

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

PAPEL DEL FACTOR DE METACÉSTODO DE *Taenia solium* EN LA INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INMUNOLOGÍA**

P R E S E N T A

M en C. LILIAN HERNÁNDEZ MENDOZA

DIRIGIDA POR

**DRA. PATRICIA M. TATO ZALDIVAR
DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO**

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en:

**Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Medicina, UNAM**

**Departamento de Genética Molecular
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

**Laboratorio de Hematología U-204
Hospital General de México O D**

Con el apoyo de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 30853-M)

Dirección de Investigación del Hospital General de México O D

COMITÉ TUTORAL

**Tutor Principal
Dra. Patricia M Tato Zaldivar**

**Tutor
Dr. José Luis Molinari Soriano**

**Tutor
Dr. Juan Pedro Laclette San Román**

**Aprobaron la tesis y conforman el Jurado para
examen de Doctorado en Ciencias Biomédicas:**

Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser

Dra. Patricia M Tato Zaldivar

Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo

Dra. Gladis Fragoso González

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Dr. José Luis Molinari Soriano

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO SINCERAMENTE

A los miembros del comité tutorial:

Dra. Patricia Tato Zaldivar

Dr. José Luis Molinari Soriano

Dr. Juan Pedro Laclette San Roman

Por guiarme durante el desarrollo de mi trabajo experimental, y por sus comentarios críticos, que me fueron formando y me permitieron alcanzar esta meta, "Gracias Maestros".

A los miembros del jurado:

Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser,

Dra. Patricia M Tato Zaldivar,

Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo,

Dra. Gladis Fragoso González,

Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo,

Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez,

Dr. José Luis Molinari Soriano,

por sus invaluable comentarios críticos y sugerencias que enriquecieron mi trabajo de tesis.

A los doctores:

Mario Gutiérrez Romero y Juan Collazo Jaloma,

porque sin su apoyo, no hubiera podido realizar mis estudios de doctorado.

A mis compañeros :

Dra. Isabel María Cortés Cuellar y Maestra en CB. Sandra Georgina Solano Gálvez,

por su gran colaboración en el desarrollo del trabajo experimental.

Dra. Esperanza Garrido,

por su asesoría, colaboración y compañía durante la realización de los ensayos de citometría de flujo.

Dra. Ana María Fernández Presas,

por su asesoría para la realización del material fotográfico.

M en C. José Antonio Ramírez Bárcenas,

por su apoyo técnico, que me permitió mejorar las gráficas y capturar la fotografías presentadas en este trabajo.

TL. Felicitas J Balseca Olivera, QC. Goujon A Palmeros Morgado, Margarita Huerta Rivera, QFB. Emma Mendoza García y Antonio Luna Cuevas,

por su paciencia, su colaboración y su apoyo durante todos estos años.

Dedico este trabajo a:

Mi adorada hija Sandra, gracias amor mío por la inmensa felicidad que das a mi vida, por tu alegría, por tu compañía durante los largos fines de semana en el laboratorio, por tu infinita paciencia, por ser mi mas grande incentivo y sobre todo por tu amor.

A mi amado esposo Ovidio, gracias por tu amor, por tu apoyo incondicional, por tu compañía, por tu paciencia y por tus palabras de apoyo que me sirvieron de estímulo en los momentos mas difíciles, te adoro mi amor.

A mis adorados padres y hermanos, gracias por los incontables momentos de inmensa felicidad, por su apoyo incondicional y sobre todo por su infinito amor. **Papi**, siempre te recuerdo con inmenso amor. **Ma**, gracias por ser como eres, por tolerarme y por alentarme hasta la culminación de mis metas, te amo.

A mis sobrinos, Brenda, Melissa, Mauricio, Manolo y Diego, gracias por su alegría y su amor, los adoro.

A mis maestros Dra. Patricia Tato Zaldivar y Dr. José Luis Molinari Soriano, gracias por su invaluable apoyo, por sus consejos, por su paciencia y su tiempo, por su cariño y sobre todo por ser mis amigos, los quiero mucho.

A mis amigas:

M en C Guadalupe Maldonado Mercado, gracias por tu amistad, por todo tu apoyo, tu comprensión y cariño, por todo lo que me enseñaste y siempre estas dispuesta a compartir conmigo, de verdad amiga te quiero mucho.

Dra. Isabel Cortés, Isa gracias por ser tan buena amiga, por acompañarme en los momentos mas difíciles, gracias por tu amistad.

Dra. Ana María Fernández, gracias por tu alegría, tu cariño, por tan buenos momentos y por tu apoyo.

Dra. Esperanza Garrido, gracias por todo tu apoyo y sobre todo por las añoradas tardes de trabajo llenas de alegría y del constante recuerdo de nuestros orígenes.

A la Memoria de:

Dr. Romeo González Constandse, querido y recordado maestro, gracias por sus consejos siempre atinados tanto para mi vida profesional como personal, gracias por guiarme y darme su cariño y comprensión.

Sra. Irene, gracias por todas sus atenciones y su cariño para mi hija y para mi, la quiero mucho. Y gracias por su colaboración en este trabajo, por estar siempre al cuidado de nuestros animales de experimentación.

Lino gracias por tu amistad, tu compañía y por las largas y añoradas pláticas llenas de buenos recuerdos y de incontenibles risas.

- Índice
- Resumen
- Abstract
- Introducción
Inmunidad contra parásitos
- Antecedentes
Neurocisticercosis
- Justificación
- Hipótesis
- Objetivos
- Material y métodos
Factor de metacéstodos
Obtención de metacéstodos de *T. Solium*
Obtención del factor de metacéstodos
Separación de las fracciones del factor de metacéstodos
Actividad biológica del factor de metacéstodos
Obtención de antígenos de metacéstodos
Animales Experimentales
Diseño experimental
Implantación de metacéstodos de *T. solium*
Expresión de CD25 y citocinas
Obtención de células de bazo de ratón
Extracción de RNA y ensayos de RT-PCR
Detección de la expresión de CD25 y de citocinas intracelulares
Estudios Histopatológicos
Análisis estadístico
- Resultados
Actividad biológica del factor de metacéstodos
Fraccionamiento del factor de metacéstodos en Bio-gel P- 6 y actividad biológica de las fracciones
Estudio histopatológico
Determinación de mensajeros de citocinas
Expresión de CD25
Producción de citocinas intracelulares
- Discusión
- Conclusiones
- Bibliografía
- Palabras clave: Cisticercosis, Taenia solium, inmunorregulación, citocinas.

RESUMEN

Los metacéstodos de *T. solium* permanecen vivos durante largos periodos en los tejidos del hospedero. En cisticercosis humana y porcina, los metacéstodos vivos se encuentran rodeados de una escasa o nula reacción inflamatoria (periodo asintomático de la enfermedad) sin embargo, cuando envejecen, la reacción inflamatoria aumenta y destruye al parásito (periodo sintomático). El periodo asintomático sugiere modulación negativa de la respuesta inmune por el parásito. En este sentido, se han descrito moléculas producidas por el parásito que regulan la respuesta inmune del hospedero, el factor de metacéstodos (FM) es una de ellas. Experimentalmente, el FM disminuye la inflamación alrededor del parásito, las respuestas humorales y celulares específicas y no específicas, y la producción de citocinas *in vitro*, está constituido por una fracción supresora (F1) y una estimuladora (F2) de la proliferación de linfocitos T inducida por Con A. El propósito de este trabajo fue, determinar el efecto *in vivo* de la fracción F1 y de la implantación de metacéstodos sobre la expresión de CD25 y la expresión y producción de citocinas en linfocitos murinos CD4⁺ y CD8⁺ durante los primeros días de ambos tratamientos. Adicionalmente, se correlacionaron estos resultados con la reacción inflamatoria alrededor de los metacéstodos implantados. La expresión de CD25 fue determinada por citometría de flujo y la expresión y producción de citocinas se estimaron por RT-PCR y citometría de flujo respectivamente, 12 días después de la implantación o 4 días después de la última inoculación de la fracción F1 (5 dosis). Los resultados del RT-PCR mostraron que las células de los 2 grupos experimentales expresaron RNAm para IFN- γ , IL-2 e IL-4. El análisis de citometría de flujo mostró que, células CD4⁺ y CD8⁺ de ratones implantados o tratados con la fracción F1 presentaron una disminución significativa de células CD25⁺ ($p < 0.05$). La estimación de citocinas intracelulares mostró que, la producción de IL-2 e IL-4 en células CD8⁺ y de IFN- γ en células CD4⁺ de ratones implantados y la producción de IFN- γ , IL-2 e IL-4 en células CD8⁺ y de IL-2 en células CD4⁺ de animales tratados con la fracción F1 disminuyeron significativamente ($p < 0.05$). Los estudios de histopatología mostraron que, la inflamación alrededor de los metacéstodos estaba disminuida en los animales implantados y en los implantados y tratados con la fracción F1 en comparación a la observada en ratones inmunizados con antígenos del parásito. Estos resultados correlacionan con la disminución significativa de la expresión de CD25 y de la producción de citocinas en animales implantados e implantados y tratados con la fracción F1, lo que sugiere que esta fracción o bien las secreciones/excreciones de los metacéstodos vivos inducen inmunosupresión de la respuesta inmune *in vivo*.

ABSTRACT

T. solium metacestodes remained alive for long period of time in the host tissues. In human and porcine cysticercosis, live metacestodes are surrounded by a scarce or null inflammatory reaction (asymptomatic period) however, when parasites grow old, the inflammatory reaction increase destroying the parasite (symptomatic period). The asymptomatic period suggests down-modulation of the immune response. In this sense, immune response regulatory molecules produced by the parasite have been reported; metacestode factor (MF) is one of them. MF diminished experimentally the inflammatory response around parasites, the humoral and cellular specific and non-specific responses, and the production of cytokines *in vitro*. MF contains two different fractions: one of them suppresses the proliferation of lymphocytes induced by Con A (F1) and the other stimulates this response (F2). The aim of this work was to study in mice, the effect of the implantation and F1 inoculation on CD25 expression and on the expression and production of cytokines by CD4⁺ and CD8⁺ cells during the first days post-treatment. Additionally, the inflammatory reactions around implanted metacestodes were correlated to cytokines and CD25 expression. CD25 expression was determined by flow cytometry analysis and the expression and production of cytokines were estimated by RT-PCR and flow cytometry analysis respectively, 12 days after the implantation or 4 days after the last inoculation of F1 (5 doses). RT-PCR results showed that cells from the both groups expressed mRNA for IFN- γ , IL-2 and IL-4. Flow cytometry analysis revealed that CD4⁺ and CD8⁺ cells from implanted or F1-treated mice showed a significant decrease of CD25⁺ ($p < 0.05$). IL-2 and IL-4 in CD8⁺ cells and IFN- γ in CD4⁺ cells were decreased in implanted mice meanwhile IFN- γ , IL-2 and IL-4 in CD8⁺ and IL-2 in CD4⁺ cells were significantly decreased in mice treated with F1 ($p < 0.05$). Histopathology revealed that the inflammatory reaction around metacestodes was diminished in implanted and implanted and F1-treated mice in comparison with the inflammatory reaction observed in mice immunized with metacestode antigens. These results correlated well with the significant diminution of CD25 expression and cytokines production observed in implanted or implanted and F1-treated mice, suggesting that F1 as well as metacestode secretion/excretion products induced down-modulation of the immune response *in vivo*.

INTRODUCCION

Las enfermedades parasitarias representan un gran problema de salud pública en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que aproximadamente el 50% de la población mundial presenta infecciones parasitarias (3,500 millones de personas) que son la causa de millones de muertes al año (*Ascaris lumbricoides* 60,000 defunciones; otros nemátodos, en particular *Schistosoma*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Trichuris trichura* 65,000; *Entamoeba histolytica* 70,000; *Plasmodium* 1,000,000; etc.). Según reportes recientes (Ximenez y col., 2002; BINASSS, 2004) la cisticercosis se encuentra entre las parasitosis más frecuentes en la población mundial. A pesar de que estas infecciones presentan su mayor incidencia en países tropicales y subtropicales en vías de desarrollo, su prevalencia en países desarrollados es cada vez más importante debido a que los inmigrantes sufren frecuentemente parasitosis intestinales y en una gran proporción de casos, estas son múltiples (20–70%). Los niños y jóvenes constituyen la población más afectada (1 a 19 años), lo que genera deterioro de su estado nutricional y repercute en su crecimiento y desarrollo (Ximenez y col., 2002; OMS Boletín, 2004).

Los parásitos son inmunogénicos y generan gran diversidad de respuestas antiparasitarias tanto innatas como adaptativas en el hospedero, el tipo de respuesta depende del parásito implicado y de la fase de infección (Roitt y col., 2001; Abbas y Lichtman, 2004). Los parásitos presentan ciertas características moleculares de patogenicidad que les confieren especificidad por el hospedero (Maizels y col., 1993; Roitt y col., 2001). La mayoría de las infecciones parasitarias son crónicas debido a la capacidad del parásito para evadir y/o resistir

los mecanismos de defensa innatos y adaptativos. Así, algunos helmintos permanecen vivos por largos periodos en los tejidos, ya que han desarrollado mecanismos de evasión complejos que les permiten resistir la acción citocida de neutrófilos y macrófagos, neutralizar la acción de los anticuerpos y el complemento, y modular las respuestas inmunológicas celulares y humorales modificando el patrón de secreción de citocinas alterando así, la proliferación y los mecanismos efectores de las subpoblaciones celulares que prevalecerán en el sitio de la infección (Reiner y Locksley, 1995; Seder y Gazzinelli, 1998; Pearce y MacDonald, 2002).

Entre las diferentes estrategias de evasión de la respuesta inmune por el parásito están: el establecimiento de infecciones intracelulares en las que, el parásito queda protegido del ataque inmunológico; el desprendimiento de antígenos de su superficie; el mimetismo con las superficies celulares del hospedero ya sea expresando moléculas similares en su membrana o recubriéndose con proteínas del hospedero; y la variación antigénica de sus moléculas de superficie por acumulación gradual de mutaciones o por cambios fase-específicos. Mas aún, se ha descrito la supresión selectiva de la respuesta inmunológica del hospedero creando así un “estado de inmunoregulación” favorable para el establecimiento del parásito (Goldsby y col., 2004).

Inmunidad contra parásitos

Los helmintos presentan ciclos de vida complejos, que pueden involucrar tanto a hospederos intermediarios como definitivos. Después de la infección, el

parásito puede o no migrar a diferentes órganos, mientras se diferencia hasta alcanzar su forma adulta.

Los mecanismos efectores de la respuesta antiparasitaria son de gran importancia para la eliminación del parásito. En las fases tempranas de la infección, el parásito se enfrenta a mecanismos de defensa innatos (superficies epiteliales, sistema del complemento, procesos inflamatorios y células fagocíticas). Así, *Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*, debido a sus complejos ciclos de vida, deben enfrentarse a diversas superficies epiteliales (invasión cutánea, llegada al tejido pulmonar y su paso al intestino donde penetran la mucosa intestinal) que constituyen barreras mecánicas que retardan la entrada del parásito (Loukas y Prociv, 2001). Las superficies epiteliales íntegras (piel, epitelio respiratorio, epitelio digestivo, etc.) no solo constituyen una barrera física entre el medio ambiente y el organismo sino que poseen numerosos mecanismos de defensa innata. La piel cuenta con mecanismos termorreguladores, el pH (ácido 3-5), condiciones de estrés oxidativo por la existencia de productos de oxidación y radicales libres, secreta defensinas con capacidad antibiótica y antimicótica, cuenta con linfocitos intraepiteliales T CD8⁺γδ que reconocen antígenos asociados a moléculas CD1, y representan una primera línea de defensa, junto a macrófagos y polimorfonucleares, limitando la infección mientras se organiza una respuesta inmune específica. Mas aún, los queratinocitos secretan citocinas proinflamatorias y pueden funcionar como células presentadoras de antígeno (expresan moléculas HLA clase II inducibles) al igual que las células de Langerhans (Kuby y col., 1997; Roitt y col., 2001; Goldsby y col., 2004). En la mucosa de vías aéreas superiores,

los microorganismos se enfrentan a la presencia de enzimas hidrolíticas (como la lisozima), al atrapamiento por el moco y su arrastre por el movimiento mucociliar, a los macrófagos alveolares (célula terminal), y a la barrera alveolar en las vías aéreas inferiores. A nivel intestinal, se enfrentan a cambios en el pH, la flora bacteriana, y al aumento en el moco intestinal que recubre al parásito y facilita su expulsión junto con al arrastre mecánico consecuencia del aumento en el peristaltismo (Caballero, 1998; Roitt y col., 2001).

Por otro lado, sí bien no está clara la intervención directa del sistema de complemento en la eliminación de helmintos como mecanismo de inmunidad innata, su participación en la estimulación de la fagocitosis, en el aumento de la permeabilidad vascular y en la promoción de la inflamación es definitiva (Brostoff y col., 1994). A su vez, productos de la inflamación como leucotrienos y otros metabolitos producidos por la degradación del ácido araquidónico en la vía de la lipooxigenasa, influyen en la muerte dependiente de complemento de esquistosómulas de *Schistosoma mansoni* por eosinófilos, e incrementan el número de neutrófilos en el sitio de la infección. Específicamente, el leucotrieno B4 (LTB4) promueve *in vitro* la locomoción celular e incrementa los receptores de C3b constituyendo un importante mecanismo de amplificación en la inmunidad dependiente de IgE y complemento contra algunos helmintos (Moqbel y col., 1983).

