 4 horas; línea 4) fracción colectada a las 6 horas de la inducción.

Después de evaluar la inducción de la rTPmy se procedió a su purificación, a partir del aislamiento y solubilización de los cuerpos de inclusión. Finalmente se obtuvo la rTPmy pura mediante cromatografía de afinidad a metales aprovechando un segmento de 6 histidinas presentes en la región aminoterminal de la rTPmy que le confiere una fuerte afinidad a Ni. La pureza de la rTPmy fue evaluada mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% v/v, donde se observa solamente una banda de 100KDa, cuyo peso molecular corresponde al reportado para la TPmy (Figura 10). Finalmente confirmamos mediante Western blot que la proteína de 100KDa que obtuvimos como producto recombinante a partir de los cuerpos de inclusión bacterianos efectivamente se trataba de la rTPmy, para ello comparamos sueros de ratones inmunizados con nuestra rTPmy y los comparamos con un suero policlonal de ratón anti-TPmy. Los resultados muestran una fuerte reactividad cruzada del suero anti-TPmy con nuestro antígeno de 100KDa (línea 4 de la Figura 11) indicando que se trata de la rTPmy.



**Figura 10. rTPmy pura.** La tinción con azul de Coomassie sobre un gel de poliacrilamida al 10%, muestra una sola banda proteica de 100 KDa correspondiente al peso de la rTPmy (flecha).



**Figura 11. Identificación inmune de la TPmy.** Western blot donde se confirma que la identidad de la proteína de 100 KDa purificada corresponde a TPmy. Línea 1) testigo (-), PBS; línea 2) suero de ratón preinmune; línea 3) suero de ratón inmune; línea 4) testigo (+) suero policlonal anti-TPmy. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Una vez confirmada la identidad de la rTPmy se empleó en la inmunización de otros grupos de ratones BALB/c a fin de poder evaluar la respuesta linfoproliferativa evocada por éste antígeno. Para definir el momento en que debíamos sacrificar a los ratones evaluamos su respuesta humoral, específicamente medimos los niveles de IgG anti-TPmy mediante ELISA como un marcador indirecto de la activación de linfocitos Th que contribuirían al cambio de isotipo mediante la interacción antígeno-específica y de los correceptores CD40-CD154 (Figura 12). Los resultados muestran que los ratones inmunizados tuvieron una fuerte respuesta de IgG anti-TPmy como se muestra por una reacción positiva (D.O. de 0.8) en una dilución sérica de 1:16,000 (Figura 12), lo cual sugiere que efectivamente se llevaron a cabo tanto el procesamiento como la presentación antigénica que condujo a la activación de linfocitos Th (Figura 13). No obstante esa evidencia indirecta, era necesario demostrar la generación de una respuesta efectora de linfocitos Th. Para ello primeramente realizamos ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada tendientes a definir la concentración óptima de TPmy que utilizaríamos en futuros ensayos; para ello realizamos curvas dosis-respuesta a partir de las cuales pudimos definir que la concentración de TPmy que induce una mayor linfoproliferación fue la de 10 $\mu$ g/mL como se observa en la Figura 13.

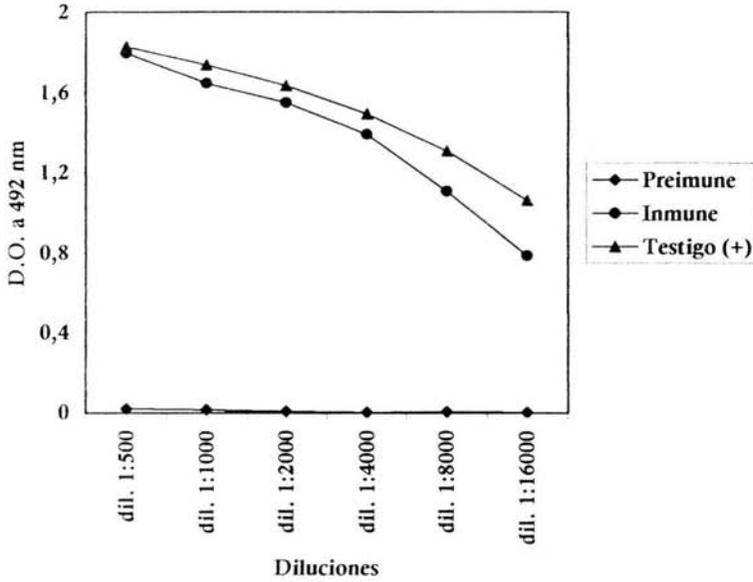


Figura 12. Evaluación de la respuesta humoral anti-TPmy. Los niveles séricos de IgG anti-rTPmy presentes en los sueros de los ratones inmunizados y no inmunizados fueron evaluados por ELISA. Los sueros problema y testigos se emplearon en una dilución inicial de 1:500. Como testigo (+) se empleó un suero policlonal anti-TPmy. Este resultado es representativo de al menos siete experimentos independientes.

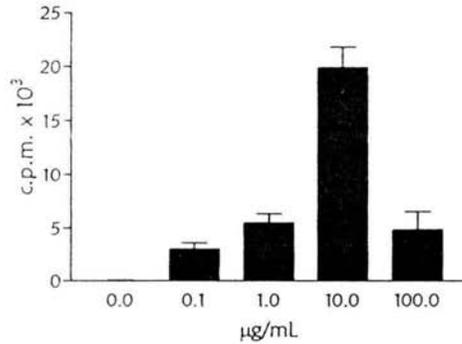


Figura 13. Curva dosis-respuesta de la TPmy. Ensayo de linfoproliferación por incorporación de timidina tritiada.  $4 \times 10^5$  esplenocitos/pozo provenientes de ratones BALB/c inmunizados con TPmy fueron colocados por triplicado en placas de 96 pozos con diferentes concentraciones de antígeno e incubados durante 72h a 37 C, 18h antes de que concluyera el periodo de incubación se le adicionó a cada pozo 10Ci de timidina tritiada. Las barras representan el promedio de triplicados y en cada una de ellas se indica la desviación estándar. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

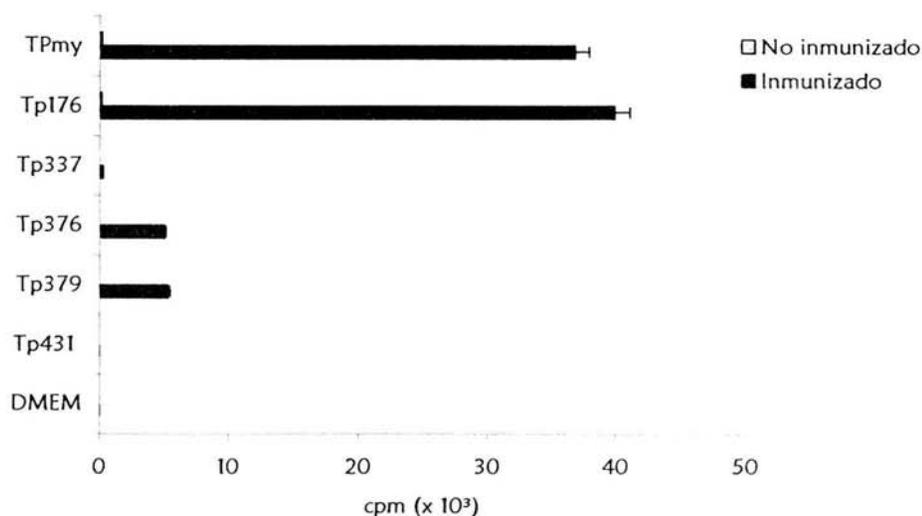
Una vez estandarizadas las condiciones de cultivo y concentraciones antigénicas para los ensayos de linfoproliferación, el siguiente paso fue realizar una predicción de los posibles determinantes antigénicos derivados de la TPmy. Para ello se realizó un análisis visual comparativo de la estructura primaria de la TPmy buscando los sitios de anclaje para la molécula I-A<sup>d</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 1. Posteriormente a su identificación, los 5 heptadecapéptidos (llamados Tp176; Tp337; Tp376; Tp379 y Tp441 respectivamente), fueron sintetizados y almacenados en forma liofilizada hasta su uso.

**Cuadro 1. Alineamiento de los cinco heptadecapéptidos derivados de TPmy con potencial de unión a I-A<sup>d</sup>.**

Posición	Secuencia																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9								
						A		A/S									
176-192	D	D	L	Q	R	Q	M	A	D	A	N	S	A	K	S	R	L
337-353	I	K	D	L	Q	A	E	N	E	A	L	A	A	E	N	G	E
376-392	T	V	E	I	N	T	L	N	S	A	N	S	A	L	E	A	D
379-395	I	N	T	L	N	S	A	N	S	A	L	E	A	D	N	M	R
<u>431-447</u>	<u>A</u>	<u>N</u>	<u>R</u>	<u>R</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>A</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	<u>S</u>	<u>Q</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>A</u>

Los números de cada péptido indican la posición que cada uno de ellos ocupa en la estructura primaria de la TPmy. Asimismo, se indican los residuos que comprende cada uno de ellos enfatizando con negritas las posiciones de anclaje para I-A<sup>d</sup>.

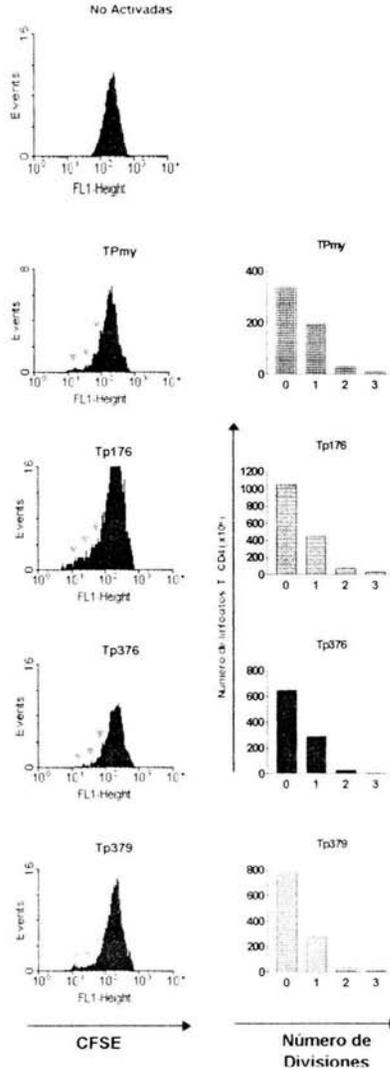
Para verificar si los diferentes Tps eran generados como producto del procesamiento de la TPmy y presentados *in vivo* a linfocitos T CD4<sup>+</sup> el siguiente paso fue evaluar su antigenicidad primeramente en ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada. Los resultados indican que de los 5 Tps evaluados, (Figura 14), Tp176 es el determinante antigénico que evocó una fuerte respuesta prácticamente idéntica a la de la molécula completa (TPmy), con lo cual sugerimos que se trata del epítipo inmunodominante de este antígeno, en tanto que Tp376 y 379 evocaron una respuesta moderada comportándose como epítipos subdominantes, en cambio no se observó respuesta proliferativa hacia Tp337 y 431, a pesar de contar con los residuos de anclaje necesarios para unirse a I-A<sup>d</sup>.



**Figura 14. Antigenicidad de los determinantes antigénicos derivados de TPmy.** La respuesta proliferativa de esplenocitos obtenidos de ratones inmunizados y no inmunizados con TPmy fue evaluada mediante un ensayo de linfoproliferación por incorporación de timidina tritiada.  $4 \times 10^5$  esplenocitos/pozo provenientes de ratones inmunizados o no

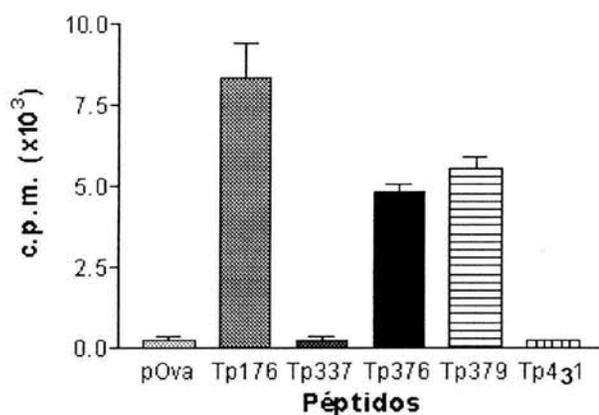
inmunizados con TPmy fueron reestimulados *in vitro* con TPmy 10µg/mL o con alguno de los diferentes Tps a la concentración de 1µg/mL durante 72h a 37°C en placas de cultivo de 96 pozos de fondo plano, 18h antes de concluido el periodo de incubación se le adicionó a cada pozo 1µCi de timidina tritiada. Las barras representan el promedio de triplicados. Los resultados mostrados son representativos de al menos 3 experimentos independientes.

