

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL**

**Composición celular y perfil de citocinas en la respuesta inmune
inducida por la vacuna S3Pvac en tejidos de cerdos infectados
experimentalmente con *Taenia solium***

T E S I S

**PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

CÉSAR MAZA SANTIAGO

**TUTORA: ALINE SCHUNEMANN DE ALUJA
COMITÉ TUTORAL: ARMANDO PÉREZ TORRES
ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ**

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Páginas
RESUMEN	<i>vi</i>
ABSTRACT	<i>vii</i>
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Antecedentes	1
1.2.- Taxonomía y características morfológicas del parásito	2
1.3.- Ciclo biológico	3
1.4.- Epizootiología y epidemiología	5
1.5.- Inmunología de infecciones por helmintos	6
1.5.1.- Células y moléculas efectoras	7
1.5.2.- Respuesta inmune en cisticercosis	9
1.5.3.- Modulación de la inmunidad del hospedador	12
1.6.- Diagnóstico	13
1.6.1.- Diagnóstico de cisticercosis porcina	13
1.6.2.- Diagnóstico de teniasis	14
1.7.- Estrategias de control	14
1.8.- Justificación	18
1.9.- Hipótesis	18
1.10.- Objetivo general	18
1.10.1- Objetivos específicos	18
II.- MATERIAL Y MÉTODOS	19
2.1.- Diseño experimental	20
2.2.- Procesamiento de las muestras	20
2.3.- Inmunohistoquímica	21
2.4.- Cuantificación de células inmunopositivas	23
2.5.- Análisis estadístico	25
III.- RESULTADOS	26
IV.- DISCUSIÓN	41
V.- CONCLUSIÓN	50
VI.- LITERATURA CITADA	51

LISTA DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1.- Características de los animales estudiados y zonas musculares seleccionadas por cada cerdo.	19
Cuadro 2.- Distribución de las zonas musculares y los anticuerpos primarios por cada animal.	20
Cuadro 3.- Características de los anticuerpos primarios y secundarios.	22
Cuadro 4.- Número de células/mm ² inmunopositivas a anti-IL4 en espaldilla.	26
Cuadro 5.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IL4 en masetero.	27
Cuadro 6.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IL4 en pierna.	27
Cuadro 7.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IFN- γ en espaldilla.	28
Cuadro 8.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IFN- γ en masetero.	28
Cuadro 9.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IFN- γ en pierna.	29
Cuadro 10.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IL-6 en espaldilla.	29
Cuadro 11.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IFN- γ en masetero.	30
Cuadro 12.- Número de células/ mm ² inmunopositivas a anti-IFN- γ en pierna.	30
Cuadro 13.- Efecto del tratamiento, zonas musculares y anticuerpos sobre el número final de células inmunopositivas, análisis de varianza, SPSS 10.	37

Cuadro 14.- Efecto de los diferentes anticuerpos sobre el conteo final de células inmunopositivas. Prueba de Tukey.	37
Cuadro 15.- Grados de inflamación por zona muscular en los animales control.	39
Cuadro 16.- Grados de inflamación por zona muscular en los animales vacunados.	40

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.- Funciones efectoras de las subpoblaciones de linfocitos T CD4 ⁺ (Th1 y Th2).	8
Figura 2.- División en cuatro cuadrantes del infiltrado inflamatorio grado 4-5 que rodea al metacestodo de <i>T. solium</i> , H y E, 10x.	24
Figura 3.- Cálculo del área del objetivo de 40x y del número de campos necesarios para obtener el número de células por mm ² .	24
Figura 4.- Células inmunopositivas a anti-IL-4 (A) y anti-IL-6 (B) en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de <i>T. solium</i> . C y D corresponden a tejidos de muestras control sin anticuerpo primario, 40x, IHC.	32
Figura 5.- Células inmunopositivas a anti-IFN- γ (B y C) en septos alveolares de pulmones de cerdos infectados con el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino. Las muestras control no se les aplicó el anticuerpo primario (A), 40x, IHC.	33
Figura 6.- Células inmunopositivas a anti-IL-4 en músculos de cerdos infectados con huevos de <i>T. solium</i> , vacunados con S3Pvac (A y C) y no vacunados (B y D). Las células positivas (flechas) se distribuyen formando una línea, entremezcladas con células no inmunopositivas (C). También se observan células inmunopositivas alrededor de vasos sanguíneos (Vs) (D), tegumento (tg), 40x, IHC.	34
Figura 7.- Células que presentan inmunopositividad intensa a anti-IL-6 en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de <i>T. solium</i> , vacunados con S3Pvac (A,C,D) y no vacunados (B). Las células positivas se distribuyen en los folículos linfoides (FL) de forma difusa (C) y de forma multifocal (flechas) en el espacio (e) entre el hospedador (h) y el metacestodo (D), 40x, IHC.	35
Figura 8.- Células inmunopositivas a anti-IFN- γ en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de <i>T. solium</i> , vacunados con S3Pvac (A y C) y no vacunados (B y D). Las células se distribuyen de forma multifocal (flechas) y detrás de la línea de encuentro con el tegumento (tg) del metacestodo (A y B), 40x, IHC.	36

Figura 9.- Distribución y error estándar de la media del número de células
Inmunopositivas para IL-4, IFN- γ e IL-6, $P < 0.05$. 38

Figura 10.- Distribución de los grados de inflamación en las muestras
de animales controles y vacunados. 40

RESUMEN

MAZA SANTIAGO CÉSAR. Composición celular y perfil de citocinas en la respuesta inmune inducida por la vacuna S3Pvac en tejidos de cerdos infectados experimentalmente con *Taenia solium*.