En diferentes infecciones parasitarias intestinales, la inflamación es un evento inmunológico común que participa en la defensa del organismo y en la reparación del daño ocasionado por el parásito. La activación inmunológica de células del mesénquima y epiteliales, el reclutamiento y la circulación de células

efectoras, y la reparación del daño tisular son consecuencia de un balance complejo de citocinas que son producidas por distintas células en el intestino. Sin embargo, en este tipo de infecciones es difícil separar los efectos benéficos de los dañinos de la inflamación ya que, frecuentemente, se produce daño (enteropatía) durante la expulsión de nemátodos intestinales por lo que es necesario identificar detalladamente los mediadores implicados en cada fenómeno. Por ejemplo, se ha descrito la participación de macrófagos y células cebadas como células indispensables en la expulsión de *N. brasiliensis*, *Strongyloides venezuelensis* y *Trichinella spiralis* (Befus y Bienenstock, 1979; Abe y Nawa, 1988; Khan y col., 1993; Donaldson y col., 1996; Lantz y col., 1998) y el daño intestinal que produce la activación de células cebadas que liberan aminas vasoactivas, proteasas, citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-18 y TNF- α) y citocinas reguladoras (IL-4, IL-10 e IL-13) (Burd y col., 1989; Lorentz y col., 2000). Entonces, la mastocitosis en la mucosa infectada es un hallazgo inmunopatológico más que protector y la ausencia de mastocitosis, TNF y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se asocian a disminución de la enteropatía (Lawrence y col., 1998; 2000).

Los neutrófilos son las células fagocíticas más eficientes y en general, forman parte de las primeras barreras de defensa contra los microorganismos. Estas células destruyen a los parásitos por mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. Su estallido respiratorio es más intenso que el de los macrófagos, sus gránulos de secreción contienen proteínas altamente citotóxicas y son activados por IFN- γ , TNF α y GM-CSF (Roitt y col., 2001).

Los macrófagos son eficaces contra los parásitos intracelulares utilizando sus funciones citocidas y contra parásitos de gran tamaño participando en mecanismos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos. En general, los macrófagos actúan como células efectoras, inhiben la multiplicación parasitaria e incluso destruyen al parásito mediante la liberación de sustancias citotóxicas y por acción directa del H₂O₂. Además, regulan la respuesta inflamatoria liberando IL-1, IL-12, CSF, TNF- α y potencian la respuesta inmunológica al activar linfocitos específicos. Inmediatamente después de la infección, los macrófagos pueden ser activados, aumentando su capacidad citocida, por la acción del INF- γ . Esta citocina es producida por células NK que, a su vez, han sido activadas por IL-12 o mediante TNF- α producido por macrófagos. TNF- α e IFN- γ estimulan además eosinófilos y plaquetas como se ha observado en la destrucción de larvas de *S. mansoni* (Roitt y col., 2001. Abbas y Lichtman, 2004). La activación específica de macrófagos por los linfocitos T ocurre posteriormente y depende de la secreción de IFN- γ , GM-CSF, IL-3, e IL-4. Finalmente, los macrófagos también participan en la inmunidad a parásitos mediante la presentación de antígenos a linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Roitt y col., 2001).

Los eosinófilos han sido característicamente asociados a infecciones por helmintos, su principal participación en la destrucción de estos parásitos se debe a mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). La actividad efectora de estas células es estimulada por citocinas (TNF- α , GM-CSF) y su degranulación se lleva a cabo sobre parásitos recubiertos de IgE, IgG (*S. mansoni*, *T. spiralis*) e IgA. Al igual que los eosinófilos, las plaquetas tienen

actividad antiparasitaria por participar en mecanismos de ADCC con anticuerpos IgE, actividad potenciada por acción de citocinas como IFN- γ y TNF- α y por la presencia de proteínas de fase aguda en el suero (Roitt y col., 2001).

Muchos parásitos inducen anticuerpos específicos e inespecíficos durante la infección, éstos últimos probablemente debido a sustancias que actúan como activadores policlonales de células B. Los anticuerpos específicos son útiles para controlar algunas infecciones parasitarias, especialmente las producidas por parásitos extracelulares, y los mecanismos por los cuales las controlan son diversos y dependen del parásito implicado. Los anticuerpos pueden actuar directamente dañando al parásito por la activación del complemento, bloqueando la unión del parásito a la célula blanco, previniendo su diseminación a otras células; incrementando la fagocitosis, y participando en mecanismos de (ADCC) (Roitt y col., 2001).

La presentación antigénica juega un papel importante en la polarización de la respuesta hacia alguno de los subgrupos de células T CD4⁺ (Th1 o Th2). Los diferentes tipos de células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales (macrófagos, células dendríticas y células B) inducen diferentes respuestas en los linfocitos bajo condiciones fisiológicas distintas como la presencia de citocinas en el microambiente. Se han descrito dos tipos de células dendríticas derivadas de sangre periférica humana que se producen bajo condiciones de cultivo diferentes: las células dendríticas “mieloides” llamadas DC1 que se obtienen a partir de monocitos en presencia de IL-4 y GM-CSF y las células dendríticas “linfoides” llamadas DC2 que provienen de células plasmocitoides cultivadas en presencia de

IL-3. Las células DC1 producen grandes cantidades de IL-12 e inducen una respuesta Th1 mientras que, las células DC2 producen poca IL-12 e inducen una respuesta Th2 (Rissoan y col., 1999). Por otro lado, en ensayos *in vitro* utilizando células T ovoalbúmina-específicas, la presentación antigénica mediada por macrófagos indujo una respuesta Th1 mientras que, la mediada por linfocitos B generó una respuesta Th2 (Gajewski y col., 1991).

A nivel intestinal, las células dendríticas residentes en las placas de Peyer del intestino delgado y en los folículos linfoides del intestino grueso son las encargadas de realizar la presentación antigénica (Neutra y col., 1996). Las células dendríticas, que endocitan los antígenos en el sitio de infección, migran a los ganglios mesentéricos de drenaje y ahí presentan el antígeno a los linfocitos T, posteriormente los linfocitos antígeno específicos se dirigen al sitio original de la infección donde son activados por células dendríticas maduras y ejercen funciones específicas (Springer, 1994; Mowat y Viney, 1997).

La respuesta inmune celular es primordial en las respuestas antiparasitarias. Actualmente se sabe que la participación de las diferentes subpoblaciones celulares es determinante en el curso de este tipo de infecciones. Por ejemplo, en infecciones por *Plasmodium*, las células CD4⁺ son protectoras ante la fase sanguínea de *P. yoelii*, y las células CD8⁺ en la fase hepática de la infección por *P. berghei*. En la fase hepática, las células CD8⁺ producen IFN- γ que inhibe la multiplicación intracelular del parásito y además ejercen su actividad citotóxica sobre los hepatocitos infectados (Roitt y col., 2001).

La participación de subpoblaciones de células CD4⁺ (Th1 y Th2) en las parasitosis ha sido ampliamente estudiada. Al inicio de muchas infecciones parasitarias se ha descrito la presencia de una mezcla de estas subpoblaciones celulares y la polarización hacia alguna de ellas determina la resolución de la infección o su paso a la cronicidad. Esta polarización no solamente depende del parásito implicado y de su estadio de diferenciación, sino también del tiempo de evolución de la enfermedad. En el paludismo, las células Th1 actúan durante la fase hepática y el IFN- γ disminuye la parasitemia mientras que, para la eliminación del parásito en su fase intracelular, la respuesta Th2 es de gran importancia ya que induce la producción de anticuerpos específicos que intervienen en reacciones de ADCC. La respuesta Th1 en infecciones por *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* y *Toxoplasma gondii* es protectora debido a que el IFN- γ , producido por esta subpoblación, activa macrófagos para que destruyan a los parásitos intracelulares (Abbas y Lichtman, 2004). En las infecciones por helmintos, la respuesta inmune se caracteriza por eosinofilia, elevación de los niveles de IgE y en algunos casos mastocitosis (Finkelman y col., 1991). Este tipo de respuesta es inducida por citocinas que son producidas por células Th2 (IgE por IL-4, eosinofilia por IL-5 y mastocitosis por IL-3, IL-4 e IL-10) (Finkelman y col., 1988; Coffman y col., 1989; Madden y col., 1991; Thompson- Snipes y col., 1991).

A pesar de que los eosinófilos y el incremento de niveles de IgE se han considerado elementos importantes en la inmunidad protectora a helmintos (Butterworth, 1984; Capron y col., 1987), la disminución de eosinófilos tisulares y

circulantes con anticuerpos anti-IL-5 no siempre abate la respuesta protectora como se ha observado en infecciones producidas por *S. mansoni* y *Heligmosomoides polygyrus* (Finkelman y col., 1991; Sher y Coffman, 1992) y no altera el curso de la infección por *Nippostrongylus brasiliensis* (Coffman y col., 1989). Asimismo, la disminución de la respuesta de IgE con anticuerpos monoclonales anti-IL-4 no modifica la resistencia a *S. mansoni* en ratón y rata, ni bloquea la expulsión de *N. brasiliensis* en ratones infectados (Finkelman y col., 1990; 1991; Phillips y col., 1991; Sher y Coffman, 1992).

Finalmente, es claro que durante el desarrollo de una infección parasitaria el organismo genera mecanismos antiparasitarios diversos y complejos, estas respuestas logran en muchas ocasiones impedir el establecimiento de la infección. Sin embargo, la respuesta inmunológica puede ser modificada por los parásitos favoreciendo la infección (mecanismos de evasión inmunológica) y la sobrevivencia de los parásitos, produciendo en muchos casos procesos infecciosos crónicos.

Es por esto, el interés que existe de estudiar los mecanismos involucrados en la relación huésped-parásito en las diferentes parasitosis.

ANTECEDENTES

Neurocisticercosis

La neurocisticercosis (NCC) constituye un problema de salud mundial ya que se encuentra ampliamente distribuida en África, Asia y Latinoamérica. Los países que registran más casos de la enfermedad son México, Brasil y Perú (Sarti y Gutiérrez, 1986; Flisser, 1994). En México, los primeros trabajos que nos orientan sobre su frecuencia están basados en la revisión de casos de autopsias realizadas en el Hospital General de México. En estos estudios se reportaron frecuencias de 3.6% (Costero, 1946), 3.5% (Briceño, 1961) y 2.38% este último trabajo, es el de mayor magnitud y abarca la revisión de 20,200 casos de autopsia entre 1953 y 1984 (Villagrana y Olvera, 1988). A mediados de los años 90, se reportó un promedio anual de 500 casos de cisticercosis con una tasa nacional cruda de 0.6 por cada 100 mil habitantes, aunque seguramente la tasa era mayor debido a un subregistro. En la cisticercosis no existe susceptibilidad de género y el mayor número de casos se encuentra entre los 15 y 44 años de edad (OPS, 1994). Actualmente, las enfermedades infecciosas en general constituyen un problema de rigurosa atención para las organizaciones mundiales de salud ya que las vías de comunicación y las migraciones generan su diseminación, la cisticercosis no es la excepción, y actualmente en países desarrollados la NCC es cada vez más frecuente (White y col., 1992; Ximenez y col., 2002; OMS Boletín 2004).

El establecimiento de la NCC depende de diferentes factores derivados de la relación hospedero-parásito, por lo que el estudio de los mecanismos

inmunológicos involucrados en la defensa y las estrategias de evasión parasitarias deben ser analizados cuidadosamente.

Los metacéstodos de *Taenia solium* presentan preferencia por el sistema nervioso central (SNC), corazón, ojo y músculo esquelético (Villagrana y Olvera, 1988). En la NCC, las manifestaciones clínicas dependen del número y ubicación del parásito (estructuras neuronales afectadas o alteración en la circulación del líquido cefalorraquídeo), del estado biológico del mismo y del grado de reacción inflamatoria que rodea al metacéstodo (Ridaura, 1987; Villagrana y Olvera, 1988; Sotelo y col., 1984). La NCC es la presentación más frecuente y la causa principal de epilepsia de inicio tardío, ya que en la mayoría de los casos, la primera manifestación de la enfermedad suele ser el síndrome convulsivo. Sin embargo, existen estudios que reportan NCC como hallazgo de autopsia y como diagnóstico secundario a la causa de muerte sugiriendo la existencia de un periodo asintomático de la enfermedad (Costero, 1946; Briceño y col., 1961; Villagrana y Olvera, 1988). Mas aún, un reporte sobre soldados que habían estado en la India como único lugar endémico de cisticercosis establece que la NCC clínica, típicamente está precedida de un periodo de incubación prolongado (4-5 años) que usualmente es asintomático (Dixon y Lipscomb, 1961).

El metacéstodo de *T. solium* permanece vivo durante largos periodos en los tejidos, lo que sugiere que cuenta con mecanismos de evasión inmunológica. En cisticercosis porcina, por ejemplo se han descrito metacéstodos viables rodeados de una escasa reacción inflamatoria mientras que, cerdos parasitados e inmunizados presentan un proceso granulomatoso intenso alrededor del parásito (Molinari y col., 1983a; Aluja y Vargas, 1988). Mas aún, el metacéstodo induce un

estado de inmunosupresión en cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*, ya que estos animales presentan negativa la prueba de inhibición de la migración de los leucocitos ante antígenos de metacéstodos, y cerdos cisticercosos tienen deprimidas las respuestas proliferativas de sus linfocitos cuando son estimulados con mitógenos (Molinari y col., 1986). Así mismo, cerdos parasitados experimentalmente con huevos de *T. solium* presentan disminución de linfocitos T totales en sangre periférica, particularmente linfocitos T (LT) CD4⁺ observándose una correlación inversa entre el número de células T CD4⁺ y el número de metacéstodos encontrados en el animal (Molinari y col., 1987). Mas aun, se ha reportado que la infección experimental de cerdos con huevos de *T. solium* induce inestabilidad y alteraciones cromosómicas en linfocitos circulantes, hallazgos que muestran correlación con la reducción de la capacidad proliferativa de estas células cuando son estimuladas con mitógenos (Herrera y col., 1994).

En NCC humana, durante el periodo asintomático, los metacéstodos aparentemente vivos se encuentran rodeados de una escasa o nula reacción inflamatoria (Márquez, 1971; Rabiela y col., 1982; Escobar, 1983; Ridaura, 1987; Villagran y Olvera, 1988) mientras que, en el cerebro de pacientes con NCC clínica se ha descrito una intensa reacción granulomatosa asociada a metacéstodos muertos (Restrepo y col., 2001). La relación entre el cuadro clínico y el grado de reacción inflamatoria sugiere una modulación negativa de la respuesta inmune por el parásito.

Se han descrito diversos mecanismos por los cuales los helmintos pueden modular la respuesta inmunológica, ya sea modificando la actividad del sistema del complemento, las respuestas celulares y/o de anticuerpos.

En lo que se refiere a la modulación del sistema del complemento se han reportado diferentes moléculas como, la taeniastatina (9.5KD) que es un inhibidor de proteasas de productos de excreción y secreción de *T. taeniaeformis* y que inhibe las vías clásica y alterna del complemento *in vitro* (Suquet y col., 1984; Leid y col., 1987); los polisacáridos sulfatados de *T. taeniaeformis* que activan y consumen el complemento lejos del parásito (Hammerberg y Williams, 1978; Hammerberg y col., 1980) y la paramiosina (95KD) de *T. solium* que se une a C1q inhibiendo la activación de la vía clásica del complemento (Laclette y col., 1992).

Por otro lado, metacéstodos de *T. solium* implantados en la cavidad peritoneal de ratones inducen una disminución en la respuesta proliferativa a Con A de linfocitos esplénicos (Willms y col., 1980); sobrenadantes de *T. taeniaeformis* pueden disminuir la respuesta proliferativa y la producción de IL-2 en células de bazo de rata (Burger y col., 1986); y la infección peritoneal con metacéstodos de *T. crassiceps* en ratones, o la inoculación de un extracto antigénico inducen depresión de la respuesta celular, en parte debida a la disminución de la producción de IL-2 (Sciutto y col., 1995), lo que indica que los téenidos modulan negativamente la respuesta inmune celular.

La respuesta inmune humoral también es de importancia en la cisticercosis, ya que se han detectado anticuerpos (principalmente IgG) en suero y líquido cefaloraquídeo de pacientes con parásitos vivos o en diferentes estados de degeneración y cuando los parásitos están muertos o calcificados los anticuerpos son escasos (Martinez-Maya y col., 2003; López y col., 2004).

Por lo que se refiere a mecanismos de evasión de la respuesta inmune humoral se ha reportado la presencia de inmunoglobulinas del huésped en el

fluido vesicular de diferentes especies de helmintos (*T. taeniaeformis*, *T. crassiceps*, *T. saginata* y *Echinococcus granulosus*), (Hustead y Williams, 1971; Machnicka y Grzybowski, 1986). Además, se ha reportado que extractos derivados de *T. solium* tiene efectos mitogénicos sobre linfocitos B murinos (Sealey y col., 1981; Judson y col., 1987), y aunque algunos anticuerpos reconocen al quiste, la mayoría de ellos no son específicos para el parásito. Mas aún, parásitos viables (*T. solium*, *T. pisiformis* y *T. crassiceps*) presentan inmunoglobulinas en sus superficies que evitan que el sistema inmune los reconozca (Craig, 1988; Mc Manus y Lamsam, 1990; Willms y Arcos, 1997). En otros trabajos se ha demostrado que, *T. taeniaeformis* y *T. solium* poseen receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (FcR) (Hayunga, 1989; Mandujano y col., 1990) y que *T. solium* y *T. crassiceps* poseen la capacidad de degradar IgG *in vitro* (White y col., 1992; 1997; Baig y col., 2005). Algunos de los mecanismos de degradación de IgG humana involucran la participación de la teniastatina en el interior del metacétodo, y de cisteína proteasas de membrana que además de digerir IgG humana inducen apoptosis de linfocitos T CD4⁺ (Tato y col., 2004).