Otra herramienta que nos permitió evaluar la antigenicidad de los diferentes Tps fue el empleo de ensayos de división celular antígeno-específica empleando el fluorocromo CFSE. Con esta técnica obtuvimos una respuesta similar a la mostrada en la Figura 14; donde Tp176 fue el determinante antigénico que indujo una mayor respuesta proliferativa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos con un incremento de 2.3 veces más que la proliferación observada en respuesta al estímulo con TPmy; y un incremento de 1.6 y 1.7 veces más que la respuesta inducida por Tp376 y Tp379 respectivamente. Estos datos nos sugieren una vez más que Tp176 es el epitopo inmunodominante derivado de TPmy y que Tp376 y 379 son sus epítapos subdominantes (Figura 15).



**Figura 15. División antígeno-específica de linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducida por estimulación con TP<sub>my</sub> o con los Tps.** Esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con TP<sub>my</sub> y de ratones control no inmunizados fueron marcados con CFSE y reestimulados durante 72h con 10 $\mu$ g/mL de TP<sub>my</sub> o con 1 $\mu$ g/mL de alguno de los Tps. Al término de ese periodo de incubación las células fueron teñidas con anti-CD3-APC, anti-CD4-PE, anti-CD44-Cy. 10<sup>6</sup> células fueron adquiridas en un FACSCalibur. La región de linfocitos T CD4<sup>+</sup> fue analizada con el software WinMdi. En los histogramas se muestran con flechas las divisiones inducidas por TP<sub>my</sub> o los Tps. Las gráficas de barras muestran el número de linfocitos T CD4<sup>+</sup>/millón observado en cada división celular. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Para evaluar la inmunogenicidad de los Tps se realizaron ensayos de linfoproliferación por incorporación de timidina utilizando células provenientes de los ganglios linfáticos poplíteos de ratones BALB/c inmunizados individualmente con los diferentes péptidos, los resultados obtenidos indican que Tp176, Tp376 y Tp379 son inmunogénicos, (Figura 16), y que además evocan una respuesta específica ya que gangliocitos provenientes de ratones inmunizados con Tp176 no responden *in vitro* al péptido de ovoalbúmina restringido para I-A<sup>d</sup>.



**Figura 16.** Comparación de la respuesta linfoproliferativa de células de los ganglios poplíteales de ratones inmunizados con los Tps. Gangliocitos respondedores provenientes de ratones inmunizados individualmente con alguno de los diferentes Tps. 10<sup>5</sup> células fueron colocadas por triplicado en placas de 96 pozos y estimuladas *in vitro* por 72h with 1µg/mL del Tp empleado en su inmunización. Para la estimulación con el péptido de ovoalbúmina (pOva) se emplearon gangliocitos de ratones inmunizados con Tp176. La linfoproliferación fue medida por incorporación de timidina tritiada. Estos resultados son representativos de tres experimentos independientes y las barras representan la media de triplicados.

## DISCUSIÓN

En la cisticercosis existen varios reportes donde se demuestra la importante participación de los linfocitos Th en la respuesta inmune contra este parásito, especialmente en el ratón (Bojalil *et al*, 1993; Villa y Kunh 1996; Robinson *et al*, 1997; Terrazas *et al*, 1998; Terrazas *et al*, 1999; Hernández *et al*, 2002). En esos trabajos se han empleado diferentes estrategias para definir el papel de los linfocitos Th en el curso de la enfermedad, las cuales van desde la extirpación del timo hasta el empleo de ratones deficientes en el factor de transcripción STAT6 pasando por la administración de IFN- $\gamma$  e IL-4 recombinantes (Terrazas *et al*, 1998; Terrazas *et al*, 1999; Hernández-Sosa *et al*, 2002). Así se ha logrado identificar una respuesta Th1 asociada a los mecanismos efectores contra el cisticerco y a una respuesta Th2 como favorecedora de esta parasitosis. Sin embargo, en ninguno de ellos se ha identificado algún determinante antigénico derivado del cisticerco que pueda ser presentado en el contexto de moléculas de MHC-II y que evoque una respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno específica.

De los antígenos de *T. solium* descritos actualmente, nosotros seleccionamos a la paramiosina (TP<sub>my</sub>) como el antígeno idóneo para iniciar con la identificación de los determinantes antigénicos que sean capaces de inducir una respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno específica. Esta selección fue realizada en primer lugar porque TP<sub>my</sub> es un antígeno inmunodominante en la respuesta humoral tanto del ser humano, como del cerdo y del ratón (Guerra *et al*, 1982; Vázquez-Talavera *et al*, 2001); en segundo lugar porque se conoce

completamente su secuencia primaria; en tercer lugar es un candidato para generar una vacuna contra la cisticercosis; y finalmente porque mediante un mapeo parcial de epítomos se ha identificado al fragmento amino-terminal como la región que contiene él o los determinantes antigénicos que inducen una respuesta linfoproliferativa en ratones inmunizados y en seres humanos sanos residentes de áreas endémicas (Vázquez-Talavera *et al.*, 2001; Vázquez-Talavera 2001b). Por lo tanto, TPmy es un antígeno inmunológicamente interesante y ningún otro antígeno de *T. solium* descrito actualmente ofrece estas ventajas.

Los resultados obtenidos en esta tesis concuerdan con lo reportado anteriormente donde se observa una fuerte respuesta humoral IgG antígeno-específica en ratones inmunizados con TPmy o en pacientes con neurocisticercosis (Vázquez-Talavera *et al.*, 2001; Vázquez-Talavera *et al.*, 2001b). Esta respuesta humoral nos sugiere la activación y cooperación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> posterior al procesamiento y presentación de los determinantes antigénicos de la TPmy. Esto fue puesto en evidencia mediante ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada, con lo cual se sentaron los precedentes necesarios para la identificación de los determinantes antigénicos inmunodominantes de la TPmy.

Basándonos en la secuencia primaria de la TPmy y en los sitios de anclaje previamente definidos para la molécula de clase II de ratón I-A<sup>d</sup> predijimos y sintetizamos 5 heptadecapéptidos los cuales fueron nombrados como Tp176, Tp337, Tp376, Tp379 y Tp431, cada uno de ellos posee los residuos necesarios para su unión a I-A<sup>d</sup>, sin embargo, solamente Tp176, Tp376 y Tp379 fueron

capaces de inducir la proliferación de esplenocitos de ratones inmunizados con TP<sub>my</sub>, lo cual sugiere que en estos ratones se generaron epítomos con una longitud similar o idéntica a esos Tps. Por otro lado hubo dos péptidos (Tp337 y Tp431), que no indujeron respuesta detectable, lo cual sugiere que aún cuando ellos poseían los residuos clave para su interacción con I-A<sup>d</sup> las clonas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicas estaban ausentes en el repertorio de los ratones BALB/c, o bien su frecuencia era tan baja que no pudimos evidenciarlas en nuestros ensayos. Otra alternativa probable es que estos Tps fueron procesados de tal manera que no pudieron ser presentados en el contexto de I-A<sup>d</sup>.

Otro resultado de gran relevancia que obtuvimos fue que la capacidad antigénica de los Tps se comporta de forma jerárquica, donde Tp176 fue el determinante antigénico que indujo una mayor respuesta proliferativa sugiriendo que es el epitopo inmunodominante de la TP<sub>my</sub> para la respuesta celular restringida por I-A<sup>d</sup>. Por otro lado, Tp376 y Tp379 indujeron respuestas proliferativas de una menor magnitud que Tp176 con lo cual sugerimos que son dos epítomos subdominantes de TP<sub>my</sub>. Es importante hacer notar que Tp376 y Tp379 comparten 13 residuos donde pueden residir los aminoácidos que son reconocidos por el TCR de un linfocito T CD4<sup>+</sup> específico. Los resultados obtenidos con Tp337 y Tp431 nos permiten sugerir que no son determinantes antigénicos importantes de la TP<sub>my</sub>. Lo anterior concuerda con los datos reportados previamente para otros antígenos, en donde también se observa un comportamiento jerárquico de los péptidos evaluados (Buss *et al.*, 1986; Demotz *et al.*, 1989; Russo *et al.*, 1993; Bartnes *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1998; Hural

*et al.*, 2002).

Para definir si la respuesta inducida tanto por la TPmy como por los Tps más prominentes (Tp176, Tp376 y Tp379) estaba mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> restringimos el análisis a esta población celular, modificando la técnica citofluorométrica con CFSE (5, 6 Carboxi-Fluoresceín-Succinimidil-Éster), descrita previamente por Lyons y Parish. En los resultados obtenidos en esos ensayos de nueva cuenta Tp176 se comportó como el determinante antigénico más prominente derivado de la TPmy, incluso indujo una mayor activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos a la observada con TPmy (2.3 veces más), sin embargo inesperadamente las diferencias no resultaron tan marcadas con los péptidos: Tp376 y Tp379 (1.6 y 1.7 veces más respectivamente).

Un detalle importante en los resultados obtenidos con el fluorocromo CFSE, es que en los histogramas los picos de división no son tan pronunciados como los reportados para divisiones celulares donde se emplean linfocitos con TCRs transgénicos o bien cuando se emplean estímulos policlonales como los mitógenos, anticuerpos anti-CD3 o anti-TCR. Sin embargo, el porcentaje de linfocitos Th que se dividen en respuesta a Tp176 (0.016%) es similar al valor de 0.01% que corresponde a la frecuencia esperada para linfocitos T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicos (Abbas *et al.*, 2003). Además ese valor cae dentro del rango de 0.01-2.0% reportado en otro sistema, sugiriendo que esas pueden ser las frecuencias de activación y expansión celular específicas en poblaciones no homogéneas de linfocitos T (Albert *et al.*, 2001).

Adicional a la evaluación de la antigenicidad de los Tps, estudiamos la capacidad inductora (inmunogenicidad), inmunizando ratones y evaluando la respuesta linfoproliferativa *in vitro* al reestimar sus gangliocitos provenientes de los ganglios poplíteos con el Tp usado en la inmunización (homólogo). Una vez más Tp176 fue el determinante antigénico más prominente, además la respuesta evocada por él fue específica ya que no se observó respuesta al reestimar *in vitro* con el péptido de la ovoalbúmina restringido para I-A<sup>d</sup> (Sette *et al.*, 1988). Asimismo, los péptidos Tp376 y Tp379 mostraron una inmunogenicidad intermedia sugiriendo su subdominancia. Por otro lado, Tp337 y Tp431 no mostraron una respuesta.

Vázquez-Talavera *et al.*, mediante la construcción de tres fragmentos recombinantes de la TPmy (el VW 2-1 que comprende del aminoácido (aa) 1 al 268; el VW 3-3 que va del aa 269 al 551; y el VW 4-1 que abarca del aa 552 al 863) demostraron que la respuesta de linfocitos T en ratones BALB/c inmunizados estaba dirigida principalmente hacia la región amino-terminal (VW 2-1). Asimismo, en otro estudio estos autores nos muestran que en pacientes con neurocisticercosis no se observa una clara preferencia hacia ninguno de los diferentes fragmentos; sin embargo en dicho estudio, la respuesta linfoproliferativa de los individuos reactivos a la TPmy sin cisticercosis, provenientes de la misma área endémica sí presentan una marcada preferencia hacia VW 2-1, sugiriendo que en esta región se localizan los determinantes antigénicos de la TPmy involucrados en la restricción de la cisticercosis. Lo más relevante (y en concordancia con lo anterior), es que Tp176 está insertado en ese

fragmento amino-terminal (VW 2-1). En este contexto la reactividad de Tp176 ofrece la posibilidad de manipular la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en la cisticercosis, ya sea para el desarrollo de una vacuna o para estudiar el repertorio de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para este determinante antigénico. Resultados preliminares sugieren una posible respuesta Th1 por un incremento en los niveles de IgG2a en el suero de ratones BALB/c inmunizados con Tp176 (Anexo 1). Sin embargo, es necesario corroborarlo e identificar el perfil de citocinas para definir el fenotipo de respuesta Th evocada por Tp176. Adicionalmente, sería interesante definir los residuos críticos para la activación y proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicos para Tp176.

En resumen, nuestros resultados muestran la identificación de 3 determinantes antigénicos de la TPmy, también muestran la jerarquía entre ellos, lo que nos permite sugerir que Tp176 es un claro epítipo inmunodominante mientras que Tp376 y Tp379 son epítipos subdominantes. Por lo que estudios más detallados con los determinantes antigénicos inmunodominantes de la TPmy para linfocitos T CD4<sup>+</sup> contribuiría a una mejor comprensión de la respuesta Th en los mecanismos protectores o permisivos de la infección. Si consideramos que el humano y el cerdo montan una fuerte respuesta inmune contra este antígeno, los resultados observados usando el modelo de ratón también pueden ser muy útiles para comprender la respuesta inmune en la cisticercosis humana y porcina.