La teniasis-cisticercosis es una enfermedad común en zonas rurales de países en desarrollo y es causada por el parásito *Taenia solium*. Diversos factores sociales, económicos, culturales y de salud pública permiten que el parásito complete su ciclo biológico, afectando al hombre y a los cerdos. La inmunización de los cerdos con la vacuna S3Pvac es una medida para controlar esta parasitosis, en donde se ha observado una disminución en el porcentaje de animales vacunados e infectados naturalmente de hasta un 52.7%, al parecer mediado por una fuerte respuesta Th1 sérica. Hasta ahora, no se han descrito completamente los componentes celulares y moleculares que participan en la protección de la vacuna S3Pvac en la teniasis-cisticercosis. Por ello, es necesario completar el estudio de las subpoblaciones celulares y las citocinas presentes en el infiltrado inflamatorio alrededor del metacestodo de *T. solium* en cerdos infectados experimentalmente, vacunados o no con S3Pvac. El objetivo del presente trabajo fue analizar, por medio de inmunohistoquímica, la distribución de células CD4⁺, CD8⁺, y la expresión de IL-4, IL-6 e IFN- γ en el infiltrado inflamatorio alrededor de cisticercos en músculos de 5 cerdos infectados experimentalmente e inmunizados con S3PVac y en 5 controles no vacunados. No se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el número de células IL-4⁺, IL-6⁺ e IFN- γ ⁺, entre animales vacunados y controles, pero sí ($P < 0.05$) entre las células dentro de cada grupo, predominando claramente las IL-4⁺ e IL-6⁺ sobre las IFN- γ ⁺. Lo anterior sugiere que el perfil de citocinas *in situ* en la infección experimental de cerdos con *T. solium* es de tipo Th2 y que S3Pvac no lo determina. Se observó correlación entre los grados de inflamación y el número de células IL-4⁺ ($P < 0.06$), IL-6⁺ ($P < 0.002$) en controles y el número de células IFN- γ ⁺ ($P < 0.06$) y grados de inflamación en animales vacunados. Al parecer, la vacuna promueve la destrucción del metacestodo a través de inducir una respuesta inflamatoria global más prominente en animales vacunados.

Palabras claves: Cisticercosis porcina, vacuna S3Pvac, citocinas *in situ*, inmunohistoquímica.

ABSTRACT

MAZA SANTIAGO CÉSAR. Cellular composition and cytokine profile in the immune response induced by S3Pvac vaccine in tissues from experimentally infected pigs with *Taenia solium*

Taeniasis-cysticercosis is a common disease in the rural areas in developing countries. It is caused by the parasite *Taenia solium*. The life cycle of this parasite affects humans and swine allowed by several social, economic, cultural and public health factors. Swine immunization with S3Pvac vaccine is a control measure against this parasitic disease; a decrease in the percentage of vaccinated and naturally infected animals has been observed (down to 52.7 %), apparently mediated by a strong Th1 serological response. The cellular and molecular elements which participate in the protection induced by S3Pvac in taeniasis-cysticercosis have not been described yet. In light of this, it is necessary to complete the study of the cellular subpopulations and the cytokines present in the inflammatory infiltrate around the *Taenia solium* metacestode in pigs experimentally infected, whether they have been immunized or not with S3Pvac. The aim of this study was to analyze the distribution of CD4⁺, CD8⁺ cells and the IL-4, IL-6 expression by immunohistochemistry, in the inflammatory infiltrate around cysticerci in muscle from 5 pigs experimentally infected with *T. solium* and immunized with S3Pvac and 5 control, non-vaccinated pigs. There were no significant differences in the number of IL-4⁺, IL-6⁺ and IFN γ ⁺ cells between vaccinated and control animals ($P < 0.05$). A significant difference was observed among cells within each group, with a clearly predominance of IL-4⁺ and IL-6⁺ over IFN γ ⁺ cells ($P < 0.05$). This suggests that the *in situ* cytokines profile in experimentally infected pigs with *Taenia solium* is Th2 type and that S3Pvac does not define it. A correlation was observed between the inflammatory levels and the number of IL-4⁺ ($P < 0.06$), IL-6⁺ ($P < 0.002$) cells in control animals and between the number of IFN γ ⁺ cells and the inflammatory levels in immunized animals ($P < 0.06$). Data show that the vaccine promotes the destruction of the metacestode through the induction of a global inflammatory response, which is more evident in vaccinated animals.

Key words: Porcine cysticercosis, S3Pvac vaccine, *in situ* cytokines, immunohistochemistry.

I.- INTRODUCCIÓN.

1.1.- Antecedentes.

La Teniasis – cisticercosis es una enfermedad parasitaria frecuente en humanos y en cerdos de las zonas rurales de países en desarrollo, debido a la falta de educación, a las condiciones higiénicas deficientes, a la pobreza extrema, a la crianza rústica de los cerdos y a la falta de inspección sanitaria de la carne, que son los factores que favorecen su transmisión (Aluja, 1982). La infección por *Taenia solium* en humanos es una enfermedad conocida desde la antigüedad. En la segunda mitad del siglo XIX, Küchenmeister (1855), Leuckart (1879) y otros, principalmente en Alemania, describieron el ciclo parasitario de la enfermedad. Como consecuencia de estos conocimientos, se iniciaron medidas de higiene y de inspección sanitaria y la enfermedad fue prácticamente erradicada al inicio del siglo XX, en la mayoría de los países europeos y en los Estados Unidos de América (Rosenfeld *et al.*, 1996). Sin embargo, esta enfermedad ha comenzado a reaparecer, reportándose en países como Estados Unidos de América, debido a la afluencia de inmigrantes que provienen de zonas endémicas. En países de América Latina, África y Asia aún está presente la teniasis – cisticercosis, en donde el parásito logra llevar a cabo su ciclo completo, ocasionando graves daños a la salud pública y a la economía (Rosenfeld *et al.*, 1996).