Finalmente, la respuesta inmune también es modulada a través de la producción de sustancias inmunosupresoras, como los productos de secreción de *T. taeniaeformis* que inducen poblaciones de células supresoras (Burger y col., 1986); los factores liberados por *Schistosoma mansoni* que inhiben la proliferación de linfocitos y que son termoestables, dializables, y de bajo peso molecular (Dessaint y col., 1977); el factor inmunosupresor de bajo peso molecular, termoestable y dializable producido por *Oncocerca gibsoni* (Yin Foo y

col., 1983); y un oligonucleopéptido de ARN (factor de metacésto, FM), inmunomodulador, termoestable, dializable y de bajo peso molecular (aproximadamente 1,450 Da) producido por *T. solium* (Molinari y col., 1989; Tato y col., 1995).

El efecto inmunomodulador del FM ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo de trabajo y sabemos que suprime *in vivo* la respuesta inmune contra antígenos de *Salmonella typhimurium* (Molinari y col., 1989); inhibe *in vitro* la incorporación de timidina tritiada (timidina ³H) en linfocitos humanos y de ratón estimulados con mitógenos (Molinari y col., 1990; Tato y col., 1995); actúa sobre linfocitos T inhibiendo la incorporación de timidina ³H en cocultivo con linfocitos previamente expuestos a diferentes dosis de FM (Tato y col., 1995); además participa en la inhibición de la inflamación inducida en ratones por metacésto implantados subcutáneamente (Tato y col., 1996); y disminuye *in vitro* la liberación de IL-2, INF- γ e IL-4 por linfocitos esplénicos de ratón estimulados con Con A y de TNF α por macrófagos de la línea IC-21 estimulados simultáneamente con LPS e IFN- γ (Arechavaleta y col., 1998).

Con base en estos antecedentes y ya que la cisticercosis es el resultado de una compleja relación hospedero-parásito, en este trabajo se decidió estudiar la modulación de la respuesta inmune celular sistémica en la cisticercosis temprana, analizando el efecto de la implantación de metacésto vivos y del FM sobre la expresión y producción de citocinas en células esplénicas CD4⁺ y CD8⁺ en un modelo murino, con la finalidad de esclarecer la respuesta inmunológica sistémica

que prevalece en las primeras fases de la infección y que permite la permanencia del parásito.

HIPOTESIS

Si los metacéstodos de *T. solium* modulan negativamente la respuesta inmune del huésped a través de la producción de moléculas como el factor de metacéstodos (FM), que sabemos inhibe la proliferación de linfocitos, la inflamación alrededor de metacéstodos implantados y la producción de citocinas *in vitro*, entonces es posible que la fracción F1 (fracción supresora del FM) pudiera estar modulando a nivel sistémico *in vivo*, la producción de citocinas que afectan la respuesta inflamatoria incluyendo la que se encuentra alrededor de los metacéstodos en la fase prodrómica de la neurocisticercosis.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la modulación de la respuesta inmune celular sistémica en la cisticercosis temprana en un modelo murino, analizando el efecto de la implantación de metacéstodos vivos y de la fracción F1 sobre la expresión y producción de citocinas en células esplénicas CD4⁺ y CD8⁺ y su correlación con la reacción inflamatoria que se produce alrededor de metacéstodos implantados subcutáneamente en ratones.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar el efecto de la fracción F1 del FM sobre la reacción inflamatoria en metacéstodos de *T. solium* implantados subcutáneamente en un modelo murino.
2. Determinar el efecto de la fracción F1 sobre la respuesta inflamatoria inducida por antígenos de metacéstodos alrededor de los parásitos implantados subcutáneamente en ratones.
3. Estudiar el efecto *in vivo* de la fracción F1 sobre la producción de citocinas Th1 y Th2 en la cisticercosis a los 12 días después de la implantación.
4. Estudiar el efecto *in vivo* de la implantación de metacéstodos vivos de *T. solium* sobre la expresión de CD25 en linfocitos esplénicos CD4⁺ y CD8⁺.
5. Estudiar el efecto *in vivo* de la fracción F1 sobre la expresión de CD25 en linfocitos esplénicos CD4⁺ y CD8⁺.
6. Analizar el efecto *in vivo* de la fracción F1 o la implantación de metacéstodos sobre la producción de citocinas Th1 y Th2 en linfocitos esplénicos CD4⁺ y CD8⁺.

JUSTIFICACION

Se sabe que los metacéstodos de *T. solium* permanecen vivos durante largos periodos en los tejidos del hospedero, lo que sugiere que el parásito modula la respuesta inmune de éste. Al respecto, se ha reportado que metacéstodos de *T. solium* implantados en la cavidad peritoneal de ratones indujeron en linfocitos esplénicos la disminución de la respuesta proliferativa a Con A. Por otro lado, en cisticercosis humana y porcina mientras el parásito está vivo, se encuentra rodeado de una escasa o nula reacción inflamatoria, lo que contrasta con el intenso proceso inflamatorio que rodea a metacéstodos muertos. Más aún, se ha reportado en pacientes con neurocisticercosis, inmunosupresión antígeno-específica en células mononucleares de sangre periférica.

T. solium produce moléculas que inhiben la respuesta inmune, el factor de metacéstodos es una de ellas y se ha relacionado con regulación de las respuestas humorales y celulares y la inhibición de la inflamación. El propósito de este trabajo fue estudiar la modulación de la respuesta inmune celular sistémica en un modelo murino, analizando el efecto *in vivo* de la implantación de metacéstodos vivos y de una fracción del factor de metacéstodos de *Taenia solium* (F1) sobre la expresión y producción de citocinas Th1 y Th2 en células esplénicas CD4⁺ y CD8⁺.

El conocimiento que se genere podría contribuir para comprender mejor la relación hospedero-parásito en cisticercosis. Así como, para entender mejor otras parasitosis crónicas.

MATERIAL Y METODOS

1. Factor de metacéstodos

1.1 Obtención de metacéstodos de *T. solium*.

Los metacéstodos de *T. solium* se obtuvieron a partir de cerdos naturalmente parasitados adquiridos en una zona endémica de cisticercosis en Guerrero y en el rastro del estado de Toluca, México. Los animales se sacrificaron mediante choque eléctrico y se disecaron metacéstodos a partir de los músculos esqueléticos de los cerdos. La viabilidad de los metacéstodos se midió mediante el método de evaginación descrito por Canedo y col. (1982). Brevemente, 20 metacéstodos recientemente disecados fueron incubados en 20 ml de RPMI 1640 (Sigma) suplementado con glucosa (1 $\mu\text{g/ml}$) y tripsina (0.5 $\mu\text{g/ml}$) a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 h. Los metacéstodos viables son los que muestran evaginación del escólex y presentan intensa movilidad.

1.2 Obtención del Factor de Metacéstodos.

El factor de metacéstodos (FM) se obtuvo siguiendo la metodología previamente descrita (Tato y col. 1995). Brevemente, los metacéstodos (1000 por ensayo) se colocaron en 500 ml de agua desionizada estéril y se incubaron a temperatura ambiente durante 6 h posteriormente, se centrifugaron durante 15 min a 10,000 g en una centrífuga refrigerada (Sorval RC 5B plus. Dupont, Instruments). El sobrenadante se liofilizó y resuspendió en 5 ml de agua desionizada estéril y se dializó en una membrana Spectrapor 3 que excluye moléculas menores de 3,500 Da (Spectrum Medical Industries, Inc.) a 4°C contra

100 ml de agua deionizada estéril durante 12 h. El material fuera de la membrana se liofilizó y almacenó a -20°C hasta su uso.

1.3 Separación de las fracciones del Factor de Metacéstodos.

La separación de las fracciones se realizó en una columna de Bio-gel P-6 (Bio-rad) (70 cm de longitud/0.9 cm de diámetro). Lotes del extracto crudo de FM (100 mg peso seco) fueron resuspendidos en 2.0 ml de agua destilada estéril. El material se eluyó con agua desionizada estéril y el material se detectó a 260 y 280 nm con un analizador ultravioleta (UV) ISCO UA5. Las dos fracciones principales se recolectaron por separado y se liofilizaron y almacenaron a -20°C hasta su uso. La cuantificación de las fracciones se realizó midiendo la cantidad de ribosa por el método de orcinol (Ashwell 1957).

1.4 Actividad Biológica del Factor de Metacéstodos.

Con la finalidad de determinar la actividad biológica de las fracciones del FM obtenidas por cromatografía en Bio-gel P-6 (Fracción 1, F1 y fracción 2, F2) realizamos ensayos de transformación blastoide siguiendo el método descrito por Tato y col. (1995). Brevemente, en cajas de cultivo de 96 pozos (Costar, Co.) se colocaron por triplicado, 5×10^5 esplenocitos /100 μl por pozo y se les agregó 100 μl de Concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Con A, Sigma Chemical, Co.) y 5, 10 o 20 μg de F1 o F2 respectivamente. Se incluyeron pozos que tenían solo RPMI o Con A como testigos. Las células se cultivaron durante 72 h a 37°C en una atmósfera con 5% de CO_2 . Después de 48 h de incubación, las células se pulsaron con

1 μ Ci/pozo de timidina tritiada (actividad específica de 74 GBq/mmol ICN Biomedicals, Inc. Irving, Calif.). A dieciséis horas del marcaje, las células se cosecharon utilizando papel filtro (Whatman, 934-AH) y se lavaron exhaustivamente con agua destilada. La incorporación de timidina tritiada se determinó en líquido de centelleo con un contador automático (Beckman, LS 6000TA).

2. Obtención de Antígenos de Metacéstodos.

Los antígenos de metacéstodos de *T. solium* se obtuvieron de acuerdo al método descrito por Molinari y col. (1983a y 1993). Brevemente, lotes de 1500 metacéstodos se lavaron exhaustivamente con solución salina isotónica y se molieron en un Omni-mixer Sorvall durante 6 s a temperatura ambiente. Los metacéstodos rotos se centrifugaron a 1,500 g por 10 min y el precipitado se molió con arena de vidrio durante 1 h a temperatura ambiente, en amortiguador de fosfatos 0.02M (pH 7.2) con desoxicolato de sodio al 0.4% y 20 μ g de desoxirribonucleasa/ml (Sigma). El material obtenido fue centrifugado una vez mas a 1,500 g por 20 min a 4°C y el sobrenadante se dializó contra amortiguador de fosfatos de sodio 0.02 M pH 7.2 durante 6 días, en una membrana Spectrapor que excluye moléculas menores de 12,000-14,000 Da. El material del interior de la membrana se centrifugó a 9,000 g por 30 min y el sobrenadante se filtró (membrana Millipore de 0.22 μ m) (Bedford, Mass.), se liofilizó y se almacenó a –20°C. Se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

3. Animales experimentales.

Se utilizaron 5 grupos cada uno de cuatro ratones Balb/c hembras de 8 semanas de edad y 20 a 23 gr, de peso. De una colonia del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México, alimentados con purina para ratón y agua *ad-libitum* .

4. Diseño experimental.

Los diferentes estudios experimentales se realizaron con la fracción supresora F1 y con el siguiente diseño experimental:

Se formaron 5 grupos experimentales

1. 4 ratones inoculados por vía subcutánea con 50 μg de F1, cada 96h hasta el día 16.
2. 4 ratones inoculados por vía subcutánea con 100 μg de antígenos de metacésto, dosis única al inicio del ensayo y solución salina isotónica cada 96h hasta el día 16.
3. 4 ratones inoculados por vía subcutánea con 100 μg de antígenos de metacésto dosis única al inicio de los ensayos + 50 μg de F1 cada 96h hasta el día 16.
4. 4 ratones testigos inoculados con solución salina isotónica cada 96h
5. 4 ratones testigos inoculados con solución salina isotónica cada 96h (sin implantar)

Al 8° día de los experimentos, los animales de todos los grupos experimentales y de un grupo testigo, se implantaron con 8 metacésto de *T.solium* viables e íntegros por vía subcutánea. Al día 20 del inicio de los experimentos, todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se procesaron para los diferentes estudios.

5. Implantación de metacéstodos de *T. solium*.

Los metacéstodos de *T. solium* se obtuvieron en condiciones de asepsia a partir de carne parasitada y se les determinó su viabilidad (mayor o igual al 90%). Al octavo día de inoculación los ratones de los grupos experimentales y un grupo testigo fueron sometidos a implantación de metacéstodos íntegros. Brevemente, previa tricotomía del lomo, los animales se anestesiaron con cloroformo, se les realizó antisepsia de la región con isopropanol, se les practicó una incisión longitudinal de aproximadamente 8 a 10 mm en la piel, y se disecó el tejido celular subcutáneo. Ocho metacéstodos intactos fueron implantados subcutáneamente en cada ratón y la herida quirúrgica fue suturada.

6. Expresión de CD25 y citocinas.

6.1 Obtención de células de bazo de ratón.

Los animales fueron sacrificados al día 20 del inicio de los experimentos y los bazos de los ratones de todos los grupos fueron removidos y se obtuvieron suspensiones celulares infiltrando los bazos con RPMI incompleto siguiendo el método descrito por Tato y col. (1995).

6.2 Extracción de RNA y ensayos de RT-PCR.

Células de bazo de ratones experimentales y controles se incubaron en cajas de cultivo de 24 pozos con 1 ml de Con A (5µg/ml) durante 4 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% (Cook y col., 1993). Después de la incubación se llevó a cabo la extracción de RNA por medio del método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987).

Para la realización de los ensayos de RT-PCR, en todos los casos se utilizaron 0.5 µg de RNA total. Las secuencias de los iniciadores de las citocinas utilizadas fueron las descritas por Cook y col., (1993).

IL-2	5'-ATGTACAGCATGCAGCTCGCATC-3' y 5'-GGCTTGTTGAGATGATGCTTTGACA-3'
IL-4	5'-ATGGGTCTCAACCCCCAGCTAGT-3' y 5'-GCTCTTTAGGCTTTCCAGGAAGTC-3'
IL-10	5'-CTGCTCTTACTGACTGGCATGAGG-3' y 5'-TCAAATGCTCCTTGATTTCTGGGC-3'
IFN-γ	5'-TGAACGCTACACACTGCATCTTGG-3' y 5'-CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG-3'

En todos los casos se utilizó un control de β actina y estándares de peso molecular (ready Load 100 bp DNA ladder, Gibco BRL, Grand Island, NY).

Tamaño esperado de los productos de RT-PCR:

IL-2	502pb
IFN-γ	460pb
IL-4	399pb
IL-10	301pb
β-actina	514pb

Todas las reacciones de amplificación se realizaron durante 30 ciclos en un termociclador (MJ Research, Inc. Watertown, Mass.). El programa de ciclos para PCR consistió en: desnaturalización por 1 min a 94°C seguido de un ciclo de

hibridización a 60°C por 2 min, extensión a 72°C por 3 min y desnaturalización por 1 min a 94°C y una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos del PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio 5 µg/50 ml en 0.5 X TBE (Tris base 0.5M, ácido bórico 0.9M, EDTA 0.01) a 100 V durante 45 min y fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.3 Detección de la expresión de CD25 y de citocinas intracelulares.

La detección de la expresión de CD25 y la concentración de citocinas intracelulares se realizaron según lo descrito por Picker y col. (1995) con modificaciones de Garrido y col. (2001). Brevemente, las células mononucleares esplénicas fueron purificadas en un gradiente de Ficoll hypaque. Alicuotas de 2 ml de suspensión celular a una concentración 2×10^6 fueron cultivadas por triplicado en cajas de cultivo de 12 pozos (Costar) e incubadas con RPMI completo solo o en presencia de ConA (2µg/ml) durante 48 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Después de 44 h de incubación se agregó Brefeldina A (5µg/ml, Sigma) por pozo. Se transfirieron 4×10^5 células a tubos de poliestireno (Falcon) y se centrifugaron 450 g por 5 min y se resuspendieron en PBS 0.5 ml.

Se determinó la expresión de moléculas CD4/CD25 en las células mononucleares esplénicas por medio de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales (Ac.Mcs) anti-CD4 de ratón marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Ac. Mcs anti-CD25 de ratón marcados con ficoeritrina (PE) de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Pharmigen). Las células CD8⁺CD25⁺ fueron identificadas con Ac. Mcs anti-CD25 de ratón marcados con

PE y corresponden a las células CD25 positivas que se localizan en el cuadrante superior derecho de las gráficas de puntos, como fue descrito por Garrido y col. (2001). Se utilizaron como controles anticuerpos monoclonales IgG1 e IgG2 de especificidad irrelevante para el ratón, marcados con FITC y PE respectivamente.

Para estudiar las citocinas intracelulares, las células fueron tratadas con solución permeabilizante 500µl por prueba (fluorescence-activated cell sorting FACS permeabilizing solution, Becton Dickinson) y teñidas con Ac. Mcs anti IL-2, IL-4 e IFN γ de ratón marcados con PE, el análisis de citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur (Becton Dickinson); se adquirieron 10,000 eventos por prueba.

7. Estudios Histopatológicos.

Los metacéstodos implantados en los ratones, fueron disecados y se fijaron en buffer con glutaraldehído al 3%, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 5µm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Posteriormente los cortes histológicos fueron estudiados por microscopia de luz.