**REFERENCIAS**

- Abbas AK**, Murphy K, Sher A. Funcional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996, 383:787-793.
- Abbas AK**, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5ª ed. Saunders, China. 2003, 105-125.
- Albert ML**, Jegathesan M, Darnell RB. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat Immunol* 2001, 2: 1010-1017.
- Baños DM**, López S, Arias CF, Esquivel FR. Identification of a T-helper cell epitope on the rotavirus VP6 protein. *J Virol* 1997, 71:419-426.
- Bartnes K**, Leon F, Briand JP, Travers P, Hannestad K. A novel first primary anchor extends the MH C class II I-A<sup>d</sup> binding motif to encompass nine amino acids. *Int Immunol* 1997, 9: 1185-1193.
- Beck W y Davies J**. Parasitología médica. 3ª ed. Interamericana, México, 1984.
- Bjorkman P**. MHC restriction in the three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997, 89: 167-170.
- Bojalil R**, Terrazas L, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1993, 79:384-389.
- Buss S**, Sette A, Colon SM, Jenis DM, Grey HM. Isolation and characterization of antigen-Ia complex involved in T cell recognition. *Cell* 1986, 47:1071-1077.
- Cardona A**, Restrepo B, Jaramillo J, Tale J. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is

characterized by a predominance of  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 1999, 162:995-1002.

**Chavarría A**, Roger B, Fragosos G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. Th2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Micro Infect* 2003, 5:1109-1115.

**Constant S** y Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997,15:297-322.

**Davis SJ**, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker TR, Van der Merwe PA. The nature of molecular re cognition by T cells. *Nat Immunol* 2003, 4:217-224.

**Del Brutto O**, Granados G, Talamás O, Sotelo J, Gorodezky C. Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, DR and DQ antigens in mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Hum Biol* 1991, 63:85-93.

**Demotz S**, Grey H, Sette A. Characterization of naturally processed MHC class II-restricted T-cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature* 1989, 342: 682-684.

**Espinoza BG**, Ruiz-Palacios A, Tovar MA, Sandoval A, Flisser A. Characterization by enzyme-linked immnosorbent assay of the humoral immune response in patiens with neurocysticercosis and its applications in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1986, 24: 536-541.

**Evans C**, García H, Hartnell A, Gilman R, Jose P, Martínez M, Remick D, Williams T, **Friedland J**. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun* 1998, 66:4522-4525.

**Flisser A**, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens,

antibodies and non-responders. *Clin Exp Immunol* 1980, 39: 27-37.

**García KC**, Teyton L, Wilson IA. Structural basis of T cell recognition. *Annu Rev Immunol* 1999, 17:369-397.

**Grewal J**, Kaur S, Bhatti G, Singh I, Ganguly N, Mahajan R, Malla N. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 2000, 86:500-503.

**Guerra G**, Flisser A, Cañedo L, Lacleste JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives* (eds Flisser et al.). Ac Press New York 1982, 437-451.

**Hernández HJ**, Edson CM, Harn DA, Ianelli CJ, Stadecker MJ. *Schistosoma mansoni*: Genetic restriction and cytokine profile of the CD4<sup>+</sup> T helper cell response to dominant epitope of major egg antigen Sm-p40. *Exp Parasitol* 1998, 90: 122-130.

**Hunt DF**, Michel H, Dickinson TA, Shabanowitz J, Cox AL, Sakaguchi K, Appella E, Grey HM, Sette A. Peptides presented to the immune system by the murine class II major histocompatibility complex molecule I-A<sup>d</sup>. *Nature* 1992, 256:1817-1819.

**Hural J**, Friedman RS, McNabb A, Steen SS, Henderson RA, Kalos M. Identification of naturally processed CD4 T cells epitopes from the prostate-specific antigen kallikrein 4 using peptide-based in vitro stimulation. *J Immunol* 2002, 169:557-565.

**Kane JF** y **Hartley DL**. Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Technique* 1988, 6: 95-101.

**Kuchroo VK**, **Das MP**, **Brown JA**, **Ranger AM**, **Zamvil SS**, **Sobel RA**, **Weiner HL**, **Nabavi N**, **Glimcher LH**. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 1995, 80:707-718.

**Laclette JP**, **Alagón A**, **Willms K**, **Torre-Blanco A**. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 1990, 76: 273-275.

**Laclette JP**, **Landa A**, **Arcos L**, **Willms K**, **Davis AE**, **Shoemaker CB**. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Bioch Parasitol* 1991, 44: 287-96.

**Laclette JP**, **Merchant MT**, **Willms K**. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J Parasitol* 1987, 73: 121-129.

**Laclette JP**, **Rodríguez M**, **Landa A**, **Arcos L**, **de Alba P**, **Mancilla R**, **Willms K**. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leid* 1989, 57: 115-122.

**Laclette JP**, **Shoemaker CB**, **Richter D**, **Arcos L**, **Cohen C**, **Bing D**, **Nicholson-Weller**, **Paramyosin inhibits complement C1**. *J Immunol* 1992, 148: 124-28.

**Landa A**, **Laclette JP**, **Nicholson-Weller A**, **Shoemaker CB**. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor

activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). Mol Bioch Parasitol 1993, 60: 343-48.

Leid R y Willams J. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. Immunology 1974, 27:195-207.

López-Moreno HS. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. Salud Pub Mex 2002, 44: 145-152.

Lyons AB y Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. J Immunol Methods 1994, 171:131-137.

Medina-Escutia E, Morales-López Z, Proaño JV, Vázquez J, Bermúdez V, Ortiz-Navarrete V, Madrid-Marina V, Lacleste JP, Correa D. Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: lack of immune suppression. J Parasitol 2001, 87:587-590.

Mitchell G. Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host-protective immunity and immune evasion. En: Flisser A, Willms K, Lacleste J. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Ac Press New York 1982, 575-584.

Mossman T, Cherwinsky H, Bond M, Giedlin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986, 136:2348-2357.

O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. Immunity 1998, 8:275-283.

Ohta Y, Okamura K, McKinney EC, Bartl S, Hashimoto K, Flajnik MF. Primitive synteny of vertebrate major histocompatibility complex class I and class II

genes. PNAS 2000, 97:4712-4717.

**Olivo A**, Plancarte A, Flisser A. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. Int J Parasitol 1988, 18: 543-545.

**Ostrosky-Zeichner L**, García-Mendoza E, Rios C, Sotelo J. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. Arch Med Res 1996, 27:513-517.

**Pearce E**, Scott P, Sher A. Immune regulation in parasitic infection and disease. En: Paul W. Fundamental immunology. 4<sup>a</sup> ed. Lippincott-Raven 1999, 1271-1294.

**Reiner SL**, Locksley RM. The worm and the protozoa: stereotyped responses or distinct antigens? Parasitol Today 1993, 9:258-260.

**Reinherz EL**, Tan K, Tang L, Kern P, Liu JH, Xiong Y, Hussey RE, Smolyar A, Hare B, Zhang R, Joachimiak A, Chang HC, Wagner G, Wang JH. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. Science 1999, 286:1913-1921.

**Reizis B**, Eisenstein M, Mor F, Cohen R. The peptide-binding strategy of the MHC class II I-A molecules. Immunol Today 1998, 19: 212-216.

**Restrepo B**, Llaguno P, Sandoval M, Enciso J, Teale J. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. J Neuroimmunol 1998, 89:64-72.

**Riese PA**, Wolf PR, Bromme D, Natkin LR, Villadangos JA, Ploegh HL. Essential role for cathepsin S in MHC class-associated invariant chain processing and peptide loading. Immun 1996, 4:357-366.

**Robertson JM**, Jensen PE, Evavold BD. DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* 2000; 164: 4706-4712.

**Robinson P**, Atmar R, Lewis D, White C. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 1997, 65:2925-2931.

**Rock K**, York IA, Saric T, Goldberg AL. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *Adv Immunol* 2002, 80:1-70.

**Rodríguez-Sosa M**, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Cutting Edge: Susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 2002, 168:3135-3139.

**Romagnani S**. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994, 12:227-257.

**Rudensky A**, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 1991, 353:622-627.

**Russo DM**, Jardim A, Carvalho EM, Sleath PR, Armitage R, Olafson RW, Reed SG. Mapping human T cell epitopes in leishmania gp63. *J Immunol* 1993, 150:932-939.

**Scott CA**, Peterson PA, Teyton L, Wilson IA. Crystal structures of two I-A<sup>d</sup>-peptide complexes reveal the high affinity can be achieved without large anchor residues. *Immunity* 1998, 8:319-329.

**Sette A**, Buss S, Colon S, Miles C, grey HM. I-A<sup>d</sup> binding peptides derived from

unrelated protein antigens share a common structural motif. *J Immunol* 1988, 141:45-48.

**Sher A, Gazzinelli R, Oswald I, Clerici M, Kullberg M, Pearce E *et al*** Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev* 1992, 127:183-203.

**Steel C, Limberger RJ, McReynolds LA, Ottesen EA, Nutman TB.** B cell responses to paramyosin. *J Immunol* 1990, 145: 3917-3923.

**Tam JP.** Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci* 1988, 85: 5409-5413.

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

**Terrazas L, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo F, Larralde C.** Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 1999, 85:135-141.

**Toenjes S, Spolski R, Mooney K, Kuhn R.** The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitol* 1999, 118:623-633.

**Toenjes S, Spolski R, Mooney K, Kuhn R.**  $\gamma\delta$  T cells do not play a major role in controlling infection in experimental cysticercosis. *Parasitol* 1999b, 119:413-418.

**Tripp RA**, Hou S, Etchart N, Prinz A, Moore D, Winter J, Anderson LJ. CD4<sup>+</sup> T cell frequencies and Th1/Th2 cytokine patterns expressed in the acute and memory response to respiratory syncytial virus I-E<sup>g</sup>-Restricted peptides. *Cell Immunol* 2001, 207:59-71.

**Vargas-Parada L** y Lacleste JP. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res* 2003, 89:375-378.

**Vázquez-Talavera J**, Solis C, Terrazas L, Lacleste JP. Characterization and protective potential of immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 2001, 69: 5412-5416.

**Vázquez-Talavera J**, Solis CF, Medina-Escutia E, Morales-López Z, Proaño J, Correa D, Lacleste JP. Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol* 2001b, 23: 1-6.

**Villa O** y Kuhn R. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitol* 1996, 112:561-570.

**Williams J**, Engelkirk P, Lindsay M. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. In: Flisser A, 13:26-31. Willms K, Lacleste J. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. New York. Ac Press 1982;621-632.

**Wolf P**, Lennon-Duménil AM, Fiebiger E, Lagaudriere-Gesbert C, Ploegh H. Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Adv Immunol* 2002, 80:71-114.

## **ANEXOS**

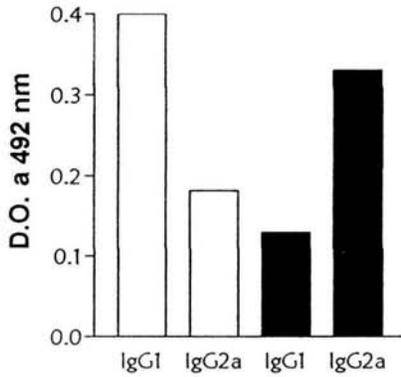
A1. Datos preliminares

A2. Manuscrito en preparación enviado a *Parasitology*

A3. Artículo publicado en la revista *Parasite Immunology*

A4. Artículo publicado en la revista *Salud Pública de México*

## A1. Datos preliminares



**Figura A1. Posible respuesta Th1 inducida por Tp176.** Comparación por ELISA de los subtipos de IgG1 e IgG2a totales en ratones BALB/c inmunizados (■) y no inmunizados (□) con Tp176. Los sueros de los ratones se diluyeron 1:100, los subtipos de IgG fueron identificados con un kit de SIGMA. Las barras corresponden al promedio de dos ratones por grupo.

A2. Manuscrito en preparación

**Analysis of CD4<sup>+</sup> T Cell Receptor V Beta Chain in Chronically Infected Mice with *Taenia crassiceps***

H. S. López-Moreno<sup>1</sup>, D. Correa<sup>2</sup>, J. P. Lacleste<sup>3</sup> & V. F. Ortiz-Navarrete<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México D.F. México.

<sup>2</sup> Torre de Investigación. Instituto Nacional de Pediatría. Secretaría de Salud, México D.F. México.

<sup>3</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. México.

\* To whom the correspondence should be addressed: Vianney F. Ortiz-Navarrete. Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN #2508, CP 07360, México D.F. México ([e-mail: vortiz@mail.cinvestav.mx](mailto:vortiz@mail.cinvestav.mx)).