1.2.- Taxonomía y características morfológicas del parásito del parásito.

El parásito *T. solium* se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Cheng, 1978):

Phylum: *Platyhelminthes*

Clase: *Cestoda*

Subclase: *Cestoda*

Orden: *Cyclophyllidae*

Familia: *Taeniidae*

Género: *Taenia*

Especie: *Taenia solium*

Según Leuckart (1879), el término *solium* es una latinización del árabe *sosl* o *susl* (cadena), a su vez del sirio *schuschl* (Lombardero, 1978). *T. solium* es un cestodo aplanado dorsoventralmente y de color blanco, anatómicamente se divide en tres regiones: el escólex, el cuello y la cadena estrobilar, adaptado para unirse a la mucosa intestinal del hospedador y sobrevivir en su ambiente (Cheng, 1978). El escólex es piriforme y globular de 1 a 2 mm, con un rostelo formado por dos coronas de ganchos en número de 22 a 32, de diferentes tamaños; los largos miden de 160 a 180 μm y los cortos 110 a 140 μm ; además, posee cuatro ventosas musculares que sirven como órganos de fijación (Yoshino, 1933). Después del escólex sigue el cuello que es corto, de aproximadamente la mitad del grosor del escólex. El cuello es la porción germinal donde se origina la tercera porción, compuesta por proglótidos inmaduros, maduros y grávidos que en número de 800 a 1000 forman la cadena estrobilar. El metacestodo de *T. solium* presente en tejidos subcutáneo, nervioso y muscular mide de 0.5 a 1.5 cm de longitud, está formado por una vesícula ovalada blanca o amarillenta, con una pared translúcida y llena de líquido a través de la cual se puede observar el escólex como un gránulo sólido blanquecino. Los metacestodos generalmente están separados del tejido del hospedador por una cápsula fina de colágena (Aluja *et al.*, 1987).

Los proglótidos grávidos miden 1 cm de largo por 0.7 cm de ancho. Los huevos que se encuentran en las ramas uterinas de los proglótidos grávidos, miden 30 a 40 μm de diámetro, son de paredes gruesas y radiadas, encierran en su interior al embrión hexacanto u oncósfera que es la forma infectante para el cerdo y para el hombre (Quiroz, 1999). Cada proglótido grávido contiene aproximadamente 50,000 huevos en distintos grados de madurez (Heath, 1982).

Estos parásitos son hermafroditas y, por lo tanto, cada proglótido tiene sistema reproductor femenino (ovarios, útero y vagina) y masculino (testículos, conducto deferente, vesícula seminal y cirro). Los proglótidos pueden fecundarse así mismos o cuando se adosan dos proglótidos. Aunque carecen de aparato digestivo propio se alimentan del contenido intestinal del hospedador al captar y asimilar el alimento a través del sincitio celular del tegumento, el cual absorbe por difusión o transporte activo y probablemente también por endocitosis, moléculas orgánicas de bajo peso molecular (Noble *et al.*, 1989).

1.3.- Ciclo biológico.

El ciclo de los cestodos involucra únicamente a 2 hospedadores: uno definitivo, en el caso de *T. solium*, el humano y otro intermediario, entre los que se encuentran los porcinos, caninos, ovinos, bovinos y roedores. Además, hay 3 estadios de desarrollo: la forma adulta en el hospedador definitivo, los huevos o proglótidos en el ambiente y el metacestodo en el hospedador intermediario y en el hospedador definitivo. La forma adulta del parásito se desarrolla en el intestino del hombre, después de ingerir carne de cerdo con metacestodos. La ingestión de los huevos o proglótidos, los cuales son eliminados en las heces del portador, produce la cisticercosis en humanos y cerdos (Cheng, 1978). Las oncósferas son liberadas en el duodeno por acción de los jugos digestivos y luego atraviesan la pared del intestino delgado y por vía sanguínea o linfática se dispersan prácticamente por todo el organismo, desarrollándose las larvas o metacestodos llamados también *Cisticercus cellulosae*.

Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida que contiene metacestodos vivos, estos evaginan y el escólex se fija en la mucosa del intestino delgado, por medio de sus ventosas y ganchos. Aproximadamente después de dos meses de desarrollo, el parásito alcanza la forma adulta y comienza a producir huevos completándose así su ciclo de vida. Debido a que los huevos se eliminan en las heces diariamente, la transmisión se favorece en zonas donde prevalecen bajos estándares de sanidad, de higiene personal, de control ambiental y donde el fecalismo al ras del suelo es común y los cerdos deambulan por los pueblos teniendo acceso a la materia fecal humana, la cual puede contener segmentos o huevos de *T. solium* (de Aluja, 1987).