8. Análisis Estadístico.

Los resultados de la incorporación de timidina tritiada, expresión de CD25 y la concentración de la citocinas intracitoplasmáticas se reportaron como las medias \pm la SD. Las diferencias significativas en la expresión de CD25 y en la concentración intracelular de las citocinas se estimaron aplicando la prueba de comparación múltiple Student-Newman-Keuls. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

1. Actividad biológica del factor de metacéstodos

Se obtuvieron metacéstodos de 3 cerdos naturalmente infectados que tenían las siguientes cargas parasitarias 970 (Lote 1), 680 (Lote 2), y 545 (Lote 3) cisticercos por kg de carne y viabilidades de 97, 92.7 y 72% respectivamente y se obtuvieron los lotes de FM correspondientes. Posteriormente se liofilizaron por separado y se les determinó su actividad biológica sobre linfocitos de ratón. Los resultados mostraron que, los lotes 1 y 2 disminuyeron significativamente la proliferación de linfocitos inducidos por Con A. La capacidad inhibitoria del lote 3 fue menor (Fig. 1).

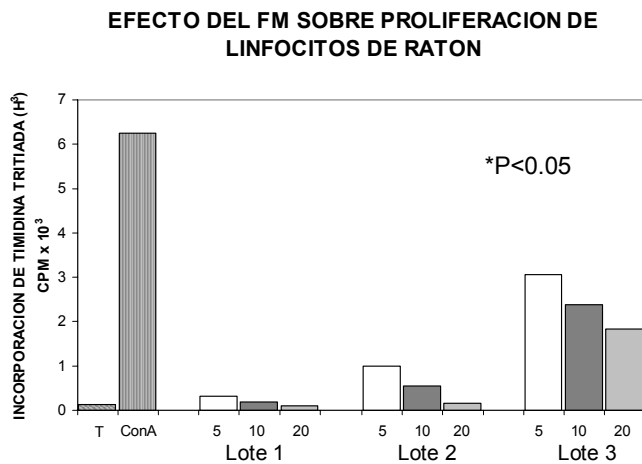


Figura 1. Efecto de FM sobre la proliferación de linfocitos de ratón. Comparación de la actividad biológica de 3 diferentes lotes de FM a distintas concen μg nes 5, 10 y 20 μg . T: medio de cultivo; Con A: concanavalina A (0.5 μg); Lotes 1, 2 y 3. rFM de metacéstodos obtenidos de diferentes cerdos.

Los cisticercos del lote 3 se observaban grandes, amarillentos y opalescentes, tardaron en evaginar y presentan disminución en su movilidad, mientras que, los cisticercos de los lotes 1 y 2 eran pequeños, translúcidos y claros, evaginaron completamente y mostraron mucha movilidad.

2. Fraccionamiento del factor de metacéstodos en Bio-gel P- 6 y actividad biológica de las fracciones

Los experimentos se realizaron con el Lote 1, que fue el que mejor inhibición mostró en los ensayos de proliferación celular. Se fraccionaron alícuotas de este lote en una columna de Bio-gel P-6 y el perfil cromatográfico mostró 2 picos principales de elusión, denominados F1 y F2 (Fig. 2A). El efecto biológico de las fracciones F1 y F2 fue estudiado en ensayos de proliferación celular inducida por Con A y mostró que F1 inhibe la proliferación y F2 estimula la proliferación de linfocitos de ratón de manera dosis-dependiente (Fig. 2B).

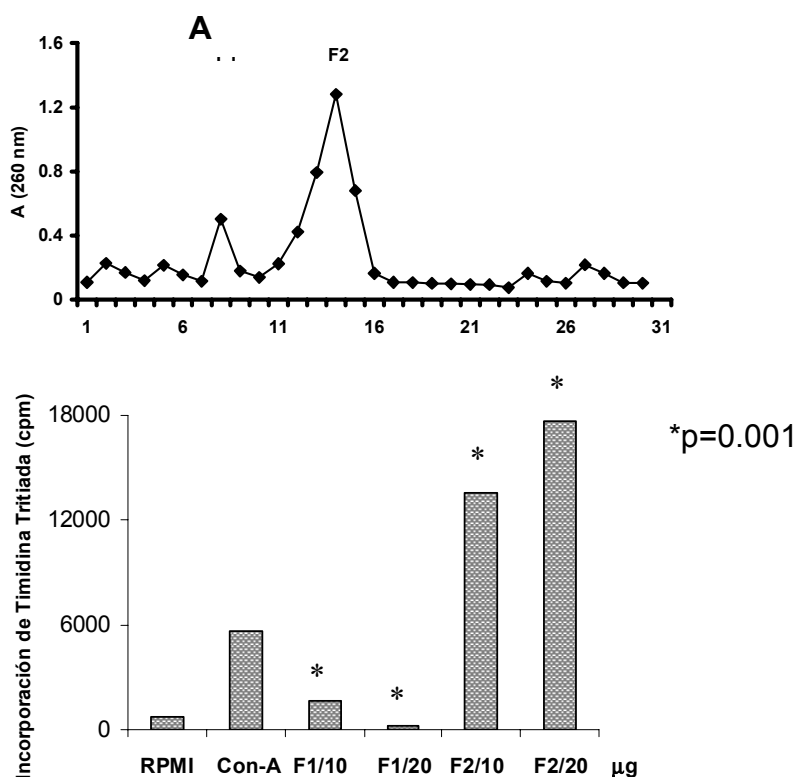


Figura 2. Fraccionamiento y actividad biológica del lote 1 de FM. A: Perfil de elución a 260nm del FM en una columna de Bio-gel P-6 se obtuvieron los 2 picos principales F1 y F2. B: Ensayos de proliferación de esplenocitos estimulados con Con A, en presencia de diferentes concentraciones (10 y 20 µg) de las fracciones F1 y F2. F1 indujo disminución significativa de la incorporación de timidina tritiada con ambas concentraciones ($P < 0.001$). F2 indujo estimulación significativa de la incorporación de timidina tritiada con ambas concentraciones ($P < 0.001$). RPMI y Con A: testigos de proliferación.

3. Estudio histopatológico

Al octavo día del inicio de los experimentos, los ratones de los diferentes grupos experimentales (tratados con F1; vacunados con antígenos de metacéstodos; vacunados y tratados con F1; y testigos) fueron sometidos a la implantación de 8 metacéstodos vivos, y 12 días después fueron procesados y estudiados histológicamente por microscopia de luz. El estudio histopatológico demostró que, en los animales testigo, se desarrolló una extensa reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño alrededor de los metacéstodos, que estaba compuesta principalmente por neutrófilos aunque se observaban algunos eosinófilos, células plasmáticas y linfocitos, neutrófilos y eosinófilos degenerados se encontraron infiltrando los remanentes caseosos de la reacción granulomatosa (Fig. 3 A, B y C). A pesar de la extensa reacción inflamatoria, las estructuras parasitarias eran reconocibles como se puede observar en la Figura 3, donde se identifican perfectamente las ventosas y el rostelo con sus ganchos bien definidos en un metacéstodo. Sin embargo, la vesícula se observa infiltrada por gran cantidad de células inflamatorias. En contraste, los metacéstodos provenientes de ratones tratados con F1, aunque estaban rodeados de una reacción inflamatoria también de tipo cuerpo extraño, ésta fue de menor magnitud a la encontrada en el grupo testigo (Figs. 4A y 4B). Por otro lado, metacéstodos de animales inmunizados con antígenos de metacéstodo de *T. solium* (100 µg dosis única al inicio del experimento) presentaron, en un periodo tan corto como 12 días después de la implantación, una intensa reacción inflamatoria que invadió las estructuras parasitarias y que, a diferencia de la reacción desarrollada en los animales testigo, estaba compuesta principalmente por eosinófilos, aunque también por linfocitos, macrófagos y escasos neutrófilos (Figs. 5A y 5B). Finalmente, en las figuras 6A y 6B se pueden observar metacéstodos provenientes de ratones inmunizados con antígenos de metacéstodo y tratados con F1 (antígenos de metacéstodo 100 µg dosis única y F1 5 dosis 50 µg cada 96 h), donde se observa que la reacción inflamatoria es mucho menos intensa que en los animales vacunados, pero no se eliminó por completo.

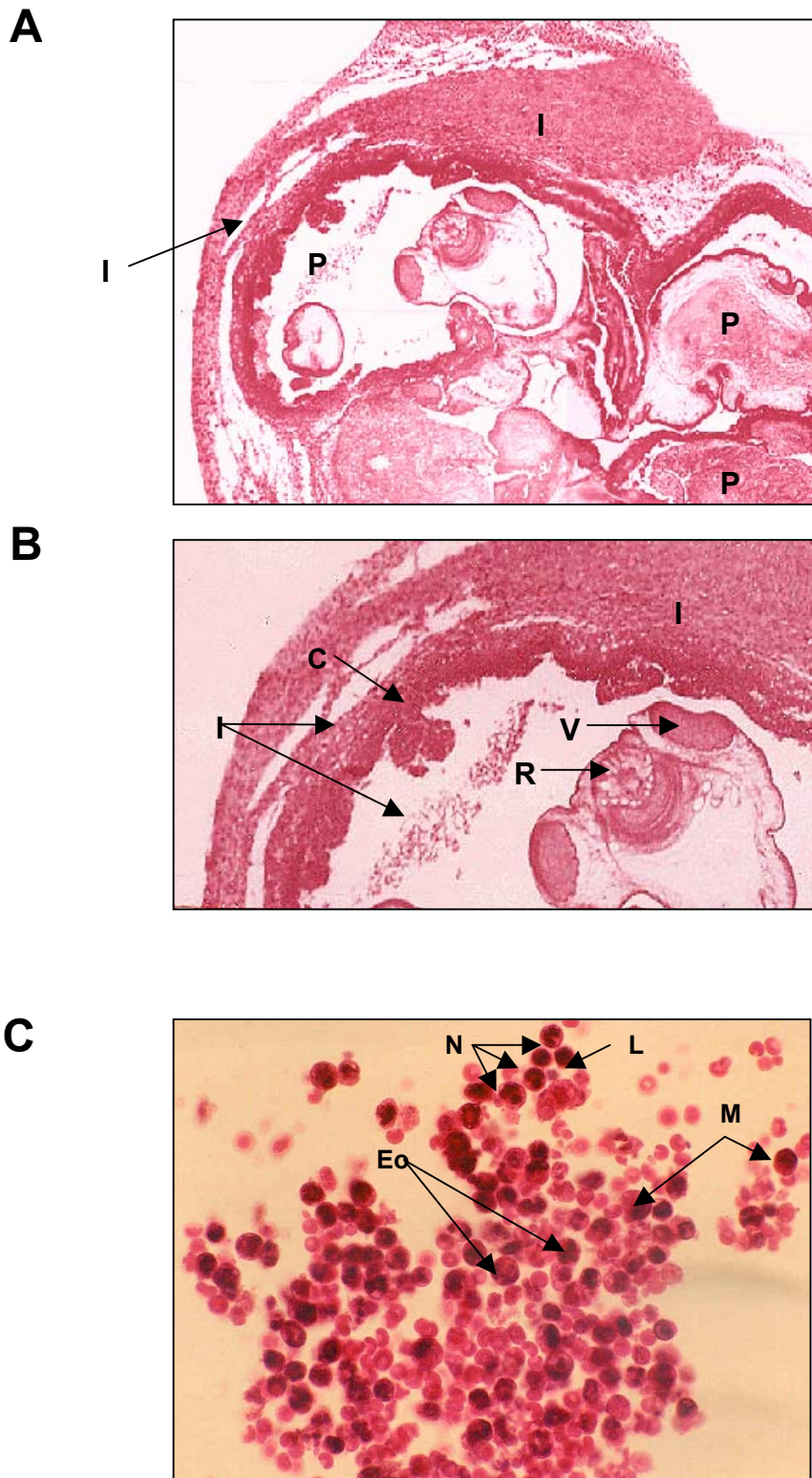


Figura 3. Cortes histopatológicos de metacístodos de *Taenia solium* implantados en ratones testigo. I: reacción inflamatoria. P: parásito. V: ventosa. R: rostelo. N: neutrófilo. L: linfocito. M: macrófago; C: material caseoso. A: 40X; B:100X; C:1000X

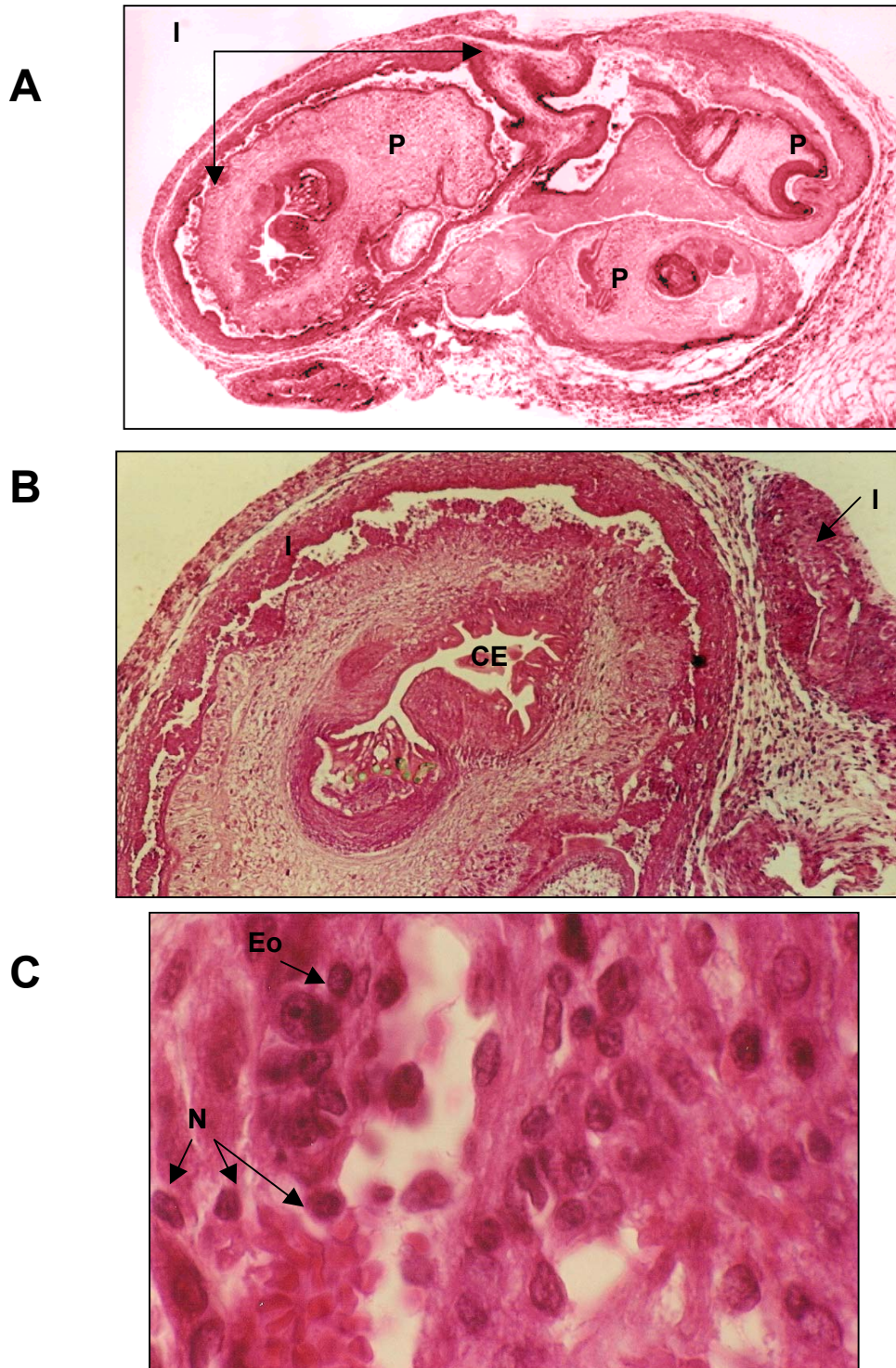


Figura 4. Cortes histopatológicos de metacístodos de *Taenia solium* provenientes de ratones tratados con F1. I: reacción inflamatoria; CE: canal espiral; P: parásito; Eo: eosinófilo; N: neutrófilo. A: Corte en el que se observan 3 parásitos (40X). B: Ampliación de uno de los parásitos. C: 1000X

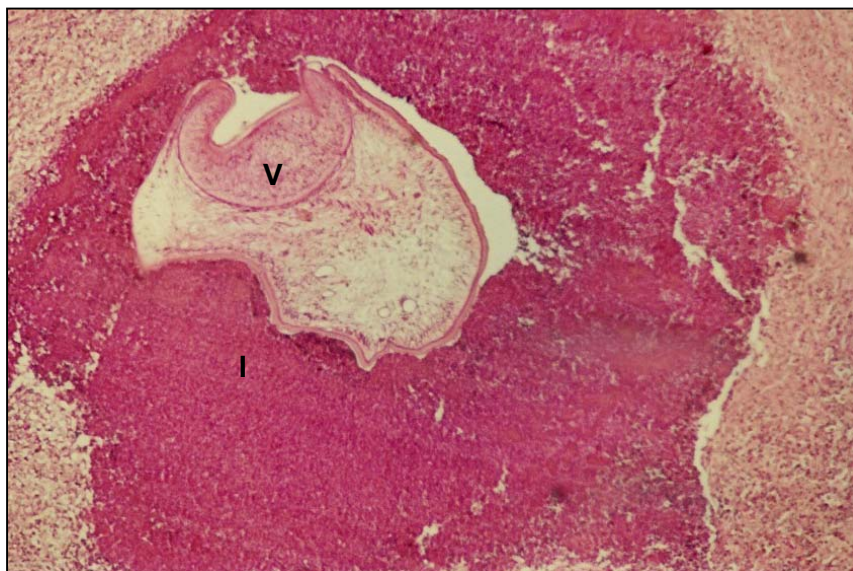
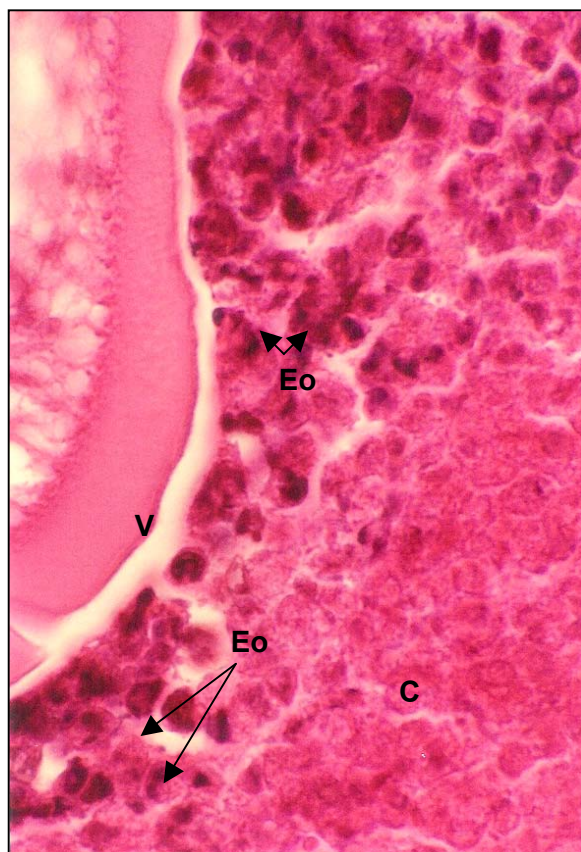
A**B**

Figura 5. Cortes histológicos de metacístodos de *Taenia solium* provenientes de ratones inmunizados con antígenos de metacístodos. I: reacción inflamatoria; V: ventosa; G: ganchos; C: material caseoso; Eo: eosinófilos. A 100X; B: 1000X.