**SUMMARY**

The CD4<sup>+</sup> T lymphocyte response play a critical role in murine cysticercosis by *Taenia crassiceps*. However, information about the TCR repertoire in this chronic disease is unavailable. In this report, we analyzed the expression of TCR variable beta chain (V $\beta$ ) on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from BALB/c mice chronically infected with *Taenia crassiceps* and compared to uninfected animals, by flow cytometry using monoclonal antibodies specific for V $\beta$ 2, V $\beta$ 4, V $\beta$ 7, V $\beta$ 8, V $\beta$ 10 or V $\beta$ 14 (all conjugated with FITC) plus anti-CD4-PE. Our findings show that V $\beta$ 4, V $\beta$ 7 and V $\beta$ 14 are the prominent TCR in chronic cysticercosis with concomitant increase of antigen-specific IgG1 in infected mice, suggesting that these V $\beta$  families are involved in a permissive response Th2-like.

Key words: *Taenia crassiceps*, cysticercosis, T cell receptor, variable beta chain, T cell repertoire.

## INTRODUCCION

Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis has been extensively used as a model for the chronic phase of *T. solium* cysticercosis, especially for immunological studies. Several reports have shown that CD4<sup>+</sup> T cells are involved in parasite restrictive and permissive immune responses to *T. crassiceps* cysticercosis (Bojalil *et al.*, 1993; Villa and Kuhn, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Terrazas *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999; López-Briones *et al.*, 2001; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002). However, the information on T cell receptor (TCR) usage in *T. crassiceps* chronic cysticercosis is unavailable. Characterization of TCR repertoire in experimental cysticercosis is a fundamental step for understanding of T cell immune response in this disease. Because the V $\beta$  expressed by a given TCR is determinant for the antigen specificity of a T cell, in the present report, we analyzed the expression of variable beta chain TCR (V $\beta$ ) from the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of mice chronically infected with *T. crassiceps*.

## MATERIALS AND METHODS

### *Mice*

Six-week-old, female BALB/c mice from the animal facilities at CINVESTAV were used. The mice were treated according to international regulations for handling and of laboratory animals.

### *Parasites and Infection*

Metacestodes of *Taenia crassiceps* (ORF strain) were harvested from the peritoneal cavity of mice 2 months after infection. The cysticerci were washed three times in sterile phosphate buffered saline (PBS; 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.4). Experimental infection was achieved by intra-peritoneal injection of ten non-budding metacestodes suspended in sterile PBS per mouse. We used age- and sex matched uninfected mice as a control.

### *Cells*

Four weeks after infection, mice were killed by cervical dislocation. Spleens were removed from infected and control mice, and splenic cells obtained after erythrocyte lysis with hypotonic buffer containing NH<sub>4</sub>Cl (Sigma) and KCO<sub>3</sub> (Sigma) for 5 min at 37°C. After three washes with sterile PBS supplemented with 2% calf foetal serum (Gibco) (PBS-2) the cells were used for V $\beta$  analysis.

### *V $\beta$ chain analysis*

The analysis of V $\beta$  chain repertoire from chronically infected and uninfected mice was carried out *ex vivo* by flow cytometry. Staining of 10<sup>6</sup> splenic cells of each infected or control mouse was performed with the following monoclonal antibody conjugates: anti-CD4-phycoerythrin, anti-V $\beta$ 2, anti-V $\beta$ 4, anti-V $\beta$ 7, anti-V $\beta$ 8, anti-V $\beta$ 10b, or anti-V $\beta$ 14 fluorescein isothiocyanate, all obtained from PharMingen. The cells were incubated with the reagents for 30 min at 4°C, washed two times with PBS-2. One hundred thousand cells per

sample were analysed on a FACSVantage flow-cytometer with the Cell Quest software (Becton Dickinson).

### *ELISA*

Infected and uninfected mice were bled and serum collected and stored at -20 C until use. Antigen-specific IgG1 and IgG2a levels were determined by ELISA as previously described (Rodríguez *et al.*, 1999).

### *Statistical analysis*

Data were expressed as mean and standard deviation as indicated. Differences between uninfected and infected groups were examined using the ANOVA-test with the Epi Info 6 Software, CDC Atlanta, Georgia. A *p* value lower than 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

The identification of the V $\beta$  TCR repertoire expanded in cysticercosis give the possibility to identify the subsets involved in the pathogenesis of this parasitic disease. In this paper we investigated the expression of V $\beta$  chain on TCR usage by CD4<sup>+</sup> T cells in chronic cysticercosis, because this region is the major determinant of the antigen specificity of these cells.

TCR V $\beta$  usage was calculated as percent CD4<sup>+</sup> cells positive for the various TCR V $\beta$  markers. These percentages were averaged, and means were compared by analysis of variance (ANOVA-test). Our results (Table 1) indicating first, a frequency increased in 3 of 6 V $\beta$  families tested. And second, V $\beta$ 4, V $\beta$ 7 and V $\beta$ 14 are the prominent TCR variable beta regions

overexpanded on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes of BALB/c mice chronically infected with *T. crassiceps* (Table 1). The magnitude order as follow V $\beta$ 7> V $\beta$ 14> V $\beta$ 4. L3pez-Briones *et al.* (2003) recently shown a downregulation of V $\beta$ 2 in the spleen cells at day 6 after *T. crassiceps* infection (acute phase). In this regard it is worth to mention that NKT cells present V $\beta$ 2, V $\beta$ 7 and V $\beta$ 8, being the later the most common (Lantz & Bendelac, 1994). These cells are involved in the production of high levels of interleukin 4 (IL-4) upon primary stimulation *in vitro* (reviewed in Bendelac *et al.*, 1997), but downregulated around 6 days of activation. Thus, we think that *T. crassiceps* infection could acutely induce activation of this NKT subset. In this sense, we found V $\beta$ 7 (another V $\beta$  chain frequently used by NKT cells), as the most prominent TCR usage in chronically infected BALB/c mice with *T. crassiceps*, but we cannot to assure that these cells are NKT.

Previous reports have demonstrated that experimental cysticercosis induce a Th2 response in BALB/c mice (Villa & Kuhn, 1996; Robinson *et al.*, 1997; Terrazas *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999; L3pez-Briones *et al.*, 2001; Rodriguez-Sosa *et al.*, 2002). In agreement, we found that antigen-specific IgG1 is the predominant isotype in infected BALB/c mice as shown in Fig. 1. Our results suggest that V $\beta$ 4, V $\beta$ 7 and V $\beta$ 14 CD4<sup>+</sup> T cells are involved in a permissive response to cysticercosis, mediating a Th2 profile. However, extensive studies are necessary to clarify the mechanisms related to the establishment and pathology *versus* protective immune response in

cysticercosis. In addition it would be important to identify the antigens of the cysticercus involved in overexpansion of these V $\beta$  families and to determine their cytokine profile.

We thank Victor Hugo Rosales for the operation of the FACSVantage cytometer. This project was partially supported by grant No. 28967-M from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT). Hector López-Moreno, was a PhD Fellow No. 125177 of CONACyT during the study.

**REFERENCES**

- BENDELAC, A., RIVERA, M., PARK, S. & ROARK, J. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: Development, specificity, and function. *Annual Reviews in Immunology* **15**, 535-562.
- BOJALIL, R., TERRAZAS, L., GOVEZENSKY, T., SCIUTTO, E. & LARRALDE, C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* **79**, 384-389.
- LANTZ, O. & BENDELAC, A. (1994). An invariant T cell receptor  $\alpha$  chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4<sup>+</sup> and CD48<sup>-</sup> T cells in mice and humans. *Journal Experimental Medicine* **180**, 1097-1106.
- LÓPEZ-BRIONES, S., SOLOSKI, M., BOJALIL, R., FRAGOSO, G. & SCIUTTO, E. (2001). CD4<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$  T cells are critically involved in the control of experimental murine cysticercosis in C57BL/6J mice. *Parasitology Research* **87**, 826-832.
- LÓPEZ-BRIONES, S., LAMOYI, E., FRAGOSO, G., SOLOSKI, M. J. & SCIUTTO, E. (2003). *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. *Parasitology Research* **90**, 236-242.
- ROBINSON, P., ATMAR, R., LEWIS, D. & WHITE, C. (1997). Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infection and Immunity* **65**, 2925-2931.
- RODRIGUEZ, M., TERRAZAS, L. I., MARQUEZ, R. & BOJALIL, R. (1999).

Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunology* **21**, 177-185.

RODRIGUEZ-SOSA M., ABHAY, R., SATOSKAR, R., CALDERÓN, R., GOMEZ-GARCIA, L., SAAVEDRA, R., BOJALIL, R. & TERRAZAS, L. (2002). Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infection and Immunity* **70**, 3656-3664.

TERRAZAS, L., CRUZ, M., RODRÍGUEZ-SOSA, M., BOJALIL, R., GARCÍA-TAMAYO, F. & SARRALDE, C. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research* **85**, 135-141.

TOENJES, S., SPOLSKI, R., MOONEY, K. & KUHN, R. (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.

VILLA, O. & KUHN, R. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* **112**, 561-570.

**Table 1.** Repertoire of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte receptors of uninfected and *T. crassiceps* metacestode infected BALB/c mice.

Variable beta chain	Uninfected <sup>a</sup>		Infected <sup>a</sup>		<i>p</i> <sup>b</sup>
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	
Vβ2	1.20	0.08	1.94	0.86	0.222
Vβ4	<b>1.18</b>	<b>0.14</b>	<b>2.27</b>	<b>0.37</b>	<b>0.029*</b>
Vβ7	<b>0.97</b>	<b>0.23</b>	<b>2.57</b>	<b>0.39</b>	<b>0.0078*</b>
Vβ8	7.44	9.52	10.67	15.17	0.29
Vβ10b	2.10	2.04	2.50	0.22	0.65
Vβ14	1.65	<b>0.12</b>	<b>3.30</b>	<b>0.44</b>	<b>0.005*</b>

<sup>a</sup> Data represent mean ±S.D. percent of specific Vβ /CD4<sup>+</sup> cells of 3 individual experiments, 5 mice per group.

<sup>b</sup> *p* values were obtained by ANOVA test

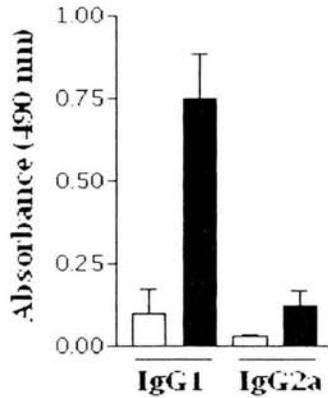


Fig. 1. Antigen-specific IgG1 and IgG2a antibodies in infected BALB/c mice with *Taenia crassiceps*. IgG subclass levels were detected by ELISA on serum from uninfected and infected mice. Bars represent mean  $\pm$ S.D. of three independent experiments, 4 mice per group.

Research note

## Identification of CD4<sup>+</sup> T cell epitopes of *Taenia solium* paramyosin

H. S. LÓPEZ-MORENO<sup>1</sup>, D. CORREA<sup>2</sup>, J. P. LACLETTE<sup>3</sup> & V. F. ORTIZ-NAVARRETE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, D.F., México, <sup>2</sup>Torre de Investigación 8° Piso, Instituto Nacional de Pediatría, D.F., México and <sup>3</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, D.F., México

*T cell mediated response is involved in a protective immune response against experimental cysticercosis conferred by immunization with Taenia solium paramyosin (TPmy) to BALB/c mice. In this study, we analysed the TPmy amino acid sequence for predicted CD4<sup>+</sup> T cells epitopes. Five different regions of this protein showed that the residues anchor to bind the I-A<sup>d</sup> molecule; synthetic peptides containing these epitopes were evaluated for their ability to induce lymphoproliferative responses of spleen cells from TPmy immunized mice. Among them, Tp176 (amino acids 176–192 sequence DDLQRQMDANSKSL) was the immunodominant T cell epitope of TPmy. Delineation of this epitope should facilitate analysis of the role of CD4<sup>+</sup> T cell response in experimental cysticercosis.*

**Keywords** *Taenia solium paramyosin, CD4<sup>+</sup> T cell epitope, cysticercosis, I-A<sup>d</sup>*

Paramyosins are structural proteins of thick filaments in the muscle of several groups of invertebrates, including helminths, and in some cases they have been localized to tegumentary structures (1). Paramyosin is also an immunodominant antigen during infections caused by different flatworms such as *Schistosoma mansoni* (2), *Echinococcus granulosus* (3) and *Taenia solium* (4). Therefore paramyosin has also been used as a vaccine candidate against different parasitic diseases (5–7). Laclette and co-workers previously demonstrated that *T. solium* paramyosin (TPmy) provided a significant level of cross-protection in mice against a challenge infection with *T. crassiceps*. In addition, they showed that the NH<sub>2</sub>-terminal region of TPmy induced a Th1-like immune response, suggesting the role of cellular immune response in the establishment of protective status against murine cysticercosis (8). In context it has been shown that administration of neutralizing antibodies against IFN $\gamma$  to *T. crassiceps* infected mice during the early phase of infection rendered them more susceptible to cysticercosis (9). More recently using STAT6<sup>-/-</sup> mice it has been demonstrated that in the absence of the IL-4/IL-13 signalling pathway susceptible BALB/c mice developed a Th1 response that controlled parasite growth. In contrast, wild-type mice developed a Th2 immune response and remained susceptible to *T. crassiceps* (10). For these reasons identification of TPmy epitopes presented by MHC class II molecules and evaluation of their role in antigen presentation offers the possibility to understand and manipulate CD4<sup>+</sup> T lymphocyte response in murine cysticercosis. Here we have evaluated five potential I-A<sup>d</sup>-restricted epitopes from TPmy.