En los humanos el metacestodo se aloja preferentemente en el sistema nervioso central y en menor grado, en el ojo, en el tejido subcutáneo y en los músculos (Rabiela *et al.*, 1982). En el cerdo, el metacestodo se desarrolla tanto en todas las masas musculares como en el sistema nervioso central. En un estudio se observó cierto orden de densidad de metacestodos en relación a distintas zonas musculares, teniendo más metacestodos los músculos psoas, maseteros, tríceps y músculos de la cabeza y la pierna (Boa *et al.*, 2002). En el continente americano la localización más frecuente es en el sistema nervioso central. En pacientes humanos, la sintomatología asociada a neurocisticercosis incluye: cefaleas intensas, epilepsia, mareos y convulsiones. A pesar de la potencial gravedad de la localización en el sistema nervioso, aproximadamente el 50 % de los pacientes neurocisticercosos no presentan síntomas ostensibles y la neurocisticercosis, en estos casos, es un hallazgo de necropsia o casual (Rabiela *et al.*, 1982).

1.4.- Epizootiología y epidemiología.

El cerdo desempeña un papel indispensable en la transmisión de la teniasis. La porcicultura rústica constituye un factor de relevancia en la transmisión ya que la crianza de cerdos se practica en zonas donde el fecalismo al ras del suelo es común.

Algunos hogares disponen de letrinas, pero éstas con frecuencia están construidas de tal forma que los cerdos tienen acceso a heces humanas, lo que permite la persistencia del ciclo del parásito. Otro factor de suma importancia es que la inspección sanitaria es deficiente o nula, ya que la mayoría de los cerdos de traspatio son sacrificados en el sitio de la crianza y no en un rastro autorizado. Sin un estricto control sanitario de la carne, no se podrá evitar el consumo de carne de cerdo parasitada con metacestodos de *T. solium* y, por ende, no se podrá controlar la transmisión de la teniasis (Huerta *et al.*, 2001). Los índices de prevalencia varían en los países endémicos, pero usualmente es de 1-10 % de casos de cisticercosis humana y 20-40 % de cisticercosis porcina (Del Brutto, 1998).

México es uno de los países en donde la teniasis - cisticercosis está distribuida ampliamente y han afectado la salud y economía de la población humana. Las zonas de mayor prevalencia en humanos se encuentran en las regiones centro occidental y en el sureste del país. La seroprevalencia de cisticercosis reportada en humanos en la República Mexicana es de 1.29 % (Larralde *et al.*, 1992). La frecuencia de cisticercosis porcina en áreas donde se crían los cerdos en forma semiconfinada es entre 13 y 30 % (Flisser *et al.*, 1984; Aluja y Villalobos, 2000). Debido a la falta de interés por parte de algunas dependencias de gobierno para controlar la teniasis - cisticercosis, el número de personas y cerdos afectados no disminuye. Se han estimado pérdidas a la porcicultura por cisticercosis del orden de \$ 43, 310,524.00 USD (Acevedo, 1982; Sarti *et al.*, 1994).

Dada la importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en todo el mundo, ésta enfermedad ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos, patológicos, de diagnóstico, tratamiento y prevención. El tratamiento de la neurocisticercosis en humanos se lleva a cabo con praziquantel y albendazol, siendo este último el de elección en México considerando su efectividad y su bajo costo. Se ha recomendado el uso de corticosteroides para minimizar la reacción inflamatoria generada por el tratamiento cisticida. El tratamiento de cerdos con praziquantel es muy efectivo, pero poco práctico para el criador, ya que después de la administración del medicamento habría que esperar varias semanas antes de poder ofrecer la carne al consumidor, lo que aumenta el costo de las canales y requiere de más programación que la existente para la venta o consumo en medios rurales (Flisser *et al.*, 1990; Del Brutto *et al.*, 1993; Sotelo *et al.*, 2000).

1.5.- Inmunología de infecciones por helmintos.

En los últimos años se han logrado importantes avances en el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de la respuesta inmune a infecciones parasitarias, específicamente por helmintos. Esto ha sido posible, en parte, por el descubrimiento de la respuesta inmune mediada por diferentes tipos de citocinas y linfocitos T (Mossman & Coffman., 1989; citado por Meeusen, 1999). La mayor parte de las investigaciones se han llevado a cabo en los modelos experimentales de ratones infectados por helmintos, debido a la gran variedad de marcadores celulares y anticuerpos disponibles para esta especie, además de la disponibilidad de ratones modificados genéticamente (ratones transgénicos y knock outs) que expresan o carecen de proteínas específicas. Sin embargo, se han obtenido resultados usando modelos experimentales con otras especies, en los que se ha demostrado la dificultad de equiparar resultados entre especies, y más aún, de poder explicar la respuesta inmune en infecciones de hospedadores naturales a partir de lo observado en ratones. Además, es necesario considerar los diferentes estadios del parásito y las etapas de respuesta inmune del hospedador, que generan diferentes tipos de respuesta inmune y deben tomarse en cuenta al momento de interpretar los resultados (Balic *et al.*, 1999).

1.5.1.-Células y moléculas efectoras.