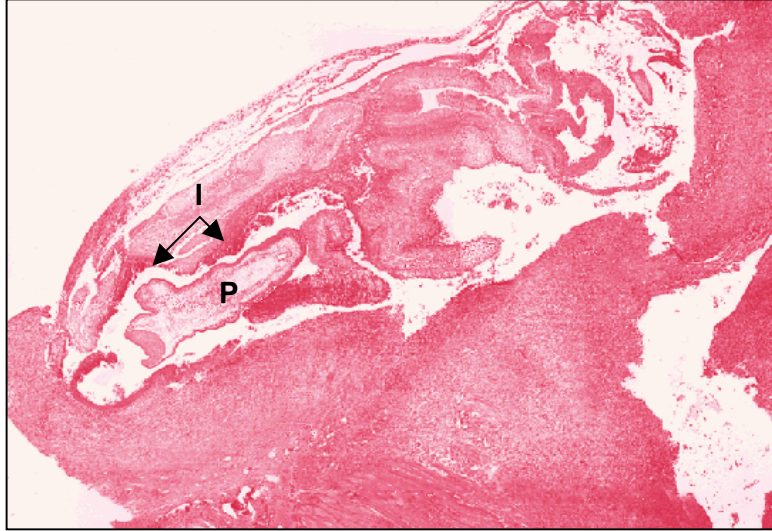
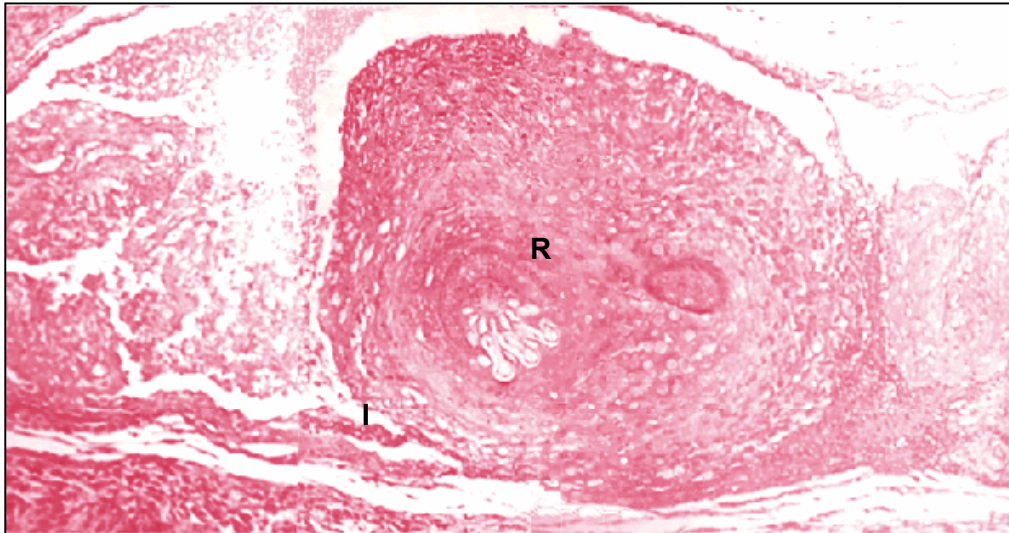
A**B****C**

Figura 6. Cortes histológicos de metacéstodos de *Taenia solium* implantados en animales inmunizados con antígenos de metacéstodos y tratados con F1. P: parásito; I:reacción inflamatoria; R: rostellum; Eo: eosinófilo A: 40X; B: 200X; C: 600X.

4. Determinación de mensajeros de citocinas

Se determinó el perfil de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10) en células esplénicas de ratones implantados con metacístodos de *T. solium* o tratados con F1 y estimuladas con Con A, por RT-PCR. No obstante, que a simple vista parecen existir diferencias en los niveles de expresión de las diferentes citocinas estudiadas, la metodología de PCR utilizada no fue cuantitativa, por lo que los resultados fueron interpretados como positivos o negativos. Las células de animales testigos expresaron RNAm para IFN- γ , IL-2 e IL-4. Resultados similares fueron obtenidos en esplenocitos de ratones implantados o tratados con F1. El RNAm para IL-10 no se expresó en ningún animal (Fig. 7).

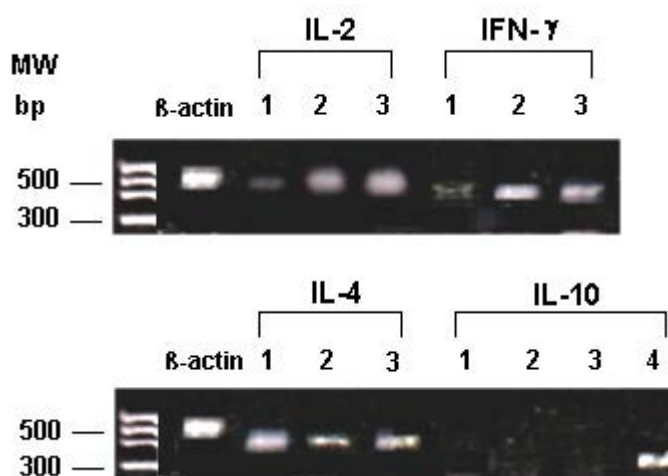


Figura 7. Determinación del perfil de RNAm de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-10) por RT-PCR. Las células esplénicas de ratones implantados con metacístodos de *T. solium* o tratados con F1 fueron estimuladas con Con A *ex vivo*. Los productos de la RT-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Carril 1: esplenocitos de ratones sin tratamiento; carril 2 células de bazo de ratones implantados con metacístodos; carril 3: esplenocitos de ratones tratados con F1 y carril 4: testigo positivo de IL-10 (esplenocitos incubados con F2, que es la fracción estimuladora del FM). Peso molecular de los productos de PCR: β -actina = 514 pb; IL-2 = 502 pb; IFN- γ = 460 pb; IL-4 = 399 pb e IL-10 = 301 pb.

5. Expresión de CD25.

Se estudió, por citometría de flujo, la expresión de CD25 en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ obtenidos de animales implantados con metacéstodos o tratados con F1 y estimulados con Con A *ex vivo*. En las gráficas de la figura 8 A, se observan las células CD4⁺ marcadas con FITC en el cuadrante inferior derecho, las células CD4⁺CD25⁺ marcadas con PE y FITC en el cuadrante superior derecho, y las células CD8⁺CD25⁺ marcadas con PE en el cuadrante superior izquierdo. El análisis de citometría de flujo no mostró diferencias significativas entre los valores iniciales de células CD4⁺ en los bazos de ratones experimentales comparados con los del grupo control (33.16 ± 1.11); ratones implantados con metacéstodos (36.25 ± 1.7); ratones tratados con F1 (33 ± 2.0). Sin embargo, la expresión de CD25 tanto en células CD4⁺ como en CD8⁺ de los bazos de ratones implantados con metacéstodos de *T. solium* y estimulados con Con A *ex vivo*, disminuyó significativamente en comparación con células de animales testigo, ($p=0.01$ y $p=0.006$ respectivamente) (Fig. 8B y C).

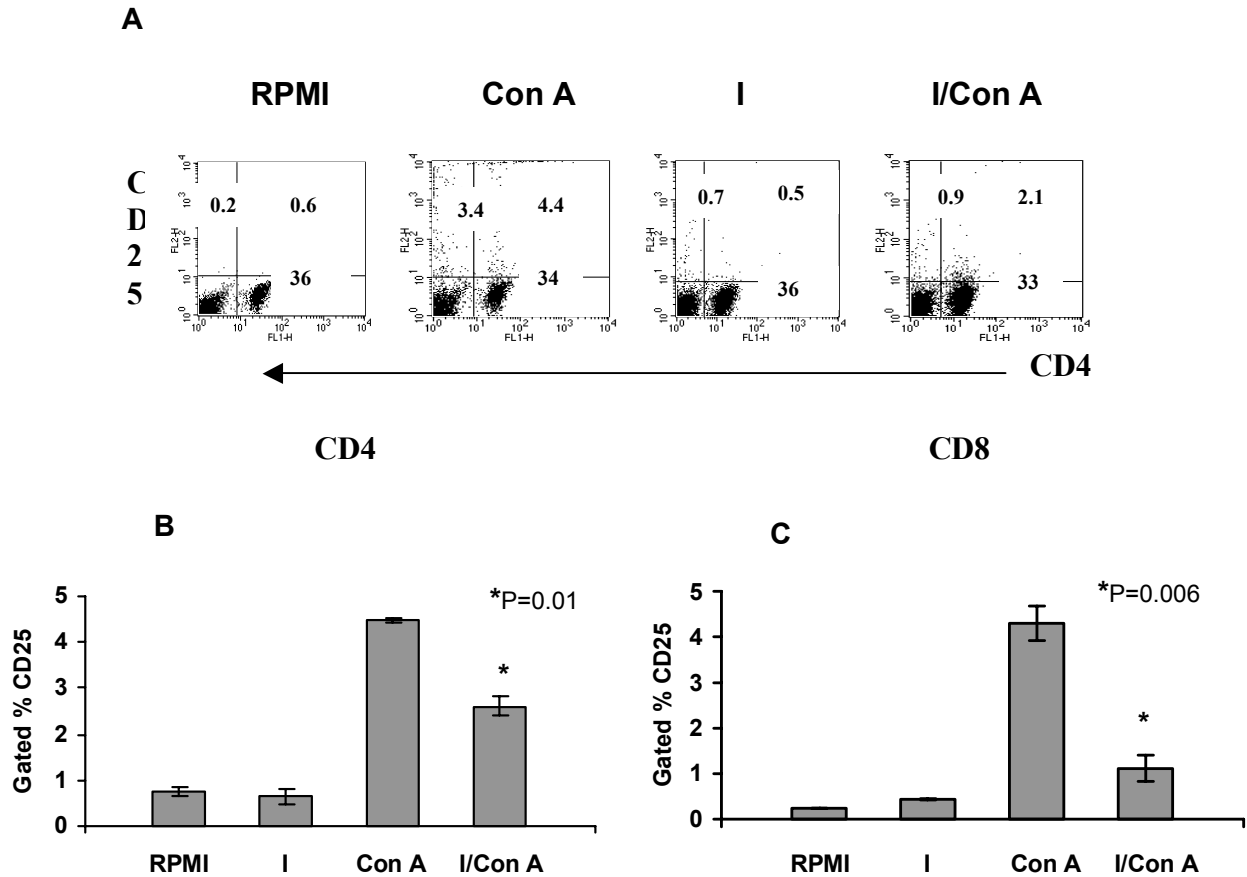


Figura 8. Efecto de la implantación de metacéstodos de *T. solium* sobre la expresión de CD25 en linfocitos de bazo CD4⁺ y CD8⁺. Linfocitos de ratones testigo e implantados fueron estimulados *ex vivo* con Con A. **A:** Gráfica de los linfocitos de ratones testigo (RPMI y Con A) y de ratones implantados con metacéstodos (I e I/Con A). Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas a anti-CD4 marcadas con FITC y/o anti-CD25 marcadas con PE. Cada gráfica es representativa de cuatro experimentos. Las gráficas muestran la expresión de **B:** CD25 en células CD4⁺ y **C:** CD25 en células CD8⁺. RPMI, linfocitos de ratones testigo; I, linfocitos de ratones implantados con metacéstodos incubados en medio RPMI; ConA, linfocitos de bazo de ratones estimulados con Con A; I/Con A linfocitos de ratones implantados con metacéstodos estimulados con Con A. Las barras representan la media de los valores de cuatro animales \pm SEM. Los asteriscos muestran la significancia estadística.

Resultados similares se encontraron al comparar la expresión de CD25⁺ por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de ratones tratados con F1 con sus testigos. Tanto las células CD4⁺ como las CD8⁺ mostraron una disminución significativa de la expresión de CD25 ($p=0.001$ y $p= 0.003$, respectivamente) (Fig. 9B y C).

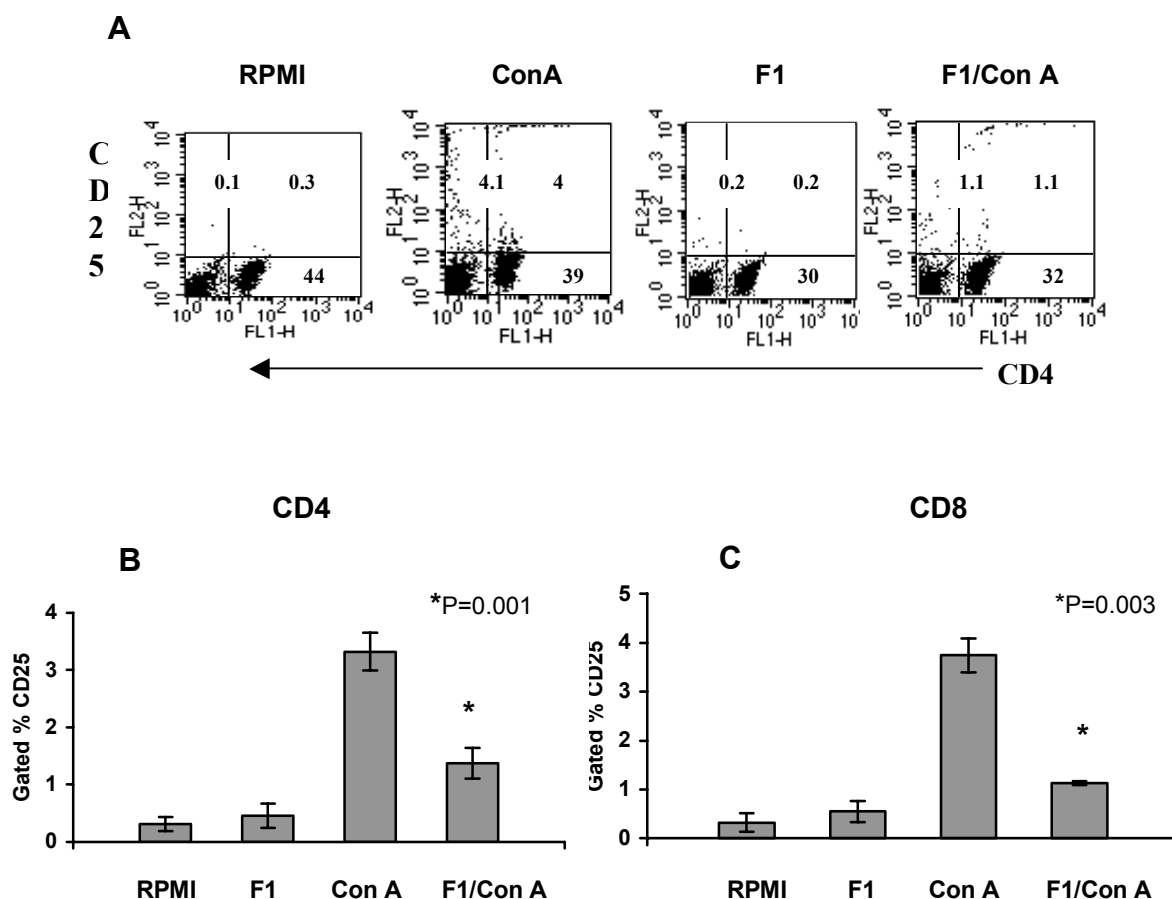


Figura 9. Efecto del tratamiento de ratones con F1 sobre la expresión de CD25 en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de bazo. Linfocitos de ratones testigo y tratados con F1 fueron estimulados *ex vivo* con Con A. **A:** Gráficas de linfocitos de ratones testigo (RPMI y Con A) y de ratones tratados con F1 (F1 y F1/Con A). Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas a anti-CD4 marcadas con FITC y/o anti-CD25 marcadas con PE. Cada gráfica es representativa de cuatro experimentos. Las gráficas muestran la expresión de: **B,** CD25 en células CD4⁺ y **C,** CD25 en células CD8⁺. RPMI, linfocitos de ratones testigo; F1, linfocitos de ratones tratados con F1 e incubados en medio RPMI; Con A, linfocitos de bazo de ratones estimulados con Con A; F1/Con A linfocitos de ratones tratados con F1 y estimulados con Con A. Las barras representan la media de los valores de cuatro animales \pm SEM. Los asteriscos muestran la significancia estadística.