BALB/c (H-2<sup>d</sup>) female mice 4–6 weeks of age were used in all experiments. The animals were maintained in the animal care facility at CINVESTAV-IPN and treated according to international regulations for the care of laboratory animals. Recombinant TPmy was partially purified from transformed *Escherichia coli* BL21 inclusion bodies, solubilized in 5 M guanidine hydrochloride and then purified by affinity

**Correspondence:** V. F. Ortiz-Navarrete, Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Av. Instituto Politécnico Nacional #2508, C.P. 07360, Col. San Pedro Zacatenco, Deleg. Gustavo A. Madero, D.F., México (e-mail: vortiz@mail.cinvestav.mx).

Received: 3 July 2003

Accepted for publication: 3 November 2003

**Table 1** Alignment of *Taenia solium* paramyosin 17-mers with binding motifs for I-A<sup>d</sup>

Sequence																		
Position		1	2	3	4	5	6	7	8	9								
							A			AAS								
176–192	D	D	L	Q	R	Q	M	A	D	A	N	S	A	K	S	R	L	
337–353	I	K	D	L	Q	A	E	N	E	A	L	A	A	E	N	G	E	
376–392	T	V	E	I	N	T	L	N	S	A	N	S	A	L	E	A	D	
379–395	I	N	T	L	N	S	A	N	S	A	L	E	A	D	N	M	R	
431–447	A	N	R	R	L	T	D	L	E	A	L	R	S	Q	L	E	A	

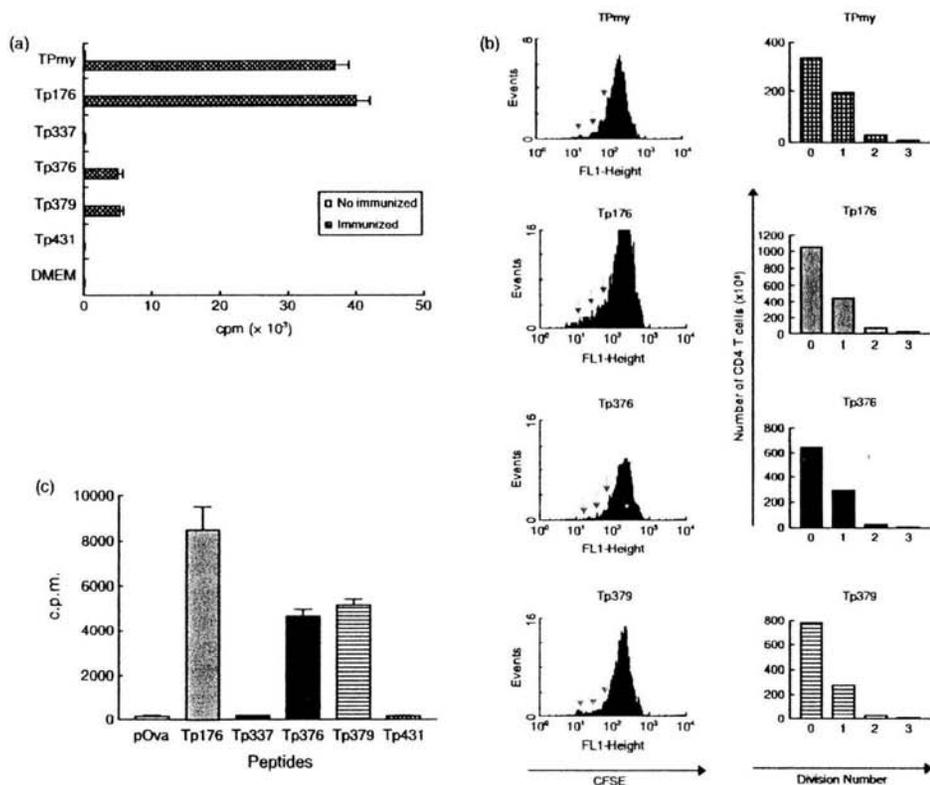
Peptides are aligned according to Ia anchors residues (bold).

chromatography through a HiTrap<sup>TM</sup> chelating column (Pharmacia Biotech). Purified protein was analysed by conventional SDS-PAGE and immunoenriched by Western blot using a specific polyclonal antiserum (8). TPmy peptides and 323–335-ovalbumin control peptide (11,12) were prepared using Fmoc (fluorenyl-methoxycarbonyl) Synergy model 432 A synthesizer (Applied Biosystems, USA), according to standard procedures (13). The mice were immunized three times intraperitoneally (i.p.) at 10-day intervals, with 25 µg of TPmy in complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) for the first immunization and in incomplete Freund's adjuvant (Sigma, St Louis, MO, USA) for the second and third immunizations. Another group of mice was injected once subcutaneously at the base of tail, with 100 µg of free peptide in CFA. Spleen cells or popliteal lymph node cells from immunized or control mice were obtained 10 days after the last inoculation and proliferation was assessed using a standard [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation assay. Splenocytes were plated at 4 × 10<sup>5</sup> cells/well in 96-well flat bottom culture plates (Costar, NY, USA) and cultured in DMEM-10: DMEM (Gibco, NY, USA), 25 mM Hepes (Gibco, NY, USA), 50 mM Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> (Sigma, St Louis, MO, USA), 50 µM 2-mercaptoethanol (Sigma, St Louis, MO, USA), 10% heat-inactivated foetal bovine serum (Gibco, NY, USA), 40 µg/mL of gentamicin (Sigma, St Louis, MO, USA) and 2 mM L-glutamine (Sigma, St Louis, MO, USA). Cells were stimulated with optimum concentration of TPmy peptide (titration was carried out previously) or with 2.5 µg/mL of Con-A (Sigma, St Louis, MO, USA). Plates were incubated at 37°C under an atmosphere of 95% air–5% CO<sub>2</sub> for 72 h. 1 µCi of tritiated thymidine (methyl-<sup>3</sup>H TDR, Amersham, NJ, USA) was added to each well 18 h before harvesting onto glass filters. The samples were then counted on a β-scintillation counter (LKB-Wallac, Turkey, Filand). Antigen-induced proliferation was expressed as counts per minute (cpm) and as means of triplicated wells. Alternatively, 5 × 10<sup>7</sup> splenic cells were labelled with 1 µM 5- (and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinim-

idyl ester (CFSE) (Molecular Probes, USA) according to Lyons and Parish (14) and cultured for 3 days with optimum concentration of TPmy or TPmy-peptides. Using standard protocols, stimulated cells were stained for FACS analysis in cold PBS containing 0.5% BSA and 0.05% sodium azide with allophycocyanin-conjugated anti-CD3, phycoerythrin-conjugated anti-CD4, CyChrome-conjugated anti-CD44 (all from Pharmingen, San Diego, CA, USA). The samples were acquired in a FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA).

Data were analysed with the WinMidi 2.8 software (<http://www.facs.scripp.edu/software> by Joseph Trotter 2000).

Affinity chromatography TPmy was used for mice immunization during this study. The protein analysed by SDS-PAGE and Western blot revealed a characteristic 100 kDa band of paramyosin (data not shown). Peptides binding to I-A<sup>d</sup> have a nonameric motif with four essential anchors, P1 (degenerate), P4 (aliphatic), P6 (alanine) and P9 (alanine) (11,15,16). Using this motif in the primary TPmy sequence analysis, we found that 17-mers Tp176, Tp337, Tp376, Tp379, and Tp431 (Table 1) possessed the binding anchors for I-A<sup>d</sup>. It was decided to use the lymphoproliferative response to evaluate the antigenicity of those peptides. A strong proliferative response to Tp176, followed by a moderate response to Tp376 or Tp379 was observed. No response was obtained with the other peptides tested (Figure 1a). To measure proliferation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in response to culture with those specific peptides, spleen cells from TPmy immunized mice were labelled with CFSE before culture with TPmy peptides or Ova control peptide. FACS analysis was carried out gating on CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and CD44<sup>hi</sup> T cells allowing for analysis of antigen-reactive T cells. After 72 h of *in vitro* restimulation with TPmy two cell divisions were observed, whereas three cell divisions were induced in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes stimulated with Tp176 and two cycles induced with Tp376 or Tp379. It is worthwhile to mention that the number of responding CD4<sup>+</sup> T cells to Tp176 were 2.3 fold more than those that



**Figure 1** Tp176 is an immunodominant CD4<sup>+</sup> T cell epitope of TPmy. (a) Lymphoproliferative response of splenocytes from TPmy BALB/c immunized or non-immunized mice.  $4 \times 10^5$  splenocytes were plated in triplicate in 96-well plates and stimulated *in vitro* with TPmy (10  $\mu$ g/mL) or TPmy-peptides (1  $\mu$ g/mL) for 72 h. Proliferation was measured by thymidine incorporation assay. These results are representative of three independent experiments and bars represent mean of triplicates. (b) Cell division of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells induced by stimulation with TPmy or TPmy-peptides. Splenocytes from TPmy BALB/c immunized and from non-immunized control mice were labelled with CFSE and stimulated for 72 h as described above. Then cells were stained with anti-CD3-APC, anti-CD4-PE, anti-CD44-Cy.  $10^6$  cells were acquired in FACSCalibur. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were gated and analysed on WinMidi software. Histograms show with arrows the divisions induced by TPmy or TPmy-peptides. Graphic bars show the CD4<sup>+</sup> T cells per million observed in each cell division. These results are representative of three independent experiments. (c) Comparison of lymphoproliferative response of popliteal lymph node cells from TPmy-peptides immunized mice. Responding lymph node cells were isolated from each group of TPmy-peptides immunized mice.  $10^5$  cells were plated in triplicate in 96-well plates and stimulated *in vitro* for 72 h with 1  $\mu$ g/mL of the same TPmy-peptide used during immunization. For Ova-peptide stimulation cells isolated from Tp176 immunized mice were used. Proliferation was measured by thymidine incorporation assay. These results are representative of three independent experiments and bars represent means of triplicates.

reacted to TPmy, and 1.6 and 1.7 fold more than those that responded to Tp376 and Tp379, respectively (Figure 1b). To assess the immunogenicity of these peptides popliteal lymph node cells from TPmy-peptides immunized mice were restimulated *in vitro* with the same peptide used during immunization. A lymphoproliferative response to Tp176 as well to Tp376 and Tp379 was detected, but not to Tp337 and Tp431. The specificity of the immune response induced

by TPmy-peptide immunization was tested using an I-A<sup>d</sup> restricted Ova peptide, which did not activate popliteal lymph node cells from Tp176 immunized mice (Figure 1c). Our results identified three different I-A<sup>d</sup> restricted epitopes of TPmy, and also showed a hierarchy between them; Tp176 was a clear immunodominant epitope whereas Tp376 and Tp379 behaved as secondary epitopes. These data are in agreement with Lacleite and co-workers, who showed that T

cell responses in BALB/c mice were located near the amino terminus of TPmy (8). In addition they were similar to CD4<sup>+</sup> T cell epitopes described in other systems where an epitope hierarchy has also been observed (11,15).

Few reports about CD4<sup>+</sup> T cell epitopes derived from helminth antigens are available (17). Our knowledge about the cellular responses of parasitic diseases in human or experimental models is scarce. In cestodiasis, and particularly in cysticercosis, the information on CD4<sup>+</sup> T cell epitopes is null, in spite of it having been demonstrated that CD4<sup>+</sup> T cell response plays a critical role in experimental cysticercosis (9,10). In this context, the reactivity of Tp176 offers the possibility of manipulating the outcome of CD4<sup>+</sup> T cell responses in cysticercosis, for the development of a vaccine or to study the Tp176 specific CD4<sup>+</sup> T cell receptor repertoire analysis. Preliminary results suggest a possible Th1 response by IgG2a increase in serum from Tp176 immunized BALB/c mice. However, it is necessary to identify the cytokines profile produced by CD4<sup>+</sup> T cells specific to Tp176. Additionally, it would be interesting to define the residues critical for CD4<sup>+</sup> T cell activation and proliferation. In summary identification of prominent T cell epitopes from TPmy offers the possibility of understanding how the CD4<sup>+</sup> T cell response is involved in protection and how it is implicated in susceptibility to infection. In addition if we take into consideration that human and pig, the natural host of *Taenia solium*, mount a strong immune response against this antigen. The results observed using the mouse model might be also useful to understand the immune response against all type cysticercosis.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Victor Hugo Rosales for the excellent assistance in FACSCalibur operation; Alberto Diaz for peptides synthesis. This project was partially supported by grant 28967-M from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT).