En 1986, Mossmann *et al.* (Citado por Caballero, 1998) proponen la clasificación de las células T cooperadoras (Th, por sus siglas en inglés) en células tipo Th1 y Th2, según los perfiles de las citocinas sintetizadas (**Figura 1**). El papel de las células Th1 y Th2 ha llegado a constituir un dogma, en el que las respuestas mediadas por las células Th1 acaban con parásitos intracelulares y las respuestas tipo Th2 eliminan los extracelulares (Caballero, 1998). Según Allen y Maizels (citados por Caballero, 1998), es importante no establecer afirmaciones tan categóricas dentro del tipo de respuesta Th1 y Th2 y considerar la existencia de mecanismos superpuestos implicados en la defensa inmunitaria mediante citocinas individuales y las rutas que inducen. Las citocinas pueden definirse como proteínas pequeñas de 8 a 80 kDa aproximadamente, que actúan como moléculas de señalización entre las células del sistema inmunológico. Pueden actuar en concentraciones nanomolares y picomolares, su producción generalmente es transitoria y está regulada por diferentes células y otras moléculas efectoras (Roitt *et al.*, 2001). Las acciones de las citocinas pueden ser paracrinas, autocrinas y endocrinas (Abbas & Lichtman, 2004). Las células Th1 se han asociado, principalmente, con la producción de interleucina 2 (IL-2), interferón gamma (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada. Por su parte, los linfocitos Th2 se han relacionado con la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13, cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de inmunoglobulina E (IgE) e IgG1 en ratón o IgG4 en humanos, y promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos (Mossmann *et al.*, 1989; Constant *et al.*, 1997; O'Garra, 1998; Roitt *et al.*, 2001; Abbas & Lichtman, 2004).

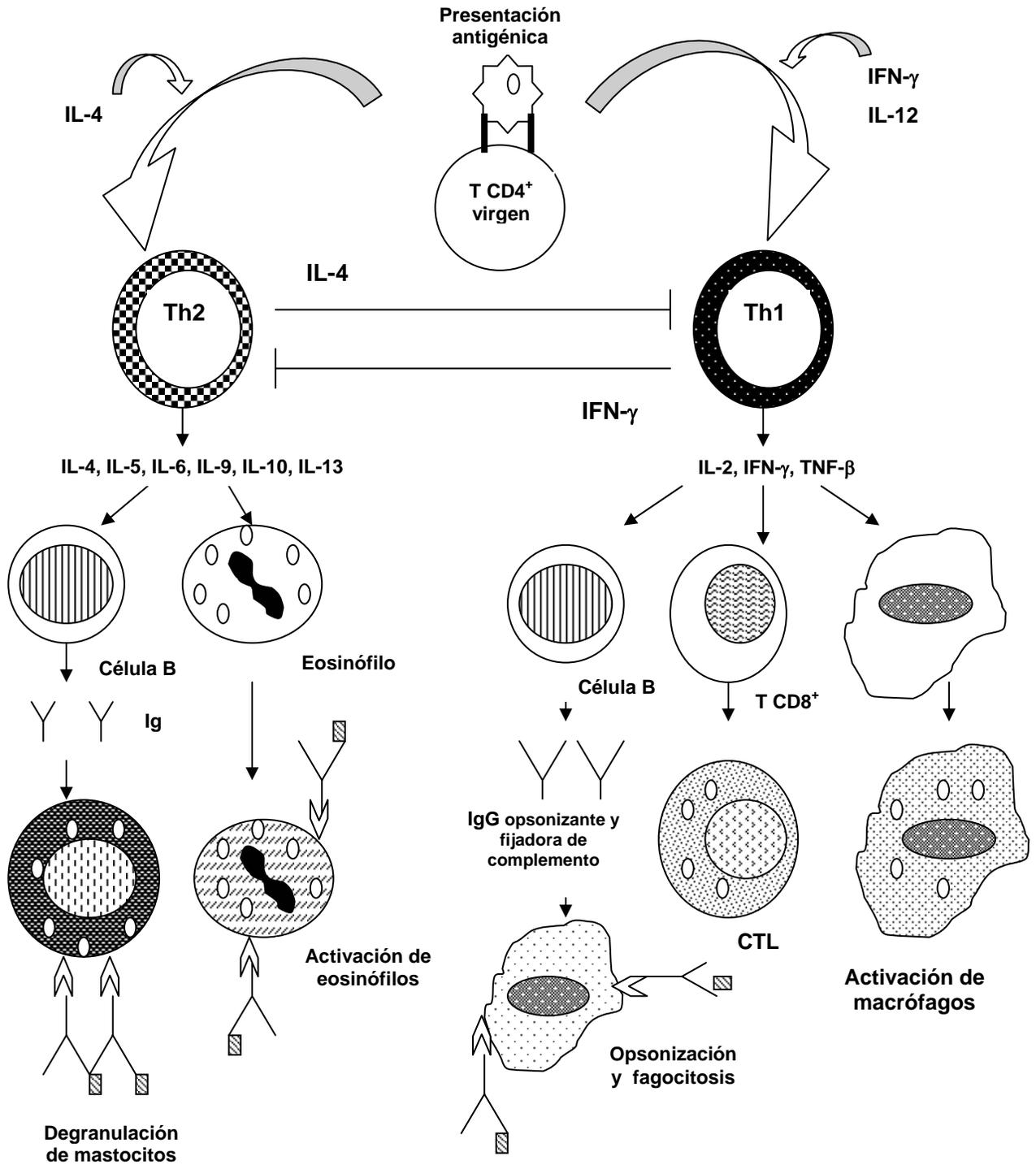


Figura 1. Funciones efectoras de las subpoblaciones $T\ CD4^+$ (Th1 y Th2). Citado por López-Moreno, 2002. Modificado de Abbas y colaboradores, 1996.