6. Producción de citocinas intracelulares

Ya que, el análisis de RNAm por RT-PCR no fue cuantitativo y no nos permitió observar diferencias en el perfil de citocinas entre los diferentes grupos experimentales, se realizaron estudios de determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo. Los resultados demuestran que, los linfocitos CD4⁺ de ratones implantados con metacéstodos, presentaron una disminución estadísticamente significativa de la producción IFN- γ al compararse con la producción de esta citocina en linfocitos de los ratones testigo ($p=0.005$, Fig. 10A), mientras que, IL-2 e IL-4 disminuyen aunque no significativamente (Fig. 10B y 10C). En células CD8⁺ se observa una disminución significativa en la producción de IL-2 e IL-4 con respecto a células control ($p=0.009$ y $p=0.034$ respectivamente, Fig. 10E y 10F).

El análisis de la producción de citocinas intracelulares en linfocitos de bazo de ratones tratados con F1 y estimulados con Con A *ex vivo* (F1/Con A) muestra disminución en la producción de IFN- γ aunque no significativamente y disminución significativa de IL-2 en células CD4⁺ (Fig. 11A y 11B). La producción de IL-4 en estas células no se alteró (Fig. 11C). Por otro lado, las concentraciones de IFN- γ , IL-2 e IL-4 en células CD8⁺ disminuyeron en comparación con los valores encontrados para células testigo (RPMI) Fig. 11D, ($p=0.053$; Fig. 8E $p=0.001$ y Fig. 11F $p=0.059$, respectivamente).

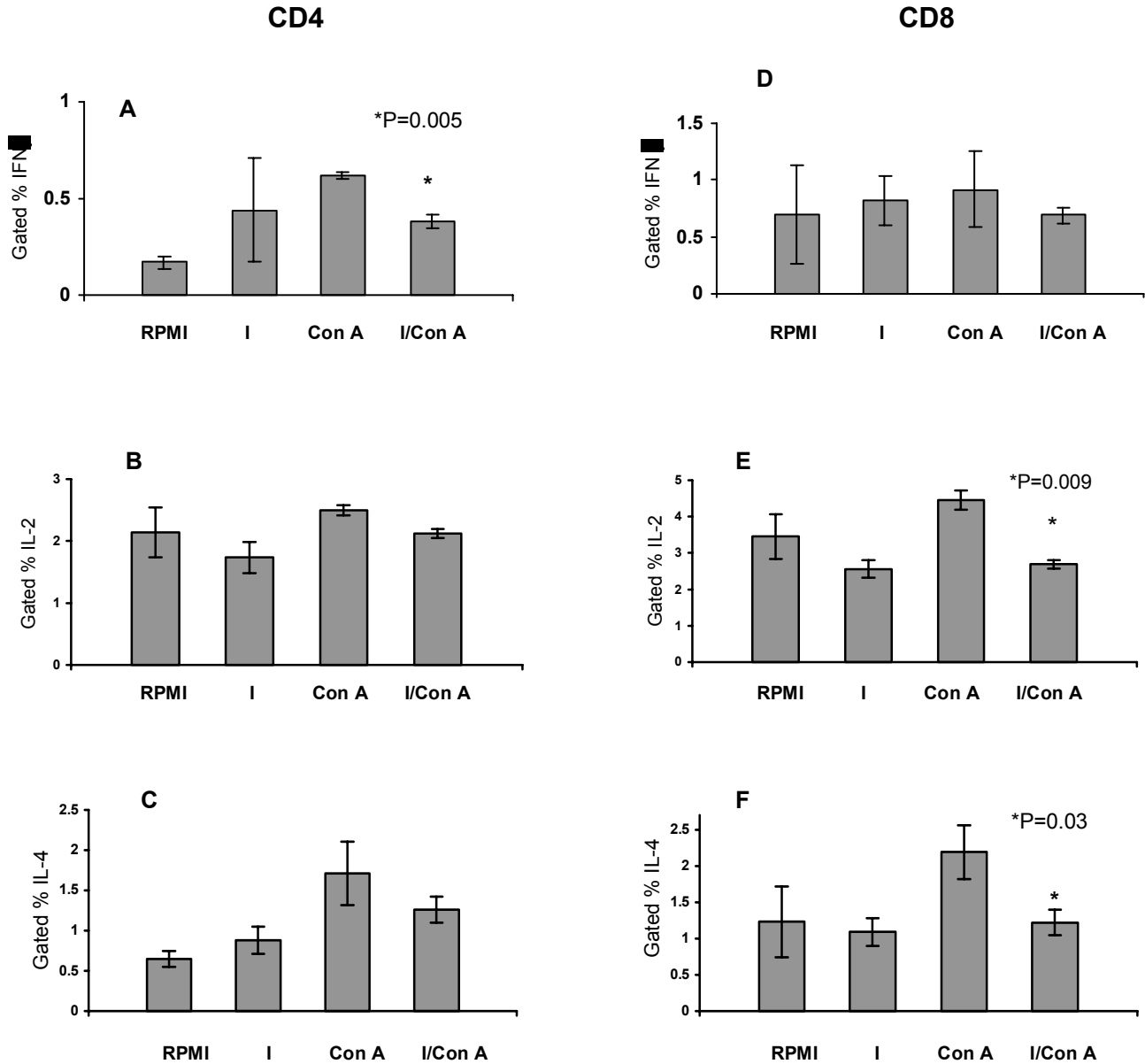


Figura 10. Efecto de la implantación de metacéstodos de *Taenia solium* sobre la producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Linfocitos esplénicos de ratones implantados con metacéstodos fueron estimulados *ex vivo* Con A. IFN- γ , IL-2 e IL-4 intracelulares fueron detectadas por citometría de flujo en células T CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente. RPMI: linfocitos de ratones control incubados en medio RPMI; I: células T esplénicas de ratones implantados con metacéstodos e incubadas en medio RPMI; Con A: linfocitos de ratones control estimulados con Con A; I/Con A: células T esplénicas de ratones implantados con metacéstodos y estimuladas con Con A. A y D producción de IFN- γ ; B y E producción de IL-2; C y F producción de IL-4. Las barras representan la media de los valores de cuatro animales \pm SEM. Los asteriscos muestran la significancia estadística.

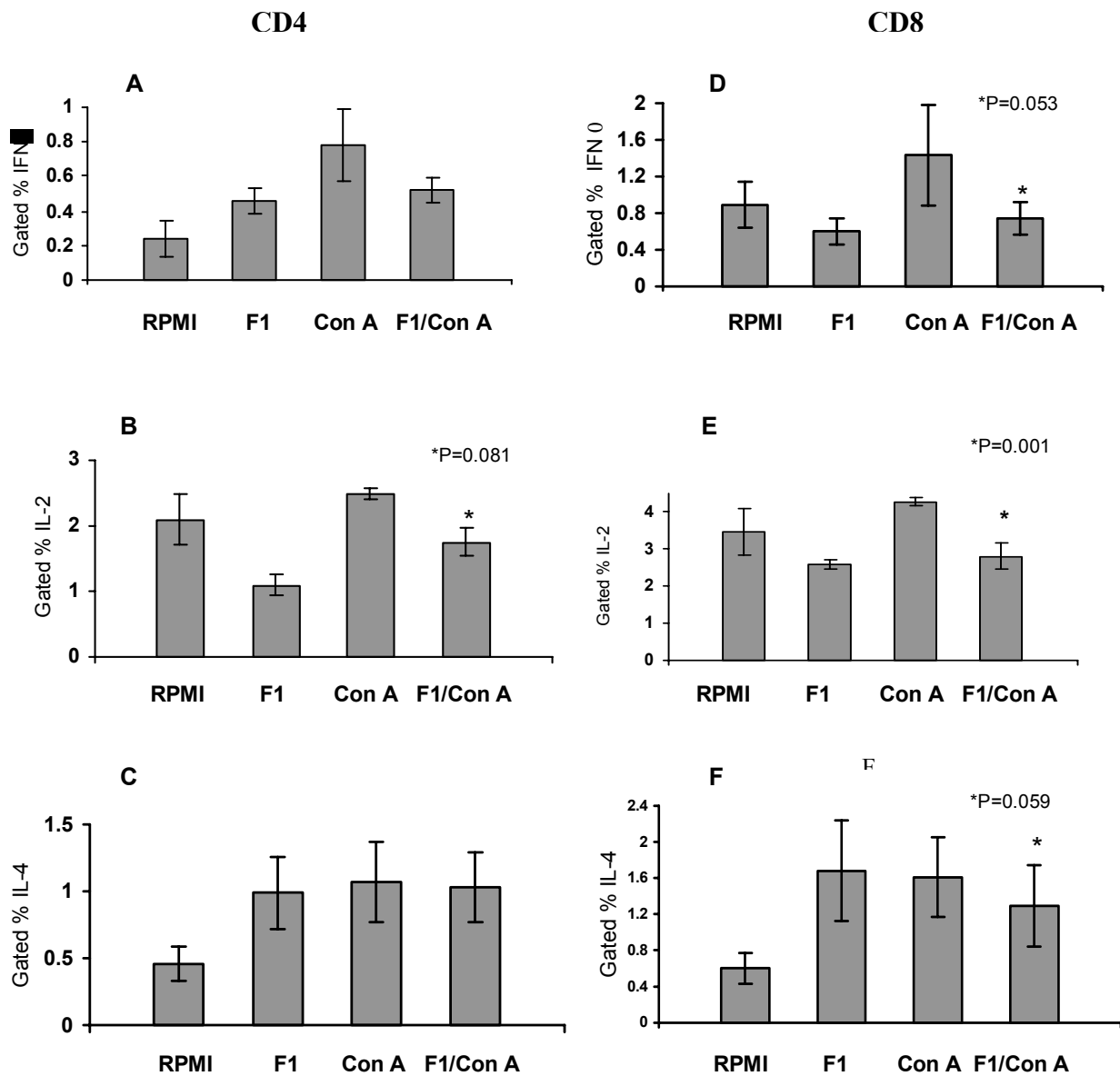


Figura 11. Efecto del tratamiento de ratones con F1 sobre la producción de citocinas por células T CD4⁺ y CD8⁺. Linfocitos esplénicos de ratones tratados con F1 (cuatro dosis de 50 μ g cada una) fueron estimulados *ex vivo* con Con A. IFN- γ , IL-2 e IL-4 intracelulares fueron detectadas por citometría de flujo en células T CD4⁺ y CD8⁺ respectivamente. RPMI: linfocitos de ratones testigo incubados en medio RPMI; F1: células T esplénicas de ratones tratados con F1 e incubadas en medio RPMI; Con A: linfocitos de ratones control estimulados con Con A; F1/Con A: células T esplénicas de ratones tratados con F1 y estimuladas con Con A. A y D producción de IFN- γ ; B y E producción de IL-2; C y F producción de IL-4. Las barras representan la media de los valores de cuatro animales \pm SEM. Los asteriscos muestran la significancia estadística.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se encontró que la fracción F1 del factor de metacésto disminuyó la intensidad del proceso inflamatorio alrededor de los metacésto implantados comparada con la inflamación observada con sólo metacésto implantados. Lo que sugiere inmunomodulación negativa de la respuesta inflamatoria mediada por este producto del parásito.

Esplenocitos de ratones implantados con metacésto de *T. solium* y de ratones inoculados con factor supresor de metacésto (F1) fueron estimulados con Con A *ex vivo*, para determinar la expresión de CD25 y la producción de citocinas (IFN- γ , IL-2 e IL-4) en células CD4⁺ y CD8⁺. Además, se realizó un estudio histopatológico de metacésto implantados subcutáneamente en ratones (tratados con F1; vacunados con antígenos de metacésto; vacunados y tratados con F1; y testigos) con la finalidad de correlacionar la inflamación con la producción de citocinas. Este estudio fue llevado a cabo para entender las interacciones hospeder-parásito en neurocisticercosis humana en su fase temprana (prodrómica) utilizando un modelo murino.

Se obtuvieron 3 lotes de FM a partir de metacésto de cerdos naturalmente parasitados que presentaban diferentes cargas parasitarias. Los resultados mostraron que, la capacidad inhibitoria del factor de metacésto está relacionada con la viabilidad de los metacésto, ya que disminuye cuando la infección es vieja y los metacésto se observan con signos degenerativos. Esto puede deberse a que, con el tiempo de infección, los metacésto producen factor de menor calidad funcional, por lo que, para nuestros experimentos,

utilizamos solamente lotes de infecciones recientes. Los resultados de la actividad biológica de las fracciones F1 y F2 del factor de metacéstodos fueron semejantes a lo reportado en trabajos previos. La fracción F1 disminuyó la capacidad de proliferación de esplenocitos de ratones y la fracción F2, la aumenta tanto *in vivo* como *in vitro* (Molinari y col., 1990; 1996; Tato y col., 1995; Garrido y col., 2001). Si bien la actividad biológica de la fracción F2 no fue objeto de este estudio, se ha reportado que esta fracción incrementa la producción de IFN- γ en células CD4⁺ y CD8⁺ en forma dosis-dependiente tanto *in vivo* como *in vitro* e induce una restauración significativa del número de células CD4⁺ en ratones a los que se les había eliminado estas células (Garrido y col., 2001).

El estudio histopatológico de los metacéstodos de *T. solium* implantados subcutáneamente en los diferentes grupos experimentales, reveló diferencias en la intensidad y la composición celular del proceso inflamatorio que rodeaba a los parásitos. En el grupo testigo se demostró la presencia de una intensa reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño, la cual probablemente se debió a que el ratón no es el hospedero natural de este parásito. Resultados similares se observaron en los metacéstodos implantados en ratones del grupo tratado con la fracción F1, los cuales también estaban rodeados de una reacción inflamatoria de tipo cuerpo extraño aunque de mucho menor intensidad. La diferencia en la intensidad de la inflamación puede deberse, a que el FM inhibe tanto la inflamación como la respuesta celular y humoral en ratones y disminuye la producción de citocinas, algunas de ellas pro-inflamatorias como se observó *ex vivo* en este trabajo y

previamente *in vitro* (Molinari y col., 1996; Tato y col., 1996, Arechavaleta y col., 1998).

En el presente estudio se observó también que metacéstodos procedentes de animales inmunizados con antígenos de metacéstodos estaban rodeados por un proceso inflamatorio intenso que infiltró de manera muy importante las estructuras parasitarias y que, a diferencia de la inflamación en los animales testigo, estaba principalmente compuesto por eosinófilos aunque también por linfocitos, macrófagos y escasos neutrófilos. Esta reacción inflamatoria sugiere una respuesta inmune adaptativa en comparación, con la que presentaron metacéstodos procedentes de animales inmunizados con antígenos de metacéstodos y tratados con F1, en donde se observó que el proceso inflamatorio disminuyó considerablemente. Estos resultados sugieren que la respuesta inmune a los antígenos de metacésto estaba disminuida por la acción inhibitoria del factor liberado por los metacéstodos implantados o por la acción sistémica del F1.

Si bien las estructuras parasitarias se encontraban infiltradas por células inflamatorias, en ninguno de los grupos estudiados se observó destrucción total de los parásitos probablemente debido a que los parásitos fueron estudiados a tiempos cortos (12 días después de la implantación). Sin embargo, nosotros consideramos que eventualmente, los parásitos podrían ser destruidos por la inflamación como se ha reportado en cerdos naturalmente parasitados en los que, se observó que la inmunidad inducida por los antígenos fue capaz de causar la muerte y destrucción de parásitos que hasta entonces habían establecido una relación con el huésped que les permitía permanecer viables (Molinari y col., 1993a; 1997).

Los resultados del análisis de RT-PCR mostraron el mismo patrón de expresión de RNA mensajeros de citocinas en células de bazo de ratones implantados con metacéstodos, en esplenocitos de ratones tratados con la fracción F1 y en células de animales testigos. Debido a que nuestra metodología fue cualitativa (PCR) y no nos permitió detectar diferencias entre las concentraciones de RNA mensajeros para citocinas que se expresaron en los diferentes grupos experimentales ni las subpoblaciones de células T que los expresaban, se realizaron análisis de la producción de citocinas intracelulares por citometría de flujo. Los resultados mostraron que células CD4⁺ y CD8⁺, tanto de ratones implantados con metacéstodos (12 días post-implantación) como de ratones tratados con la fracción F1, presentaron una disminución de la producción de IFN- γ , IL-2 e IL-4 cuando se compararon con las células de animales testigo. Este efecto fue más pronunciado en células CD8⁺. Se determinó también la activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ midiendo la expresión de CD25 en la superficie de estas células, lo que permitió determinar que los linfocitos de ratones implantados o tratados estaban inmunodeprimidos.

Aunque en el análisis de citometría de flujo solo se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD4 de ratón marcados con FITC y anticuerpos monoclonales anti-CD25 de ratón marcados con PE, consideramos que la población de células en el cuadrante superior izquierdo de las gráficas de puntos (dot plots) eran CD8⁺CD25⁺ ya que, en estudios previos utilizando anticuerpos anti-CD8 de ratón marcados con FITC y anti-CD25 marcados con PE, se demostró que la población que se localizaba en este cuadrante tenía ese fenotipo (Garrido y col., 2001).