#### REFERENCES

- Steel C, Limberger RJ, McReynolds LA, Ottesen EA & Nutman TB. B cell responses to paramyosin. *J Immunol* 1990; **145**: 3917–3923.

- Ribeiro de Jesus A, Araujo I, Bacellar O *et al*. Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. *Infect Immun* 2000; **68**: 2797–2803.
- Mublschiegel F, Sygulla L, Frosch P & Frosch M. Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of tegumental antigen. *Parasitol Res* 1993; **79**: 660–666.
- Laclette JP, Rodriguez M, Landa A *et al*. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leidena* Year?; **57**: 115–122.
- Pearce EJ, James SL, Hienny S, Lanar DE & Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5678–5682.
- Li BW, Chandrashekar R & Weil GJ. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J Immunol* 1993; **150**: 1881–1885.
- Ramirez BL, Kurtis JD, Wiest PM *et al*. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* Year?; **18**: 49–52.
- Vázquez-Talavera J, Solís C, Terrazas L & Laclette JP. Characterization and protective potential of immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 2001; **69**: 5412–5416.
- Terrazas L, Bojalil R, Govezensky T & Larralde C. Shift from an early protective th1-type immune response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1998; **84**: 74–81.
- Rodriguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satooskar AR & Terrazas LI. Susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 2002; **168**: 3135–3139.
- Sette A, Buus S, Colon S, Miles C & Grey H. I-A<sup>d</sup>-binding peptides derived from unrelated protein antigens share a common structural motif. *J Immunol* 1988; **141**: 45–48.
- Robertson JM, Jensen PE & Evavold BD. DO11-10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323–339 epitope. *J Immunol* 2000; **164**: 4706–4712.
- Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; **85**: 5409–5413.
- Lyons B & Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Meth* 1994; **171**: 131–137.
- Bartnes K, Leon F, Briand JP, Travers P & Hannestad K. A novel first primary anchor extends the MHC class II I-A<sup>d</sup> binding motif to encompass nine amino acids. *Int Immunol* 1997; **9**: 1185–1193.
- Reizis B, Eisenstein M, Mor F & Cohen R. The peptide-binding strategy of the MHC class II I-A molecules. *Immunol Today* 1998; **19**: 212–216.
- Hernandez HJ, Edson CM, Harn DA, Iannelli CJ & Stadecker MJ. *Schistosoma mansoni*: Genetic restriction and cytokine profile of the CD4<sup>+</sup> T helper cell response to dominant epitope of major egg antigen Sm-p40. *Exp Parasitol* 1998; **90**: 122–130.

# Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2

Héctor Samuel López-Moreno, Dr en C.<sup>(1)</sup>

López-Moreno HS.  
Cestodiasis tisulares: participación  
de los linfocitos T cooperadores 1 y 2.  
Salud Pública Mex 2002;44:145-152.

El texto completo en inglés de este artículo está  
disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

López-Moreno HS.  
Tisular cestodiasis: The role  
of T helper cell subsets 1 and 2.  
Salud Pública Mex 2002;44:145-152.  
The English version of this paper  
is available at: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

## Resumen

La cisticercosis y la hidatidosis son las parasitosis causadas por los metacéstodos de *Taenia solium* y de *Echinococcus multilocularis* (o *E. granulosus*), respectivamente. El estudio de las enfermedades parasitarias ofrece uno de los mejores modelos *in vivo* para el estudio de la división efectora de las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup>, designadas Th1 y Th2 de acuerdo con el patrón de citocinas que producen. La polarización hacia alguno de estos fenotipos puede marcar la diferencia entre una respuesta inmune celular protectora o una respuesta inmune permisiva para la infección. La participación de los linfocitos Th1 y Th2 en las cestodiasis tisulares (cisticercosis e hidatidosis) ha sido estudiada en modelos experimentales de ratón y en pacientes humanos; en ambos casos los resultados sugieren que en los individuos con cisticercosis o hidatidosis la respuesta inmune celular está polarizada hacia un fenotipo Th2. En tanto que en los individuos donde los parásitos son destruidos, o su desarrollo está limitado, la respuesta inmune celular se encuentra polarizada hacia un fenotipo Th1. El texto completo en inglés de este artículo está disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Palabras clave: cisticercosis; equinococosis; linfocitos T auxiliares-inductores 1 (Th1); linfocitos T auxiliares-inductores 2 (Th2)

## Abstract

Cysticercosis and hydatidosis are parasitic diseases caused by larvae of *Taenia solium* and *Echinococcus* sp., respectively. Parasitic diseases are useful models for *in vivo* studies of effector functions of T helper cell subsets 1 and 2, (called Th1 and Th2 on the basis of the pattern of cytokines they produce). The polarization to Th1 or Th2 is related to protective or permissive immune responses in these diseases. The role of Th1 and Th2 lymphocytes in tissue cestodiasis (cysticercosis and hydatidosis) has been studied in experimentally infected mice and in human patients; study results suggest that in individuals with cysticercosis or hydatidosis, the cellular immune response is polarized to Th2, while individuals in whom parasites are killed or their growth is limited, have an immune cellular response that is polarized towards Th1. The English version of this paper is available at: <http://www.insp.mx/salud/index.html>

Key words: cysticercosis; echinococcosis; T-lymphocytes, helper-inducer subset 1 (Th1); T-lymphocytes, helper-inducer subset 2 (Th2)

(1) Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional México, D.F., México.

Fecha de recibido: 29 de enero de 2001 • Fecha de aprobado: 19 de octubre de 2001

Solicitud de sobreiros: Dr. Héctor Samuel López Moreno, Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Avenida Instituto Politécnico Nacional No. 2508, colonia San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México, D.F., México.  
Correo electrónico: hlopez@mail.cinvestav.mx

La fase de activación de los linfocitos T vírgenes  $CD4^+$  o Th (del inglés "helper"), está dada por el reconocimiento de determinantes antigénicos presentados en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), expresadas sobre células presentadoras de antígeno profesionales, como células dendríticas, linfocitos B y macrófagos. La especificidad de la respuesta inmune evocada por estos linfocitos T  $CD4^+$  está dada por la expansión selectiva de las clonas capaces de reconocer dichos determinantes antigénicos, y de diferenciarse en células efectoras que contribuyen a la protección del organismo contra diferentes agentes infecciosos. Las parasitosis humanas continúan siendo uno de los principales problemas de salud en el mundo. No obstante el gran esfuerzo invertido por diferentes grupos de investigación aún no se dispone de una vacuna comercial contra ninguna parasitosis humana. Lo cual indica claramente el insuficiente entendimiento que se tiene acerca de los mecanismos inmunes protectores

contra los parásitos, así como también ilustra los sofisticados mecanismos de evasión inmune de los parásitos. Últimamente se han hecho avances muy importantes en el conocimiento de la respuesta inmune contra parásitos. Una de las observaciones clave para el control o el favorecimiento de las parasitosis es la polarización de la respuesta inmune de los linfocitos T  $CD4^+$  en Th1 o Th2.<sup>1</sup> Esta clasificación se hizo de acuerdo con el patrón de citocinas producidas por estas células (figura 1).<sup>2</sup> Los linfocitos Th1 secretan interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada. Por su parte, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de inmunoglobulina E (IgE) e IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos), y promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mas-

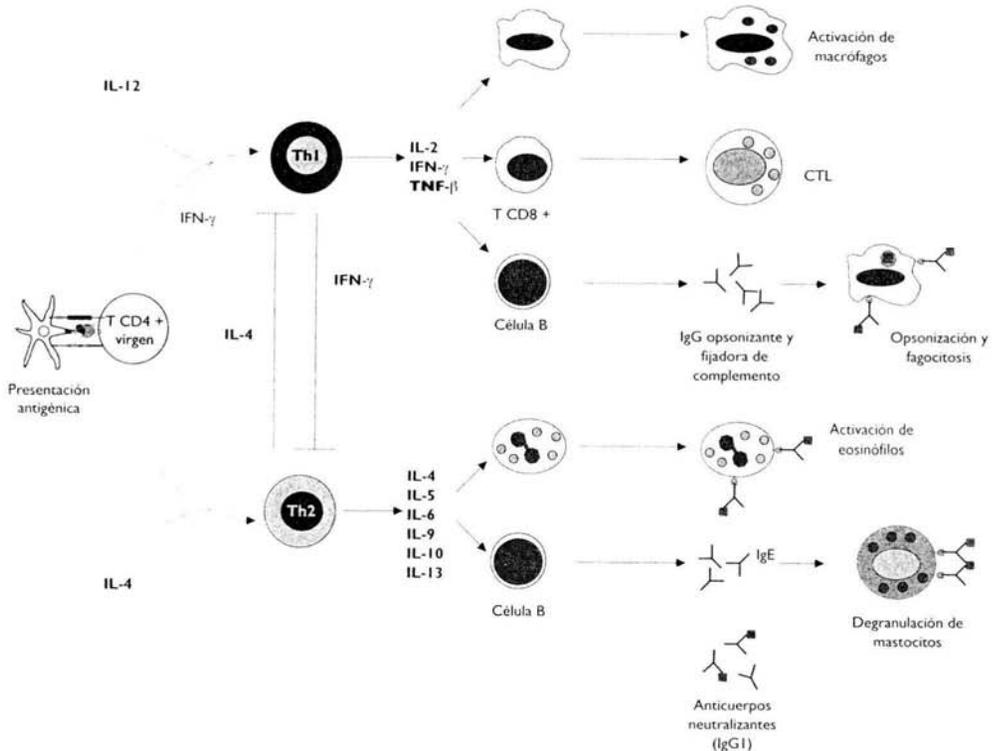


FIGURA 1. FUNCIONES EFECTORAS DE LAS SUBPOBLACIONES T  $CD4^+$  (Th1 y Th2). MODIFICADO DE ABBAS Y COLABORADORES, 1996<sup>5</sup>

tocitos. Debido a estas funciones, el fenotipo Th2 se ha asociado con alergias. Existe otra subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que produce una mezcla de citocinas Th1/Th2 a la cual se le ha denominado Th0.<sup>3,7</sup>

Esta dicotomía de los linfocitos Th (Th1/Th2) se evidenció inicialmente en clones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de ratón, y posteriormente se demostró *in vivo* en ratones infectados con *Leishmania major*.<sup>1,8</sup>

En términos generales, la polarización de la respuesta inmune en Th1 o Th2 es más evidente en el caso de las parasitosis producidas por protozoarios, o bien por nemátodos intestinales en donde abundan ejemplos ampliamente documentados.<sup>1</sup> No es el caso para las parasitosis tisulares, dentro de las cuales el *Schistosoma* ha sido ampliamente estudiado<sup>1</sup> y se inicia así el estudio inmunológico de céstodos de los géneros *Taenia* y *Echinococcus*.

*Taenia* sp. y *Echinococcus* sp., pertenecientes a la clase *Cestoida*, tienen un ciclo de vida que es muy similar (figura 2), ya que dependen de un hospedero intermediario que al ingerir sus huevecillos permite el desarrollo del estadio larvario, que puede ser un cisticercos o quiste hidatídico (con localización extraintestinal); el ciclo se completa cuando el hospedero intermediario es ingerido por el definitivo, en cuyo intestino se desarrolla el estadio adulto. Tanto para *Taenia* sp., como para *Echinococcus* sp., el humano es el hospedero intermediario accidental.<sup>9</sup>

Con el fin de elucidar la participación de las subpoblaciones de linfocitos T en la respuesta inmune

protectora o permisiva en cestodiasis tisulares (cisticercosis e hidatidosis), se han llevado a cabo diversos estudios en modelos experimentales y en humanos. La revisión de estos estudios es el objetivo del presente trabajo.