Las infecciones por helmintos han proporcionado algunas de las más claras evidencias del paradigma Th1/Th2 aplicado al sistema inmunológico humano (Allen *et al.*, 1996). Las clonas de células T específicas contra nemátodos aislados de seres humanos, generan citocinas del patrón de respuesta Th2, mientras que las clonas de células T contra antígenos bacterianos de los mismos individuos producen citocinas de respuesta Th1 (Romagnani *et al.*, 1997). El aumento del número de mastocitos y eosinófilos, así como las altas concentraciones de IgE e IgG4 son característicos de los individuos infectados por helmintos (Hussain *et al.*, 1981; Ottesen *et al.*, 1985, citados por Caballero, 1998). No está claro si la respuesta Th2 tras la infección por helmintos es benéfica para el hospedador o para el parásito (Maizels *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1993, citados por Caballero, 1998).

Las demostraciones de que los eosinófilos y la IgE pueden matar parásitos *in vitro* ha provocado la extendida creencia de que estas respuestas Th2 son principalmente responsables de la destrucción de grandes parásitos extracelulares. Sin embargo, en la mayoría de las infecciones por helmintos aparecen grandes cargas parasitarias a pesar de respuestas Th2 prominentes. Hasta ahora, es escasa la evidencia directa *in vivo*, del papel de los eosinófilos, de IgE y de mastocitos para controlar las infecciones por helmintos (Allen *et al.*, 1997).

1.5.2.-Respuesta inmune en cisticercosis.

Los eventos tempranos después de la ingestión de oncósferas, así como la velocidad y el tipo de reacción inmune determinan la resistencia o susceptibilidad para el establecimiento del metacestodo. Más tarde, la respuesta inmune ocurrirá concomitante a la presencia de parásitos vivos que activamente pueden evadir la destrucción por el sistema inmune del hospedador. Finalmente, el parásito es destruido por una reacción inflamatoria, en la evolución natural o después del tratamiento antiparasitario (Correa *et al.*, 1999).

Durante los primeros días después de la infección puede ocurrir el rechazo inmune del parásito o de la infección del hospedador por el cisticerco. Se ha probado que para varias especies de tenias (*T. taeniaeformis*, *T. ovis* y *T. hydatigena*) los anticuerpos y el sistema del complemento son los componentes protectores contra la oncosfera. Asimismo, se ha informado que en la etapa temprana de la cisticercosis experimental por *T. crassiceps* se presenta una respuesta inmune tipo Th1, con la producción de IFN- γ e IL-2. Posteriormente se presenta una respuesta tipo Th2, la cual se ha asociado con una mayor carga parasitaria (Terrazas *et al.*, 1999). En ratones BALB/c STAT6^{-/-} se presenta una fuerte respuesta tipo Th1, con producción de niveles elevados de IFN- γ , IL-12 y óxido nítrico (NO), que les permite controlar eficientemente la infección por *T. crassiceps*. En contraste, los ratones BALB STAT6^{+/+} desarrollan una respuesta tipo Th2 asociada a niveles elevados de IL-4, IL-13, IgG1, IgE y eosinofilia, permitiendo una mayor carga parasitaria (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2002).

En la cisticercosis por *T. crassiceps* en ratones y en la neurocisticercosis humana, se han observado linfocitos T $\gamma\delta$ en las fases iniciales de la infección y se piensa que influyen en el patrón predominante de citocinas tipo Th1. Es posible que la aparición temprana de linfocitos T $\gamma\delta$ en porcinos, pueda afectar el tipo de respuesta inmune alrededor de los cisticercos, en el sentido de controlar o eliminar la infección (Cardona *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999, Restrepo *et al.*, 2001). La aparición de una baja respuesta inmune de cerdos contra cisticercos no es debido a la incapacidad inherente del hospedador, sino a que probablemente el parásito media alguna clase de inmunosupresión o un cambio a una respuesta inmune tipo Th2 permisiva a la infección (Terrazas *et al.*, 1999).

Durante la fase aguda, en cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*, se han observado escasas células T CD4⁺ en el infiltrado de células inflamatorias alrededor del parásito. Pero conforme avanza la infección ocurre un incremento de linfocitos CD4⁺ en las fases tardías, así como de linfocitos B y en menor grado de linfocitos CD8⁺ (Pérez-Torres *et al.*, 2002; Londoño *et al.*, 2002).

Se ha descrito que en pacientes humanos con neurocisticercosis activa, la producción *in vitro* de IFN- γ por parte de células sanguíneas mononucleares periféricas (PMBC), ha sido estimulada por el fragmento amino de la paramiosina de *T. solium*, ya que este fragmento está asociado a una respuesta inmune de tipo celular, como se ha demostrado en el modelo murino experimental con el mismo parásito (Correa *et al.*, 1999). La intensidad y el tipo de inmunidad presente están asociados a la viabilidad y localización anatómica del parásito en el cerebro. En la mayoría de las lesiones se ha observado una respuesta celular evidente, con la presencia de citocinas inflamatorias como IL-12, IFN- γ y con ausencia de citocinas de tipo Th2 (Restrepo *et al.*, 1998).

También se ha demostrado en el modelo porcino experimental, que en la etapa temprana de la respuesta inmune, los macrófagos, los eosinófilos y los astrocitos expresan una adhesina CD44, siendo importante para el reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la lesión y para la interacción célula-célula que se presenta en el infiltrado del granuloma. Es probable que los astrocitos puedan alterar la expresión de adhesinas y secretar citocinas que modifiquen la respuesta inmune local (Londoño *et al.*, 2002).