En este trabajo se encontraron células $CD4^+CD25^+$ y $CD8^+CD25^+$ disminuidas significativamente en bazos de ratones implantados con metacéstodos o tratados con la fracción F1, y estimulados con Con A *ex vivo*. En particular, este fenotipo se asocia a células reguladoras que bloquean la activación y la función de linfocitos T efectores. Estas células $CD4^+CD25^+$ han sido implicadas en los procesos de inmunomodulación observados en otras helmintiasis (Hoerauf et al., 2005), las cuales además de expresar niveles elevados de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), producen IL-10 y TGF- β . El reconocimiento del antígeno así como la señalización a través de moléculas accesorias y citocinas como IL-2 y TGF- β controlan su activación y modulan su actividad supresora (Hortwitz y col., 2003; Sakaguchi, 2004). Más aun, han sido encontradas en seres humanos y ratones y se han implicado en la inducción de tolerancia a antígenos propios (Annunziato y col., 2002; Shevach, 2000) y en la perpetuación de enfermedades infecciosas indolentes por micobacteria (Bloom y col., 1992) o por parásitos como *Leishmania* (Belkaid y col., 2001). Nuestros datos no son suficientes para determinar que las células $CD4^+CD25^+$ y $CD8^+CD25^+$ encontradas en este estudio en bazos de ratones implantados con metacéstodos o tratados con la fracción F1, y estimulados con Con A *ex vivo* sean reguladoras y participen en la modulación negativa de la respuesta inmune en cisticercosis, pero sería interesante realizar estudios que permitieran determinar si este tipo de células están participando en la inhibición inducida por la fracción F1.

Por otro lado, los resultados actuales sugieren que los metacéstodos implantados liberan *in vivo* FM, el cual puede ser responsable, junto con otras

moléculas como la paramiosina (Laclette y col., 1992) y las cisteín proteasas (White y col., 1992; Molinari y col., 2000; Tato y col., 2004) de modular la respuesta inmune del hospedero, ya que se ha descrito que el FM de *T. solium* inhibe, *in vitro*, la proliferación de linfocitos medida por incorporación de timidina tritiada y la producción *in vitro* de IFN- γ , IL-2 e IL-4 (Molinari y col., 1990; Tato y col., 1995; Arechavaleta y col., 1998), e inhibe la reacción inflamatoria alrededor de metacéstodos implantados (Tato y col., 1996; Molinari y col., 1996; resultados actuales). Además, en cisticercosis porcina se ha reportado, la disminución de células T, particularmente de la población CD4⁺ (Tato y col., 1987; Molinari y col., 1987) y la supresión de respuestas proliferativas de células T (Molinari y col., 1983a).

Nuestros resultados apoyan que la inmunomodulación negativa inducida por F1 no se debe a la estimulación de una subpoblación de células Th1 o Th2 e particular, ya que no se observa disminución de un patrón de citocinas y predominio de otro, sino que todas las citocinas están disminuidas, lo que pudiera ser apoyado por el hallazgo de apoptosis de linfocitos en la reacción inflamatoria que rodea a metacéstodos de *T. solium* en cisticercosis porcina (Solano et al., 2006). Por otro lado, se ha reportado que factores de bajo peso molecular de otros parásitos disminuyen la respuesta proliferativa de células T (Dessaint y col., 1977; Yin Foo y col., 1983). Más aún, Letonja y su grupo (1987) observaron que larvas de *T. taeniaeformis* disminuyeron la capacidad proliferativa de células de bazo a los 2 días post-infección, alcanzando un máximo a los 12 días y recuperándose 21 días después de la infección. Ellos también encontraron que el plasma de

ratones infectados suprime la respuesta proliferativa a Con A en esplenocitos de ratones no infectados, sugiriendo la presencia de factores supresores en el plasma de esos animales.

Igualmente, factores liberados *in vitro* por *T. crassiceps* obtenidos de infecciones a corto plazo (10 a 30 días) tienen la capacidad de regular negativamente la respuesta proliferativa de células T y la producción de IFN- γ e IL-4, pero no de IL-10, la cual se incrementó a diferentes niveles durante el periodo de observación (Spolski y col., 2000). Por otro lado, granulomas removidos de ratones infectados con *T. crassiceps* 3 a 5 meses después de la infección producen IFN- γ e IL-2 (Robinson y col., 1997). En este trabajo se observó que la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas (IL-2, IFN- γ e IL-4) disminuyó 12 días después de la implantación de los metacéstodos de *T. solium* en ratón, estos resultados son apoyados por los reportados por Terrazas y col., (1998), quienes observaron una disminución de la respuesta proliferativa de células T de ratones infectados con *T. crassiceps*, así como una disminución significativa de IL-2 e IFN- γ 14 días después de la infección. Interesantemente, los mismos autores también encuentran un aumento significativo de IL-10 tan pronto como 2 a 4 semanas y hasta las 16 semanas después de la infección. En nuestro trabajo, la IL-10 no se expresó en los linfocitos de ninguno de los grupos estudiados a los 12 días después de la implantación de metacéstodos sin embargo, esta citocina pudiera inducirse mas tarde durante la infección, como se ha reportado en infecciones por *T. crassiceps* (Tarazas y col., 1998) y *T. solium* (Evans y col., 1998; Rodríguez y col., 2000).

Resultados recientes muestran un aumento de la producción de IL-4 a 24 h de la infección con *T. crassiceps* en esplenocitos estimulados con Con A de un modelo murino y un predominio de la producción de citocinas Th2 a los 7 días postinfección. En contraste, la estimulación de las células de ganglios mesentéricos, esplenocitos y células de exudado peritoneal con antígenos de larvas inducen la producción de una mezcla de citocinas Th1/Th2 con incremento de IL-4, IL-10 e IFN- γ . La respuesta inicial fue mediada por IFN- γ y rápidamente seguida por un incremento en la producción de IL-10 y la subsecuente reducción en la cantidad de IFN- γ (Toenjes y Kuhn, 2003).

Por otro lado, las concentraciones de IL-5 e IL-10 aumentaron en suero y en líquido cefalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis activa (Evans y col., 1998; Rodríguez y col., 2000; Chavarría y col., 2005). Los valores de IFN- γ en el espacio subaracnoideo fueron similares en pacientes y testigos (Ostrosky-Zeichner y col., 1996). En contraste, en células mononucleares de sangre periférica, estimuladas con antígenos de cisticerco se encontró elevación de IL-2 e IFN- γ (Grewal y col., 2000). Finalmente, granulomas cerebrales de pacientes con neurocisticercosis se asociaron con respuestas Th1 y Th2 (IFN- γ e IL-4) (Restrepo y col., 2001).

La secuencia de eventos en la NCC de acuerdo a la clasificación de Carpio y col. (1998) inicia con parásitos vivos e inmunosupresión del hospedero, y culmina con parásitos rodeados por reacciones granulomatosas e inmunoestimulación del hospedero. Cuando las lesiones calcificadas coexisten con uno o dos de los estadios previos (NCC mixta) la respuesta del hospedero

puede ser mixta. Si bien queda mucho por entender, una posibilidad de la respuesta inmune del hospedero a la infección por *T. solium* en relación con el estadio biológico del parásito puede ser la siguiente: después de la infección inicial con huevos de Taenia se producen anticuerpos protectores contra antígenos oncosferales (Molinari y col., 1993b), pero cuando los parásitos cambian a estados postoncosferales, estos anticuerpos ya no juegan un papel protector. En general, en estados de cisticercosis temprana, cuando los parásitos vivos están en proceso de desarrollo (de oncosferas a metacéstodos) secretan sustancias y modulan negativamente la respuesta inmune del hospedero (Spolski y col., 2000). El resultado de esta modulación es inmunosupresión, ya que las respuestas Th1/Th2 están reguladas negativamente. Esto fue observado desde los 2 primeros días (Letonja y col., 1987) y hasta 4 semanas después de la infección (Terrazas y col., 1998; Spolski y col., 2000) lo que concuerda con nuestros resultados. En un estado intermedio, cuando el parásito muere, se estimulan respuestas Th2 mientras que las células Th1 continúan siendo reguladas negativamente (Villa y Kuhn, 1996; Toenjes y col., 1999). Finalmente cuando los parásitos están granulomatosos o calcificados y el hospedero ya no está regulado negativamente se encuentran mezclas de respuestas Th1/Th2 (IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-5) (Robinson y col., 1997; Evans y col., 1998; Rodríguez y col., 2000; Grewal y col., 2000; Restrepo y col., 2001).

En cisticercosis humana son bien conocidos casos de NCC en los que diferentes estadios biológicos del parásito coexisten y el paciente presenta mezclas de respuestas Th1/Th2 (Evans y col., 1998). Por otro lado, el estado de la respuesta

del hospedero en los diferentes estadios depende de los antígenos que están siendo secretados activamente o que están siendo presentados o que empiezan a liberarse por la destrucción del parásito, ocasionada por la respuesta inmune que se genera ante el envejecimiento y/o muerte del metacéstodo.

En este estudio, utilizando un modelo ratón-metacéstodo de *T. solium* y análisis de citometría de flujo, reportamos que el parásito fue capaz, probablemente por medio de la fracción F1 y otras moléculas, de modular negativamente la activación de células CD4⁺ y CD8⁺ así como, la producción de citocinas (IL-2, IL-4 e IFN- γ) favoreciendo su desarrollo en el hospedero ya que, al inhibirse el proceso inflamatorio y la producción de citocinas, el parásito se encontraría protegido tanto de los mecanismos de inmunidad innata (inflamación) como de la inducción de la respuesta inmune por lo menos en lo que respecta a la activación celular por linfocinas.

CONCLUSIONES

1. Este trabajo nos permitió establecer que la fracción F1 del factor de metacésto disminuye la intensidad del proceso inflamatorio alrededor de metacésto implantados en ratón, sugiriendo que esta fracción es responsable en parte, de la inmunomodulación negativa de la respuesta inflamatoria que rodea al parásito.
2. El estudio histopatológico comparativo de los metacésto de *T. solium* implantados subcutáneamente en los diferentes grupos experimentales, reveló diferencias no solo en la intensidad sino también en la composición celular del proceso inflamatorio que rodeaba a los parásitos implantados. La reacción inflamatoria fue menos intensa en los ratones tratados con la fracción F1 y estaba constituida principalmente por eosinófilos mientras que, en los ratones solamente implantados, la inflamación fue mas intensa y rica en neutrófilos. Estas diferencias pueden deberse, a que la fracción F1 inhibió *in vivo*, como se observó *ex vivo*, la producción de citocinas, algunas de ellas pro-inflamatorias.
3. La activación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ medida a través de la expresión de CD25 en la superficie de estas células, permitió determinar que los linfocitos de ratones implantados o tratados con la fracción F1 estaban inmunodeprimidos. Sugiriendo que, los metacésto implantados liberan *in*

vivo la fracción F1, la cual puede ser responsable, junto con otras moléculas, de la modulación de la respuesta inmune del hospedero.

4. Nuestros resultados mostraron que la modulación negativa inducida por F1 no se debe a la estimulación de una subpoblación de células Th1 o Th2 en particular, ya que se observó disminución tanto de citocinas Th1 como Th2 (IL-2, IFN- γ e IL-4). IL-10 no se expresó en el tiempo experimental estudiado en ninguno de los grupos.

5. Finalmente, concluimos que el parásito fue capaz, probablemente por medio de la fracción F1 y otras moléculas, de modular negativamente la activación de células CD4⁺ y CD8⁺ así como, la producción de citocinas (IL-2, IL-4 e IFN- γ) favoreciendo su desarrollo en el hospedero ya que, al inhibirse el proceso inflamatorio y la producción de citocinas, el parásito se encuentra protegido contra los mecanismos de inmunidad innata (inflamación) y de la inducción de la respuesta inmune mediada por linfocinas.

BIBLIOGRAFIA

Abbas AK and Lichtman AH, 2004. Inmunología Celular y Molecular. España 5ª ed: Editorial Elsevier 345-366.

Abe T and Nawa Y, 1988. Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti* infected nude mice. Immunol 63: 181-185.

Aluja AS and Vargas G, 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. Vet Parasitol 28: 65-77.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E and Romagnani S, 2002. Phenotype, localization and mechanism of suppression of CD4⁺ CD25⁺ human thymocytes. J Exp Med 196: 379-387.

Arechavaleta F, Molinari J L and Tato P, 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. Parasit.Res 84: 117-122.

Ashwell G, 1957. Colorimetric analysis of sugar. In: Colowich S, Kaplan N (eds). Methods in enzymology. Academic Press, New York 3: 87-90.

Baig S, Damian RT, Molinari JL, Tato P, Morales-Montor J, Welch M, Talhouk J, Hashmeys R and White AC Jr, 2005. Purification and characterization of a metacestode cysteine proteinase from *Taenia solium* involved in the breakdown of human IgG. Parasitol 131: 411-416.

Befus AD and Bienenstock J, 1979. Immunologically mediated intestinal mastocytosis in *Nippostrongylus brasiliensis* infected rats. *Immunol* 38: 95-101.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA and Sacks DL, 2001. The role of interleukin 10 (IL-10) in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med* 194: 1497-1506.

BINASSS boletín, 2004. Influencia en la salud de los factores culturales y sociales de los inmigrantes. Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social (BINASSS). <http://www.binasss.sa.cr.bolet58.htm>.

Bloom BR, Modlin RL and Salgame P, 1992. Stigma variations: observations on suppressor T cells and leprosy. *Annu Rev Immunol* 10: 453-488.

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

Briceño CE, Biagi F y Martínez B. 1961. Cisticercosis. Observaciones sobre 9 casos de autopsia. *Prensa Médica Mexicana* 26:192-207.

Brostoff J, Scadding GK, Male D and Roitt IM, 1994. *Inmunología Clínica*. España: Editorial Mosby / Doyma Libros 2.1-22.12.

Bueno EC, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Avila SLM and Ferreira AW, 2001. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Clin Exp Immunol* 126: 304-310.

Burd PR, Rogers HW, Gordon JR, Martin CA, Jayaraman S, Wilson SD, Dvorak AM, Galli SJ. and Dorf ME. 1989. Interleukin 3-dependent and independent mast cell stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. J Exp Med 170: 245-257.

Burger CJ, Rikihisa Y and Lin YC, 1986. *Taenia taeniaeformis*: inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin-2 production in rat lymphocytes by larval *in vitro* product. Exp Parasitol 62: 216-22.

Butterworth AE, 1984. Cell mediated damage to helminths. Advanc Parasitol 23: 143-235.

Caballero S MA. 1998. Inmunología de la infección por helmintos. Rev. Esp. Alergol Inmmunol Clin 13: 297-313.

Canedo L. Laclette JP and Morales E, 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds) Cysticercosis present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York 363-373.

Capron A, Dessaint JP, Capron M, Ouma JH and Butterworth AE, 1987. Immunity to schistosomes: progress toward vaccine. Science 238: 1065-1072.

Cardona AE, Restrepo BI, Jaramillo JM and Teale JM, 1999. Development of an animal model for neurocysticercosis: immune response in the central nervous system is characterized by a predominance of $\gamma\delta$ T cells. J Immunol 162: 995-1002.

Carpio A, Escobar A and Hauser WA, 1998. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. *Epilepsy* 39:1025-1040.

Cavacini L. A, Long C. A and Weidanz WP, 1986. T-cell immunity in murine malaria: adoptive transfer of resistance to *Plasmodium chabaudi adami* in nude mice with splenic T cells. *Infect Immun* 52: 637-43.

Chavarria A, Fleury A, Garcia E, Marquez C, Fragoso G and Sciutto E, 2005. Relationship between the clinical heterogeneity of neurocysticercosis and the immune inflammatory profiles. *Clin Immunol* 116: 271-278.

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

Clark IA, Hunt NH, Butcher GA and Cowden WB, 1987. Inhibition of murine malaria (*Plasmodium chabaudi*) in vivo by recombinant interferon-gamma of tumor necrosis factor, and its enhancement by butylated hydroxy-anisole. *J Immunol* 139: 3493-96.

Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J and Rennick D, 1989. Antibody to Interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 245: 308-10.

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

Cortes I, Molinari JL, Solano S, Hernández-Mendoza L, Ramírez A and Tato P, 2003. *Taenia solium* metacestode antigens which are protective for pigs induce Th1/Th2 mixed responses in mice. Parasitol Res 90: 273-279.

Costero I, 1946. Tratado de anatomía patológica. México: Editorial Atlante, 1486-1495.

Craig PS, 1988. Surface-associated proteins and host IgG on early and late metacéstodo stages of *Taenia pisiformis*. Parasit Immunol 10: 243-254.

Dessaint JP, Camus D, Fischer E and Capron A, 1977. Inhibition of lymphocyte proliferation by factor produced by *Schistosoma mansoni*. Eur J Immunol 7: 624-629.

Dixon HBF and Lipscomb FM, 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. Medical Research Council special report series. London: Her Majesty's Stationary Service 299: 1-58.

Donaldson LE, Schmitt E, Huntley JF, Newlands GF, and Grancis RK, 1996. A critical role for stem cell factor and c-kit in host protective immunity to an intestinal helminth. Internat Immunol 8: 559-567.

Else KJ and Grancis RK, 1991. Cellular immune responses to the nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. Immunol 72: 508-513.

Escobar A. 1983. The pathology of Neurocysticercosis. In: Cisticercosis of central nervous system. Palacios E, Rodríguez-Carbajal J, Taveras JM (eds), Charles C Thomas, Springfield IL.

Evans CAW, García HH, Hartnell A, Gilman RH, Jose PJ, Martinez M, Remick DG, Williams TJ and Friedland JS, 1998. Elevated Concentrations of Eotaxin and Interleukin-5 in Human Neurocysticercosis. *Infect Immun* 66: 4522-4525.