## Participación de los linfocitos T cooperadores CD4<sup>+</sup> en cestodiasis tisulares

### Cisticercosis

#### Cisticercosis experimental

Los principales modelos experimentales empleados para el estudio de la cisticercosis son *T. taeniaeformis* en rata y ratón, y *T. crassiceps* en ratón. Otro modelo que también ha sido empleado es el de *T. pisiformis* en conejo; sin embargo, este modelo tiene algunas desventajas, ya que es sustancialmente más caro y no ofrece la homogeneidad genética que proporcionan las cepas de roedores.<sup>10</sup>

El modelo de cisticercosis por *T. taeniaeformis* asemeja en mucho a la infección natural. En este modelo se observó que la destrucción del estadio oncosférico del parásito, que previene el desarrollo de los cisticercos, está mediada principalmente por anticuerpos del subtipo IgG2a y complemento.<sup>10-12</sup> Además, esta resistencia puede ser transferida pasivamente a roedores recipientes.<sup>11</sup> Debido a dificultades metodológicas con

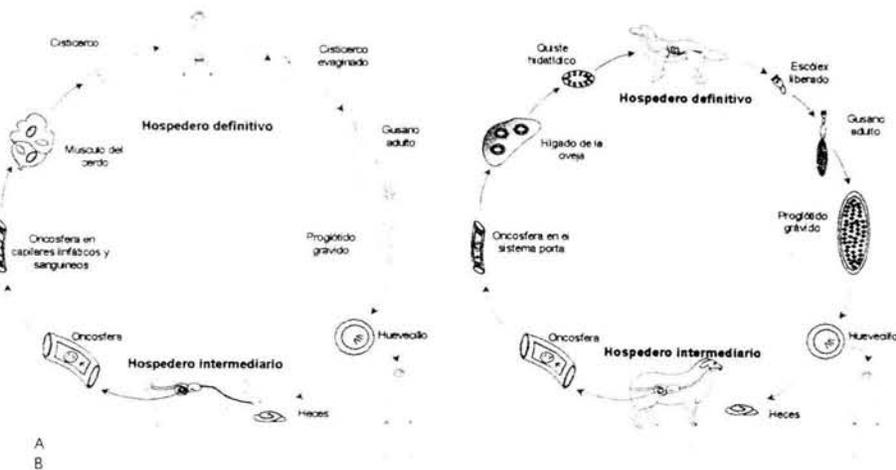


FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE CÉSTODOS DEL ORDEN CICLOPHYLLEA. A) CICLO VITAL DE *TAENIA SOLIUM*. B) CICLO VITAL DE *ECHINOCOCCUS* SP

el modelo de *T. taeniaformis*, actualmente el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* en ratón es el más empleado para estudiar la participación de los linfocitos Th en esta parasitosis.<sup>13-16</sup> La importancia de la respuesta inmune timo-dependiente se puso en evidencia al infectar ratones BALB/c timectomizados con cisticercos de *T. crassiceps*, observándose un gran incremento en la carga parasitaria respecto de ratones testigo.<sup>13</sup> Estos resultados sugirieron la importancia de los linfocitos Th para limitar el desarrollo del cisticercos de *T. crassiceps*.

Diversos estudios se han orientado a caracterizar el fenotipo de la respuesta inmune Th1/Th2 con base en los perfiles de citocinas.<sup>14-19</sup> En las etapas tempranas de esta infección experimental, alrededor de la primera semana posinfección (p.i.), el tipo de respuesta inmune predominante es Th1, la cual se asocia con un desarrollo limitado del parásito.<sup>15,16</sup> A medida que la infección progresa, la respuesta inmune se polariza hacia un fenotipo Th2 con un incremento concomitante en la carga parasitaria.<sup>16</sup> Hasta la fecha no se conocen con detalle los mecanismos que modulan el cambio en la subpoblación predominante; sin embargo, se postula que tanto factores del hospedero como del parásito podrían jugar un papel relevante. Lo anterior quedó confirmado por Terrazas y colaboradores en 1998, quienes demostraron que al tratar ratones infectados con IFN- $\gamma$  e IL-2 recombinantes, o con anticuerpos anti-IL-10, se incrementaba la resistencia a la parasitosis a las cuatro semanas p.i. ya que el número de cisticercos disminuía significativamente.<sup>17</sup> En analogía con lo que se ha descrito para el *Schistosoma*, en donde el cambio de Th1 a Th2 modula la progresión de los granulomas, Robinson y colaboradores en 1997 proponen que la respuesta Th1 podría jugar un papel muy importante, tanto en la patogénesis de la enfermedad como en la destrucción inicial del parásito. Toenjes y colaboradores en 1999 detectaron un incremento en la población de linfocitos T  $\gamma\delta$  en los exudados peritoneales de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* a partir de los 10 días p.i., lo que condujo a estos autores a pensar que esta población de linfocitos T podría tener un papel relevante en la cisticercosis por *T. crassiceps*. Sin embargo, cuando probaron su hipótesis empleando ratones deficientes para la cadena  $\delta$ , esta idea quedó descartada, ya que al evaluar los niveles séricos de las citocinas reguladoras de las subpoblaciones Th (IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$ ) así como el grado de carga parasitaria, no se encontraron diferencias respecto de los ratones de tipo silvestre. Lo anterior sugiere que esta población de linfocitos T no participa en la inmunidad contra el metacéstodo.<sup>18,19</sup>

Recientemente, Cardona y colaboradores describieron en 1999 un nuevo modelo de cisticercosis ex-

perimental para estudiar la neurocisticercosis (NC). Este modelo se basó en la infección intracraneal de ratones BALB/c con el metacéstodo del parásito *Me-socestoides corti*. Mediante cinéticas p.i. Cardona y colaboradores evaluaron la distribución del metacéstodo en el cerebro de los ratones infectados, las poblaciones celulares del sistema inmune presentes en el cerebro de estos ratones, así como los perfiles de citocinas que predominaban. Los resultados mostraron que a partir de la tercera semana p.i. más de 50% de los metacéstodos se localizaban en el parénquima. En tanto que, a partir de la primera semana p.i., la población de linfocitos T que predominaba en la región extraparenquimal o parenquimal, era del fenotipo T  $\gamma\delta$ , cuyo repertorio está constituido predominantemente por V $\delta$ 4, V $\gamma$ 4 y V $\delta$ 6.3. De acuerdo con el perfil de citocinas, a partir de la primera semana p.i. el fenotipo predominante fue Th1, siendo esto más claro en la región extraparenquimal, donde se detectaron IL-2, IL-12, IL-15 e IFN- $\gamma$ , mientras que sólo IL-12 e IFN- $\gamma$  fueron detectados en el parénquima aunque en menor proporción. A diferencia de lo que ocurre en el peritoneo, en este modelo predominaron los linfocitos T  $\gamma\delta$ ; no obstante, los autores no van más allá de la simple descripción de sus datos y omiten mencionar la integridad o el daño de los metacéstodos. Esta información podría ser complementada realizando estudios en ratones deficientes en linfocitos T  $\gamma\delta$ .<sup>20</sup>

#### Cisticercosis humana

Los datos que se tienen sobre la respuesta inmune celular en cisticercosis humana son escasos.

Del Brutto y colaboradores en 1991 tipificaron el patrón genético de HLA en un grupo de pacientes mexicanos mestizos con NC. Una de las diferencias más notables fue que los pacientes tenían una baja frecuencia del alelo DQw2 respecto del grupo testigo (4.2% contra 31.7%).<sup>21</sup> Ostrozky-Zeichner y colaboradores, en 1996, encontraron que las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  e IL-6 estaban aumentadas en muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con NC respecto del grupo testigo, lo cual no es sorprendente ya que sólo estudiaron formas activas de NC.<sup>22</sup> Por su parte, Evans y colaboradores en 1998 encontraron un aumento en los niveles de IL-5 en LCR de pacientes con NC, comparado con el grupo testigo. El incremento de esta citocina en los pacientes sugiere que, al igual que en la cisticercosis experimental, el fenotipo Th2 está relacionado con la permisividad de la enfermedad.<sup>23</sup> Restrepo y colaboradores en 1998 reportaron que la respuesta de linfocitos Th en pacientes con NC podría ser Th1. Estos resultados deben tomarse con reserva, ya que de los cuatro pacientes incluidos en el estudio,

solamente a uno de ellos se le analizaron las citocinas de ambos fenotipos.<sup>24</sup> Recientemente, Grewal y colaboradores publicaron un análisis de la respuesta Th en pacientes con NC utilizando células mononucleares de sangre periférica; no obstante que los autores proponen que la respuesta está polarizada hacia Th1, sus datos no son muy contundentes, ya que las concentraciones de las citocinas que evaluaron (IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ), en 15 pacientes con NC, son muy similares a las obtenidas con el grupo testigo.<sup>25</sup>

### Hidatidosis

#### Hidatidosis experimental

En hidatidosis también se han empleado modelos de ratón para estudiar la participación de los linfocitos Th; en este caso se tiene la ventaja de usar la misma especie que infecta al humano (*E. multilocularis*), lo cual no es posible en la cisticercosis.

La hidatidosis ha sido clasificada como primaria o secundaria de acuerdo con el desarrollo del metacéstodo. La hidatidosis primaria comprende las primeras seis o siete semanas p.i. en las cuales el quiste presenta un desarrollo lento. En la hidatidosis secundaria el quiste presenta un desarrollo acelerado a partir de la octava semana p.i.<sup>26</sup> Estos datos sugieren que la respuesta inmune celular en los ratones con hidatidosis crónica puede estar polarizada hacia el fenotipo Th2, que permite el desarrollo del parásito *in vivo*. En uno de los primeros estudios se evaluó la hipersensibilidad retardada en ratones con hidatidosis primaria o secundaria, mediante la inflamación del cojinete plantar en respuesta al estímulo con un extracto crudo de *E. multilocularis*. Las diferencias principales se observaron a las 48 h, tiempo en el cual la inflamación había disminuido aproximadamente tres veces en ratones con hidatidosis secundaria respecto a los ratones con hidatidosis primaria.<sup>26</sup> Estos datos sugieren que la respuesta Th1 puede estar disminuida en los ratones con hidatidosis crónica.

Con la finalidad de elucidar la participación de los linfocitos T y B en el desarrollo del quiste hidatídico se infectaron ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID) y ratones C.B-17. Ambas cepas cuentan con el mismo fondo genético, pero los ratones SCID carecen de linfocitos T y B por tener defectuoso el gen que codifica para la enzima proteínaasa dependiente del ácido desoxirribonucleico (del inglés "DNA-dependent protein kinase"). Los ratones SCID permitieron un mayor crecimiento del metacéstodo en la etapa secundaria respecto al grupo testigo (ratones C.B-17). En los ratones SCID los quistes

llegaron a pesar hasta 17.5 g mientras que en los C.B-17 el peso osciló alrededor de 1 g.<sup>27</sup> En 1992 Liance y colaboradores analizaron, en el curso de la infección con *E. multilocularis* en ratones de la cepa AKR, el efecto de la ciclosporina A (CsA), droga que unida a la ciclofilina inhibe la activación del linfocito T al bloquear la acción de calcineurina. Un grupo fue tratado con CsA al día 45 p.i., mientras que otro fue tratado con CsA antes de la infección y hasta el día del sacrificio (día 80). En el primer grupo la carga parasitaria prácticamente no se modificó respecto al grupo testigo infectado y no tratado, en cambio en el segundo grupo este parámetro aumentó significativamente.<sup>28</sup> De los estudios anteriores es posible concluir que los linfocitos T (y en particular Th1), y B tienen un papel fundamental para el control de la hidatidosis.