Se ha observado experimentalmente que los metacestodos ubicados en músculo esquelético de cerdos, se mueren en un tiempo que oscila entre 6 y 9 meses y degeneran rodeados por una reacción inflamatoria intensa con infiltración celular clasificada desde grado 3 a grado 6, caracterizada por la presencia de eosinófilos, linfocitos, macrófagos, células gigantes, folículos linfoides y fibroblastos. Los eosinófilos que se encuentran especialmente cercanos a la superficie del tegumento degranulan y sus enzimas dañan al metacestodo así como a los eosinófilos (Aluja y Vargas, 1988).

1.5.3.- Modulación de la inmunidad del hospedador.

La fase tisular de los cestodos se divide en cuatro estadios: liberación y penetración de la oncósfera, migración en los tejidos, reorganización de la oncósfera y metacestodo organizado. Existe evidencia de que estos estadios producen una respuesta humoral durante la infección natural (Atias, 1994). También existe cierta acción inhibitoria y en forma ocasional lítica, sobre las oncósferas en proceso de penetración en la mucosa intestinal. Las oncósferas inducen una reacción mononuclear fuerte, según migran en los tejidos. Además de los linfocitos, los vestigios del recorrido de las larvas de los parásitos suele rodearse por eosinófilos (Outteridge, 1989; Atias, 1994). En contraste, el metacestodo organizado es resistente a la reacción inmune. Aunque estimula cierto grado de respuesta inmunológica, no existe evidencia sólida de que la inmunidad celular y humoral tengan actividad protectora contra los metacestodos. Un estudio mostró que en infecciones severas con cisticercos en cerdos, los antígenos y anticuerpos fueron detectados en sangre desde los 29 hasta los 200 días post infección; en infecciones leves los primeros antígenos y anticuerpos fueron observados desde 61 hasta 97 días post infección (Sciutto *et al.*, 1998). Santamaría *et al.* (2002) describen la presencia de anticuerpos a los 60 días post infección en animales inoculados con 10 a 100 huevecillos, y a los 30 días post infección en aquellos cerdos inoculados con 1000 o más huevecillos, sugiriendo la posibilidad de una regulación del sistema inmune dependiente de la carga parasitaria.

Algunas investigaciones sugieren que los cisticercos en su fase vesicular son altamente inmunogénicos y generan una respuesta inmune que destruye al parásito (Rabiela- Cervantes *et al.*, 1982, Escobar *et al.*, 1983). Otros estudios indican que los cisticercos vesiculares son relativamente no inmunogénicos y solamente cuando el parásito muere y libera sus antígenos es cuando se produce una respuesta inflamatoria intensa (Restrepo *et al.*, 1998).

El cisticerco de *T. solium* puede evadir parcialmente al sistema inmune a través de diferentes mecanismos. Se ha investigado y clonado la paramiosina (anteriormente conocida como antígeno B), la cual presenta características similares a la paramiosina de invertebrados, y al estudiarla *in vitro* se ha observado que se une e inhibe al fragmento C1q del sistema complemento, ya que este presenta una estructura cuaternaria similar al colágeno y la paramiosina tiene alta afinidad a esta proteína, de tal manera que se inhibe la vía clásica del sistema complemento (Laclette *et al.*, 1992; Landa *et al.*, 1993).

Se ha identificado un producto secretor denominado factor del metacestodo (MF), el cual tiene un efecto supresor en la respuesta inmune celular y humoral frente a este parásito. Cuando se cultivan linfocitos con el MF se observa una disminución en la producción de IL-2, IFN- γ e IL-4 (Arechavaleta *et al.*, 1998; Vargas-Parada *et al.*, 2003). Por otro lado, Tato *et al* (2004) han identificado una proteasa de cisteína en los productos de excreción/secreción de *T. solium* que induce la apoptosis de linfocitos CD4⁺.

1.6.- Diagnóstico.

1.6.1.-Diagnóstico de cisticercosis porcina.

a) *Inspección sanitaria y frecuencia.* Para su detección en los rastros, se realiza un solo corte profundo en los músculos de la canal del lado derecho, que se encuentran inmediatamente por arriba de la articulación del codo (músculo tríceps), debido a que en el cerdo la localización del metacestodo es predominantemente muscular (Vargas *et al.*, 1986). El examen de lengua es una prueba ante-mortem que se lleva a cabo por observación y palpación de las caras inferior y laterales de la lengua en busca de quistes que produzcan relieve. Con este método, sólo puede ser detectado un número bajo de animales afectados (Sciutto *et al.*, 1998)

b) *Diagnóstico serológico*. Entre las pruebas de inmunodiagnóstico utilizadas se encuentra el Western blot, el cual también se usa para el diagnóstico de cisticercosis humana.

c) La ELISA ha sido utilizada en cerdos infectados experimentalmente, observando que en los cerdos altamente parasitados se detectaron anticuerpos a los días 29, 52, 92, 167 y 200 días post-infección (Sciutto *et al.*, 1998).

1.6.2.- Diagnóstico de teniasis.

El diagnóstico de la infección humana por *T. solium* se hace con base en los antecedentes de eliminación de proglótidos y huevos en las heces y por medio del raspado perianal (Aluja, 1982, Allan *et al.*, 1992). También se ha utilizado la detección de coproantígenos específicos de cestodos en materia fecal, por medio de ELISA (Allan *et al.*, 1992; Flisser *et al.*, 1991).

1.7.- Estrategias de control.

Se considera que una campaña para controlar la teniasis - cisticercosis en un país debe comprender:

- Educación de la población que incluye la higiene personal, higiene para preparar los alimentos e instalaciones obligatorias de letrinas con drenaje y sin acceso a los cerdos en todos los hogares.

- Inspección sanitaria de toda la carne destinada para el consumo humano.