Finkelman FD, Katona I M, Urban JFJ, Holmes J, Ohara J, Tung AS, Sample JG and Paul WE, 1988. Interleukin 4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 141: 2335-41.

Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JFJ, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR and Paul WE, 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol* 8: 303-33.

Finkelman F D, Pearce E J, Urban J F and Sher A, 1991. Regulation and biological function of helminth induced cytokine responses. In: *Immunoparasitology Today*, ed. C. Ash, R. Gallagher. Cambridge: Elsevier Trends A62-A66.

Flisser A, Correa D, Plancarte A, Sandoval M A, Avila G and Vallejo V, 1990. New approaches for the diagnosis of *Taenia solium* taeniosis /cysticercosis. *Ann Parasit Hum Comp* 65: 95-98.

Flisser A, 1994. Teniosis and cysticercosis due to *Taenia solium*, en S. Tsieh (comp), *Progress in Clinical Parasitology*. Boca Ratón: CRC Press 4: 77-116.

Gajewski TF, Pinnas M, Wong T and Fitch FW, 1991. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen presenting cell populations. *J Immunol* 146: 1750-1758.

Garrido E, Tato P. and Molinari JL, 2001. A factor isolated from *taenia solium* metacestodes stimulates T lymphocytes to proliferate and produce gamma interferon. *Parasitol Res* 87: 956-962.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Sheare GM and Sher A, 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146: 286-92.

Grencis RK, 1993. Cytokine-mediated regulation of intestinal helminth infections: the *Trichuris muris* model. *Ann Trop Med Parasitol* 87: 643-647.

Grewal JS, KAur S, Bhatti G, Sawhney IMS, Ganguly NK, Mahajan RCH and Malla N, 2000. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol Res* 86: 500-503.

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA and Kuby J, 2004. *Inmunología México* 5a ed: Editorial Mc Graw Hill 17: 24-60; 411-436.

Hammerberg B and Williams JF, 1978. Interaction between *Taenia taeniaeformis* and the complement system. *J Immunol* 120: 1033-1038.

Hammerberg B, Dangler C and Williams JF, 1980. *Tenia taeniaeformis*: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascade. *J Parasitol* 66: 569-576.

Hayunga EG, 1989. Parasites and immunity: tactical considerations in the war against disease or, how did the worms learn about Clausewitz. *Perspect Biol Med* 32: 349-370.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL and Locksley RM, 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper cell subset. *J Exp Med* 169: 59-72.

Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS and Locksley RM, 1991. Production of IFN γ , IL-2, IL-4 and IL-10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7011-15.

Herrera LA, Santiago P, Rojas G, Salazar PM, Tato P, Molinari JL, Schiffmann D and Ostrosky-Wegman P, 1994. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutation Res* 305: 223-228.

Hoerauf A, Satoguina J, Saefel M and Specht S, 2005. Immunomodulation by filarial nematodes. *Parasite Immunol* 27: 417-429.

Hortwitz DA, Zheng SG and Gray JD, 2003. The role of the combinations of IL-2 and TGF- β or IL-10 in generation and function of CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 74:471-478.

Hustead ST and Williams JF, 1971. Permeability Studies on Taeniid Metacestodes: I. Uptake of Proteins by Larval Stages of *Taenia taeniaeformis*, *T. crassiceps*, and *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol* 63: 314-321.

Judson DG, Dixon JB and Skerritt GC, 1987. Occurrence and biochemical characteristics of cestode lymphocyte mitogens. *Parasitol* 94: 151-160.

Intestinal Parasites: Control strategies. WHO documents. <http://www.who.int/ctd/intpara/strategies.html>.

Khan AI, Horii Y, Tiuria R, Sato Y and Nawa Y, 1993. Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Internat J Parasit* 23: 551-555.

Kuby J, 1997. *Immunology. Cell and Organs of the Immune System*. New York 3rd ed: WH Freeman and Comp 47-83.

Kumar S, Good MF, Dontfraid F, Vinetz JM and Miller LH, 1989. Interdependence of CD4⁺ T cells and malarial spleen in immunity to *Plasmodium vinckei*. Relevance to vaccine development. *J Immunol* 143: 2017-2023.

Kretschmer R, Lopez-Osuna M and Mateos H, 1970. Cisticercosis cerebral como problema de Salud Pública. *Gac Med Mex* 103: 242-246.

Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D and Nicholson-Weller A, 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 148: 124-128.

Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan Rc, Nawa Y, Dranoff G and Galli SJ, 1998. Role of interleukin-3 in mast-cell and basophil development and immunity to parasites. *Nature* 392: 90-93.

Langhorne J, Simon-Haarhaus B and Meding SJ, 1990. The role of CD4⁺ T cells in the protective immune response to *Plasmodium chabaudi* in vivo. *Immunol, Lett* 25: 101-8.

Lawrence CE, Paterson JC, Higgins LM, MacDonald TT, Kennedy MW and Garside P, 1998. IL-4 regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Europ J Immunol* 28: 2672-2684.

Lawrence CE, Paterson JC, Wei XQ, Liew FY, Garside P and Kennedy MW, 2000. Nitric oxide mediates intestinal pathology but not immune expulsion during *Trichinella spiralis* infection in mice. *J Immunol* 164: 4229-4234.

Lawrence CE, Kennedy MW and Garside P, 2001. Gut Immunopathology in Helminth Infections-Paradigm Lost? In *Parasitic nematodes*: Ed. W Harnett and MW Kennedy. *International Wallingford* 373-397.

Leid RW, Grant RF and Suquet CM, 1987. Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol* 17: 1349-1353.

Letonja T, Himmerberg C and Schurig G, 1987. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larva *Taenia taeniaeformis*. *Parasitol Res* 73: 265-270.

Liew FY, Hale C and Howard JG, 1982. Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. *J Immunol* 128: 1917-22.

Liew FY, 1989. Functional heterogeneity of CD4⁺ T cells in leishmaniasis. *Immunol Today* 10: 40-45.

- López-Vélez R, editor. 2002. En: Inmigración y Salud. López-Vélez R. Madrid: PBMS.
- López JA, García E, Cortés IM, Sotelo J, Tato P and Molinari JL, 2004. Neurocisticercosis: relationship between the developmental stage of metacestode present and the titre of specific IgG in cerebrospinal fluid. *Ann Trop Med Parasitol* 98: 569-79.
- Lorentz A, Schwengberg S, Sellge G, Manns MP and Bischoff SC, 2000. Human intestinal mast cell are capable of producing different cytokine profiles role of IgE receptor cross-linking and IL-4. *J Immunol* 164: 43-48.
- Loukas A and Prociv P, 2001. Immune responses in hookworm infections. *Clin Microbiol Rew* 14:689-703.
- Machnicka B and Grzybowski J, 1986. Host serum proteins in *Taenia saginata* metacestode fluid. *Vet Parasitol* 19: 47-54.
- Madden KB, Urban JF, Ziltener HJ, Schrader JW, Finkelman FD and Katona I M, 1991. Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth induced intestinal mastocytosis. *J Immunol* 147: 1387-91.
- Maizels RM, Bundy DAP and Selkirk ME, 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365:797-804.
- Mandujano A, Vela M, Alcántar P and Correa D. 1990. Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium* cysticerci. *Bull Soc Francaise Parasitol* 8: 578.

Marquez H. 1971, Cisticercosis In: Pathology of Protozoa and Helmintos diseases. Baltimore: Marcial R (ed) Williams & Wilhins,.

Martínez-Maya JJ, 2003. Teniosis y detección de anticuerpos anticisticercosis en personas de una comunidad rural del estado de Guerrero. Salud Pública de México. 45: 2.

Mc Manus DP and Lamsam S, 1990. *Taenia crassiceps* surface immunoglobulins: parasite-or host-derived? Parasitol 101: 127-137.

Medina-EScutia E, Morales-Lopez Z, Proano JV, Vazquez J, Bermudez V, Ortiz-Navarrete V, Madrid-Marina V, Lacleite JP and Correa D, 2001. Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: Lack of immune suppression. J Parasitol 87: 587-590.

Moqbel R, Sass-Kuhn SP, Goetzl EJ and Kay AB, 1983. Enhancement of neutrophil and eosinophil-mediated complement-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* in vitro by leukotriene B4. Clin Exp Immunol 52: 519-527.

Molinari JL, Meza R and Tato P, 1983a. *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. Exp Parasitol 56: 327-38.

Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P and Retana A, 1983b. *Taenia solium*: Immunity in hogs to cysticercus. Exp Parasitol 55:340-357.

Molinari JL, Tato P, Sepúlveda J and Carabez A, 1986. Ultrastructure evidence for damage of *Taenia solium* cysticerci from naturally parasitized, immunized hogs. Rev Lat Amer Microbiol 28: 47-61.

Molinari JL, Tato P and Valles Y, 1987. *Taenia solium*: Immunodepression of T-lymphocytes in hogs modulated by *Cysticercus cellulosae*. Rev Lat Am Microbiol 29: 293-300.

Molinari JL, Tato P, Reynoso O and Cázares JML, 1989. Modulation effects on mice response to a *Salmonella Typhimurium* infection by a cysticercus product of low molecular weight. Rev Lat Amer Microbiol 31: 327-333.

Molinari JL, Tato P, Reynoso O and Cázares JML, 1990. Depressive effect of a *taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. Ann Trop Med Parasitol 84: 205-208.

Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepúlveda J and Palet A, 1993a. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. Am J Trop Med Hyg 49: 502-512.

Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, and White AC Jr., 1993b. Effects of Serum from Neurocysticercosis Patients on the Structure and Viability of *Taenia solium* Oncospheres. J Parasitol 79: 124-127.

Molinari JL, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M and Sepúlveda J, 1998. Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacésto. Parasitol Res 84: 173-180.

Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, and Solano S, 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico, by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 69: 55-63.

Molinari JL, Mejia H, Ehte AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, BaigS, Tato P, 2000. *Taenia salium*: A cysteine protease secreted by metcestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol* 94: 133-142.

Mowat AM and Viney JL, 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rew* 156: 145-166.

Muller I, Pedrazzini T, Kropf P, Louis J and Milon G, 1991. Establishment of resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8⁺ T cells. *Int Immunol* 3: 587-97.

Neutra MR, Pringault E and Krechenbuhl JP, 1996. Antigen sampling across epithelial barriers and inducción of mucosal immune responses. *Ann Rew Immunol* 14: 275-300.

Organización Panamericana de la Salud (OPS), 1994. Epidemiología y control de la taeniosis y cisticercosis en América Latina, OPS/OMS, Washington.

OMS Boletín, 2004. La Atención Primaria de la Salud y el Programa REMEDIAR. Boletín PROAPS-REMEDIAR 2.

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

Pearce EJ and Mac Donald, 2002. The Immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rew Immunol* 2:499-511.

Phillips SM, Perrin PJ, Tung AS, Lin J, Diamantstein T and Galal N, 1991. Immune responses to *Schistosoma mansoni* infections in inbred rats. VII. Resistance is contingent on OX-8+ regulated high affinity IL-2 receptor-bearing W3/25+ lymphocytes but not on IL-4 dependent cells. *J Immunol* 147: 330-36

Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR and Maino VC, 1995. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/ effector T cells by flow cytometry. *Blood* 86: 1408-1419

Pond L, Wassom DL and Hayes CE, 1989. Evidence for differential induction of helper T cell subset during *Trichinella spiralis* infection. *J. Immunol.* 143: 4232-4237.

Rabiela MT, Rivas A, Castillo S and Cancino F, 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, In: *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives.* Ney York: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds), Academic Press.

Reiner SL, and Locksley RM, 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol* 13: 151-177.

Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA and Teale JM, 1998. Analysis of immune lesions in neurocysticercoid patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol* 89: 64-72.

Restrepo BI, Alvarez JI, Castaño JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH and Teale JM, 2001. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and TH2 profile. *Infect Immunol* 69: 4554-4560.

Ridaura C. 1987. Host response in childhood neurocysticercosis. *Child's Nerv Syst* 3: 206.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, Malefyt RDW, and Liu YJ, 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283: 1183-1186.

Robinson P, Atmar RL, Lewis DE and White CJr, 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 65: 2925-2931.

Roitt I, Brostoff J and Male D, 2001. *Inmunología*. España, 5a ed: Editorial Harcourt –Mosby 38-39; 243-261.

Rodrigues V Jr, de Mello FA, Magalhaes EP, Ribeiro SB and Marquez JO, 2000. Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res* 33: 1059-63.

Rubio M, Tato P, Govezensky T and Molinari JL, 1998. Depressed immunity to a *Salmonella typhimurium* vaccine in mice experimentally parasitized by *Taenia crassiceps*. *Vet Parasitol* 74: 179-189.

Sacks DL, Scott PA, Asofsky R and Sher FA, 1984. Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J. Immunol.* 132: 2072-2077.

Sakaguchi S, 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531-562.

Sarti E y Gutiérrez I, 1986. La teniasis y cisticercosis en México. (Revisión Bibliográfica), *Salud Pública de México* 28: 556-563.

Sciutto E, Fragoso G, Baca M, de la Cruz V, Lemus L and Lamoyi E. 1995. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 2277-2281.

Sealey M, Ramos C, Willms K and Ortiz-Ortiz L, 1981. *Taenia solium* Mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes. *Parasit Immunol* 3: 299-307.

Seder RA and RT Gazzinelli, 1998. Cytokines are critical in linking the innate and adaptative immune responses to bacterial, fungal, and parasitic infections. *Adv Int Med* 44: 144-179.

Shevach EM, 2000. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18: 423-449.

Sher A and Colley DG, 1989. Immunoparasitology. In: *Fundamental Immunology*, New York 2nd ed: W.E. Paul. raven 957-83.

Sher A and Coffman RL, 1992. Regulation of Immunity to Parasites by T cells and T cell-derived Cytokines. *Annu Rev Immunol* 10: 385- 409.

Scott P, Natovitz P and Sher A, 1986. B lymphocytes are required for the generation of T cells that mediate healing of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol* 137: 1017-1021.

Solano S, Cortés I, Copitin N, Tato P and Molinari JL, 2006. Lymphocyte apoptosis in the inflammatory reaction around *Taenia solium* metacéstodos in porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 140: 171-176.

Sotelo J, 1984. Cisticercosis y epilepsia. En: *Epilepsia, principios y práctica*. México. Editores: Velasco M, Vega G y Roman VJ. Editorial Camelice, IMSS. 199-205.

Sotelo J, Guerrero V and Rubio F, 1985. Neurocysticercosis: A new classification based on active and inactive forms. *Arch Intern Med* 45. 442-445.

Spolski RJ, Corson J, Thomas PG and Kuhn RE, 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol* 22: 297-305.

Springer TA, 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.

Stevenson MM, Tam MF and Nowotarski M, 1990. Role of interferon-gamma and tumor necrosis factor in host resistance to *Plasmodium chabaudi* AS. *Immunol, lett* 25: 115-21.

Suquet C, Green-Edwards C and Leid RW, 1984. Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metcestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol* 14: 165-172.

Tato P, Valles Y, Rolon R, Molinari JL, 1987. Effect of the immunization on immunodepressed hogs, infected naturally by *Cysticercus cellulosae*. *Rev Lat Am Microbiol* 29: 68-71.

Tato P, Castro AM, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F and Molinari JL, 1995. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacéstodo. Parasitol Res 81: 181-187.

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

Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepúlveda J and Molinari JL, 2004. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4⁺ T cells. Parasitol Res 92:197-204.

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

Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW and Rennick D, 1991. Interleukin-10: A novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. J Exp Med 173: 507-12.

Titus RG, Ceredig R, Cerottini JC and Louis JA, 1985. Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically-susceptible BALB/c mice. J Immunol 135: 2108-2114.

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

Toenjes SA and Kuhn RE, 2003. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type. Parasitol Res 89: 407-413.

- Vázquez Villegas J, Galindo Pelayo JP y Gámez Gámez E, 2003. Asistencia inicial a inmigrantes en atención primaria. FMC 10: 83-97.
- Villa OF and Kuhn RE, 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia solium* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down-regulation of Th1-associated phenomena. Parasitol 112: 561-570.
- Villagrana J and Olvera J, 1988. Human cysticercosis. A clinical and payhological study of 481 cases. Patol 26: 149-156.
- White AC Jr, Tato P and Molinari JL, 1992. Host-parasite interactions in *taenia solium* cysticercosis. Infect. Agents Dis 1: 185-193.
- White AC, Molinari JL, Pillai AV and Rege AA, 1992. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. J Parasitol 78: 281-287.
- White AC Jr, Robinson P and Kuhn R, 1997. *Taenia solium* cysticercosis: Host-parasite interactions and the immune response. Chem Immunol 66: 209-230.
- Willms K, Merchant MT, Arcos L, Sealey M, Diaz S and Diaz León L, 1980. Immunopathology of cysticercosis. In: Molecules and parasites in Immunology, eds. Larralde C, Willms K, Ortiz L, and Sela M. New York Academic Press 145-162.
- Willms K and Arcos L, 1997. *Taenia solium* cysticercosis: Host-parasite interactions and the immune response. Chem Immunol 66: 209-230.

Ximenez GC, Gómez A, Melendro EI, Rangel F, Ramiro M, Ramos F and Morán P, 2002. Las parasitosis Intestinales en México, Fundación Mexicana para la salud. México, cuaderno No. 36.

Yin Foo D, Nowak M, Copeman B and Mc Cabe M, 1983. A low molecular weight immunosuppressive factor produced by *Onchocerca gibsoni*. *Vet Immunol Immunopathol* 4: 445-451.