Emery y colaboradores en 1997 efectuaron un estudio orientado a definir el fenotipo de respuesta Th que confiere resistencia a la infección hidatídica secundaria, empleando cuatro cepas de ratones, las A/J, C57BL/6, DBA/1, y BALB/c; las dos primeras consideradas como las más resistentes y las dos últimas las más susceptibles. Estos autores demostraron que la resistencia al desarrollo de los parásitos en los ratones A/J se asoció con una fuerte respuesta proliferativa de esplenocitos antígeno-específicos *in vitro*, así como también con un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 inducidos por los antígenos de *E. multilocularis*. En tanto que la susceptibilidad de los ratones BALB/c se asoció con altos niveles de IL-4.<sup>29</sup> Estos resultados les permitieron concluir que la resistencia a esta parasitosis está mediada por una respuesta inmune Th1. Lo anterior es consistente con los datos obtenidos en los modelos de cisticercosis experimental.<sup>16-18</sup>

Amiot y colaboradores en 1999 analizaron la participación de TNF- $\alpha$  y linfotóxina  $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) en la equinococosis alveolar, generando ratones homocigotos deficientes en ambas citocinas. Al comparar la carga parasitaria de estos ratones deficientes para ambas citocinas, con la de ratones silvestres, observaron un incremento de este parámetro en los ratones deficientes. En muchos de los ratones silvestres las lesiones hepáticas involucionaron. Los parásitos muertos fueron "acordonados" por granulomas conformados por numerosos macrófagos y linfocitos que conducían a una fibrosis focal hepática en etapas tempranas de la infección. En contraste, muchos ratones deficientes albergaban metacéstodos mezclados con leucocitos, en abscesos purulentos con una amplia fibrosis irregular secundaria, en la etapa tardía de la infección. Este estudio muestra que TNF- $\alpha$  y LT- $\alpha$  tienen una participación esencial en los mecanismos de protección contra *E. multilocularis*.<sup>30</sup>

## Hidatidosis humana

La hidatidosis humana se ha asociado con una disminución de la función de los linfocitos T *in vitro*.<sup>31</sup> Profumo y colaboradores en 1994 analizaron la respuesta inmune celular antígeno específica en 18 pacientes con hidatidosis contra las subunidades del antígeno 5 y B de *E. granulosus* en células mononucleares de sangre periférica, posiblemente con la finalidad de delimitar la o las regiones correspondientes a los determinantes antigénicos para los linfocitos Th del antígeno 5. Dicho antígeno es una lipoproteína termolábil que presenta dos subunidades de 55 y 65 kDa en geles de poli-acrilamida que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones no reductoras. El antígeno B es una lipoproteína termoestable que presenta tres subunidades de 12, 16 y 20 kDa en SDS-PAGE en condiciones no reductoras y reductoras.<sup>32</sup> Los resultados de estos autores muestran que la subunidad de 55 kDa del antígeno 5 y la subunidad de 20 kDa del antígeno B son las que inducen mayor respuesta proliferativa respecto a los testigos.<sup>31</sup> Kharebov y colaboradores en 1997 también realizaron ensayos de proliferación celular antígeno específico empleando el antígeno B. Ellos analizaron las muestras de 41 pacientes, de los cuales 83% respondieron positivamente. No obstante, no ensayaron la antigenicidad de cada subunidad de este antígeno, por lo que su trabajo no hace ninguna aportación adicional a lo descrito por Profumo y colaboradores.<sup>33</sup>

Sturm y colaboradores en 1995 reportaron que la IL-5 era la citocina producida predominantemente por las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con hidatidosis, por lo que la respuesta Th2 también estaría favoreciendo la enfermedad, como en el caso de la cisticercosis.<sup>23,34</sup>

Recientemente, Dreweck y colaboradores en 1999 analizaron algunas citocinas y quimiocinas producidas por células mononucleares de sangre periférica de pacientes, en respuesta al estímulo con metacéstodos vivos de *E. multilocularis*. Las quimiocinas que analizaron fueron la IL-8 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), en tanto que las citocinas que evaluaron fueron la IL-12 e IL-13. Tanto las citocinas como las quimiocinas analizadas en este trabajo eran producidas mayormente por los leucocitos de pacientes comparado con el grupo testigo. Dreweck y colaboradores sugieren que estas citocinas relacionadas con respuestas tipo Th1 y Th2, así como las quimiocinas detectadas, pueden iniciar mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés "antibody-dependent cellular cytotoxicity"), y que esta respuesta puede comprometer la progresión de la pa-

rasitosis;<sup>35</sup> sin embargo, esta suposición no concuerda con ninguno de los trabajos descritos arriba, donde el fenotipo Th2 parece estar involucrado en la permisión de la hidatidosis. Es importante señalar que la ADCC es un mecanismo dependiente del fenotipo Th2, por lo que éste no parece ser el mecanismo efector contra el metacéstodo de *Echinococcus*.

## Conclusiones

Los datos revisados en el presente trabajo sugieren que las condiciones inmunológicas más favorables para el desarrollo del cisticercos o del quiste hidatídico, en el humano y en el ratón, están asociadas con el tipo Th2. Por lo tanto, es posible concluir que el fenotipo que está relacionado con una respuesta inmune protectora o no permisiva para el desarrollo de estas cestodiasis es del fenotipo Th1. No obstante que prácticamente todos los trabajos sugieren la relevancia de la respuesta Th1 para el control de estas parasitosis, en ninguno de ellos se propone algún mecanismo efector para intentar esclarecer cómo este fenotipo podría combatir a estos parásitos. Además, ninguno de ellos describe algún determinante antigénico para linfocitos Th de estos parásitos, que pudiera estar participando en la polarización de la respuesta hacia un fenotipo permisivo (Th2), o bien, hacia un fenotipo protector (Th1). Por otro lado, se ha relacionado la disminución de los niveles séricos de testosterona en ratones machos BALB/c infectados con cisticercos de *T. crassiceps*, con un incremento en la carga parasitaria durante la etapa crónica p.i. De acuerdo con Morales y colaboradores, ello pudiera deberse a una posible desregulación del fenotipo Th1,<sup>36,37</sup> a pesar de que no muestran formalmente cambios del patrón de linfocitos Th como se han descrito en el modelo de infección por *Plasmodium chabaudi*, donde se ha observado que la testosterona participa en la regulación de Th1.<sup>38</sup>

Aunque no se ha propuesto un mecanismo efector contra el cisticercos o el quiste hidatídico, es posible que la secuencia de eventos que conducen a la destrucción de ambos metacéstodos sea muy similar. Retomando los estudios histopatológicos de la cisticercosis porcina, que han permitido clasificar las etapas a través de las cuales se lleva a cabo la destrucción del metacéstodo, descritas por de Aluja y Vargas en 1988,<sup>39</sup> la secuencia de eventos podría ser la siguiente: en las etapas tempranas la "primera línea de ataque" está formada principalmente por eosinófilos; sin embargo, contrario a lo descrito para diferentes nemátodos y algunas especies de *Schistosoma*,<sup>40</sup> al cisticercos aparentemente no le ocasionan daños importantes. En la etapa tardía, cuando el tegumento del parásito empieza a

degenerarse se coincide con la presencia de macrófagos, los cuales se alinean en forma de palizadas (células epitelioides) alrededor del metacéstodo; en estas etapas se observa un incremento en los agregados de linfocitos donde los T presentes pueden diferenciarse a Th1 por la IL-12 producida por los macrófagos y, a su vez, estos linfocitos Th1 pueden activar a otros macrófagos presentes en el microambiente, mediante la producción de IFN- $\gamma$ . Finalmente, los macrófagos activados pueden secretar factores de crecimiento de células mesenquimatosas, favoreciendo de esta manera la fibrosis que se observa en la etapa final, posterior a la destrucción del metacéstodo.

Será necesario continuar con los estudios con el fin de elucidar con precisión los mecanismos efectores de la respuesta inmune Th involucrados en la eliminación de estos céstodos, dentro de lo cual la identificación de los determinantes antigénicos será un componente fundamental.

### Agradecimientos

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Patricia Talamás Rohana por su valiosa asesoría y apoyo en la escritura del presente trabajo, así como también por sus críticas y comentarios. Agradezco a la Dra. Dolores Correa Beltrán por sus sugerencias.

### Referencias

- Pearce E, Scott P, Sher A. Immune regulation in parasitic infection and disease. En: Paul W, ed. *Fundamental immunology*. 4ª edición. México, D.F.: Lippincott-Raven, 1999:1271-1294.
- Mossman T, Cherwinsky H, Bond M, Gieldin M, Coffman R. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-283.
- Constant S, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997;15:297-322.
- Abbas A, Murphy K, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-793.
- Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227-257.
- Reiner S, Locksley R. The worm and the protozoa: Stereotyped responses or distinct antigens? *Parasitol Today* 1993;9:258-260.
- Sher A, Gazzinelli R, Oswald I, Clerici M, Kullberg M, Pearce E et al. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev* 1992;127:183-203.
- Beck W, Davies J. *Parasitología médica*. 3a. edición. México, D.F.: Interamericana, 1984.
- Williams J, Engelkirk P, Lindsay M. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lalette J, ed. *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Nueva York (NY): Academic Press, 1982:621-632.

- Leid R, Williams J. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. *Immunology* 1974;27:195-207.
- Mitchell G. Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*. Analysis of host-protective immunity and immune evasion. En: Flisser A, Willms K, Lalette J, ed. *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Nueva York (NY): Academic Press, 1982:575-584.
- Bojalil R, Terrazas L, Govezensky T, Sciuotto E, Larralde C. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1993;79:384-389.
- Villa O, Kuhn R. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant energy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 1996;112:561-570.
- Robinson P, Atmar R, Lewis D, White C. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 1997;65:2925-2931.
- Terrazas L, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1998;84:74-81.
- Terrazas L, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo F, Larralde C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 1999;85:135-141.
- Toenjes S, Spolski R, Mooney K, Kuhn R. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* 1999;118:623-633.
- Toenjes S, Spolski R, Mooney K, Kuhn R.  $\gamma\delta$  T cells do not play a major role in controlling infection in experimental cysticercosis. *Parasitology* 1999;119:413-418.
- Cardona A, Restrepo B, Jaramillo J, Tale J. Development of an animal model for neurocysticercosis: Immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of  $\gamma\delta$  T cells. *J Immunol* 1999;162:995-1002.
- Del Brutto O, Granados G, Talamás O, Sotelo J, Gorodetzky C. Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, DR and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis. *Hum Biol* 1991;63:85-93.
- Ostrosky-Zeichner L, García-Mendoza E, Rios C, Sotelo J. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch Med Res* 1996;27:513-517.
- Evans C, García H, Hartnell A, Gilman R, José P, Martínez M et al. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun* 1998;66:4522-4525.
- Restrepo B, Llaguno P, Sandoval M, Enciso J, Teale J. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: Central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol* 1998;89:64-72.
- Grewal J, Kaur S, Bhatti G, Singh I, Ganguly N, Mahajan R et al. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 2000;86:500-503.
- Ali-Khan Z. *Echinococcus multilocularis*: Cell-mediated immune response in early and chronic alveolar murine hydatidosis. *Exp Parasitol* 1978;46:157-165.
- Playford M, Ooi H, Oku Y, Kamiya M. Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in severe combined immunodeficient (SCID) mice: Biphasic growth of the larval cyst mass. *Int J Parasitol* 1992;22:975-982.
- Liance M, Bresson-Hadni S, Vuitton D, Lenys D, Carbillet J, Houin R. Effects of cyclosporin A on the course of murine alveolar echinococcosis and on specific cellular and humoral immune responses against *Echinococcus multilocularis*. *Int J Parasitol* 1992;22:23-28.
- Emery I, Liance M, Leclerc C. Secondary *Echinococcus multilocularis* infection in A/J mice: Delayed metacystode development is associated with Th1 cytokine production. *Parasite Immunol* 1997;19:493-503.
- Amiot F, Vuong P, Defontaine M, Pater C, Dautry F, Liance M. Secondary alveolar echinococcosis in lymphotoxin- $\alpha$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  deficient mice: Exacerbation of *Echinococcus multilocularis* larval growth is associated with cellular changes in the periparasitic granuloma. *Parasite Immunol* 1999;21:475-483.

31. Lightowlers M. Immunology and molecular biology of *Echinococcus* infections. *Int J Parasitol* 1990;20:471-478.
32. Profumo E, Ortona E, Rigano R, Gioia I, Notargiacomo S, Ioppolo S et al. Cellular and humoral responses to antigenic subunits of *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol* 1994;16: 393-398.
33. Kharebov A, Nahmias J, El-on J. Cellular and humoral immune responses of hydatidosis patients to *Echinococcus granulosus* purified antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1997;57:619-625.
34. Sturm D, Menzel J, Gottstein B, Kern P. Interleukin-5 is the predominant cytokine produced by peripheral blood mononuclear cells in alveolar echinococcosis. *Infect Immun* 1995;63:1688-1697.
35. Dreweck C, Soboslay P, Schulz-Key H, Gottstein B, Kern P. Cytokine and chemokine secretion by human peripheral blood cells in response to viable *Echinococcus multilocularis* metacystode vesicles. *Parasite Immunol* 1999;21: 433-438.
36. Morales-Montor J, Rodríguez-Dorantes M, Mendoza-Rodríguez A, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. Differential expression of the estrogen-regulated proto-oncogenes *c-fos*, *c-jun*, and *bcl-2* and of the tumor-suppressor *p53* gene in the male mouse chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitol Res* 1998;84:616-622.
37. Morales-Montor J, Rodríguez-Dorantes M, Cerbón M. Modified expression of steroid 5  $\alpha$ -reductase as well as aromatase, but not cholesterol side-chain cleavage enzyme, in the reproductive system of male mice during (*Taenia crassiceps*) cysticercosis. *Parasitol Res* 1999;85:393-398.
38. Zhang Z, Chen L, Saito S, Kanagawa O, Sento F. Possible modulation by male sex hormone of Th1/Th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in mice. *Exp Parasitol* 2000;96:121-129.
39. De Aluja S, Vargas G. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 1988;28:65-77.
40. Behm C, Ovington K. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: Insights from genetically modified mice. *Parasitol Today* 2000;16:202-209.