- Combate de la corrupción en la compra y venta de animales y sus derivados.

(Huerta *et al.*, 2001)

Sin embargo, mientras el progreso social y educativo no tenga un nivel propicio para evitar la incidencia de esta enfermedad, es necesario implementar estrategias alternativas de control. Entre las alternativas para controlar esta zoonosis y que no están estrictamente relacionadas con las conductas humanas figuran:

1.- Irradiación de la carne con dosis bajas de 0.3 kGy (NOM-033-SSA1-1993), es una tecnología bien establecida y permitida en muchos países, incluyendo a México. Es un método que tiene la ventaja de inactivar varios agentes patógenos al mismo tiempo (Aluja *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 1996).

2.- La vacunación contra la cisticercosis porcina, la cual ha producido resultados promisorios (Sciutto *et al.*, 1990, 1995; Molinari *et al.*, 1993; Nacimiento *et al.*, 1995; Manoutcharian *et al.*, 1996; Molinari *et al.*, 1997; Huerta *et al.*, 2001; Flisser *et al.*, 2004)

3.- Modificación genética de hospedadores susceptibles para aumentar su resistencia innata mediante transferencia de genes de resistencia (Fragoso *et al.*, 1998).

La alternativa para interrumpir el ciclo de vida del parásito por vacunación se ha considerado como posibilidad realista para disminuir la prevalencia de la cisticercosis porcina y reducir la enfermedad humana. En los últimos 20 años ha habido avances importantes en el desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina. Numerosos investigadores han experimentado inmunógenos con resultados alentadores (Molinari *et al.*, 1993; Nacimiento *et al.*, 1995; Sciutto *et al.*, 1995; Plancarte *et al.*, 1999; Flisser *et al.*, 2004). Las dificultades económicas que presenta la experimentación con cerdos, así como la dificultad de conseguir proglótidos de *T. solium* de infecciones naturales en humanos, constituyen un obstáculo para la evaluación de inmunógenos de interés.

Con la finalidad de salvar estas limitaciones se comenzó a estudiar la cisticercosis murina causada por el cestodo *T. crassiceps*. Los metacestodos de ambos parásitos presentan similitudes morfológicas, antigénicas y tienen un hospedador intermediario y uno definitivo (Larralde *et al.*, 1990). Considerando estos hallazgos, se identificaron los antígenos protectores presentes en un extracto antigénico total de metacestodos de *T. crassiceps* (Valdez *et al.*, 1994). Se obtuvieron electroforéticamente 12 fracciones antigénicas de entre 8 kDa a 220 kDa, las cuales fueron utilizadas individualmente para evaluar su capacidad protectora en ratones. De ellas se seleccionaron tres fracciones antigénicas de 56, 66 y 74 kDa (Manoutcharian *et al.*, 1996).

Al mismo tiempo, dichos antígenos fueron capaces de ser reconocidos por sueros de cerdos infectados con metacestodos de *T. solium* (Valdez *et al.*, 1994). Estas fracciones también fueron utilizadas como inmunógenos en el cerdo, obteniéndose altos niveles de protección en los animales vacunados y confirmando así su capacidad protectora (Manoutcharian *et al.*, 1996).

A través de la técnica de DNA recombinante se construyó una biblioteca de DNAC utilizando RNAm de metacestodos de *T. crassiceps*. Se obtuvieron un total de 180,000 clonas individuales. De las clonas identificadas se seleccionaron aquellas que también fueron reconocidas por sueros de cerdos infectados con *T. solium*, ya que de esta manera se pudo asegurar que las clonas codificaban antígenos de *T. crassiceps* homólogos a los de *T. solium*. Las clonas se denominaron KETc-1, KETc-4, KETc-7, KETc-11 y KETc-12 (Manoutcharian *et al.*, 1996). Con el propósito de identificar las regiones antigénicas protectoras en estos antígenos recombinantes, se comenzó a analizar el antígeno KETc-7. Se seleccionaron tres regiones que se denominaron GK-1, GK-2 y GK-3, las que fueron sintetizadas químicamente. Estos tres péptidos fueron reconocidos por ratones con metacestodos y no así por los que no estaban infectados (Gevorkian *et al.*, 1996).

Recientemente, se ha desarrollado una vacuna denominada S3Pvac, constituida por los tres péptidos sintéticos GK-1, KETc-1 y KETc-12 (Toledo *et al.*, 1999; 2001), la cual ha sido aplicada a cerdos infectados de manera natural en diferentes comunidades rurales en México, reduciendo el porcentaje de cerdos infectados en un 52.7 %. En la infección y vacunación experimental se encontró que la gran mayoría de los metacestodos en los animales vacunados estaban desintegrados, no así en los controles. También se observó que la edad óptima de cerdos mestizos para inducir inmunidad por vacunación en condiciones experimentales de infección, es a los 60 días. Asimismo, se encontró que la vacunación indujo la formación de IgA e IgG anticisticerco en el calostro de cerdas vacunadas, mismos que se transfirieron a los lechones (Huerta *et al.*, 2001).

Se ha observado que la aplicación del péptido GK-1 induce la formación de anticuerpos circulantes que interfieren con el desarrollo del metacestodo a parásito adulto. Por otro lado, se ha observado que en cerdos infectados experimentalmente con *T. solium* y vacunados con S3Pvac, las PMBC producen una fuerte respuesta de linfocitos Th1, pero no de tipo Th2. Cabe destacar que la respuesta inmune fue evaluada con células sanguíneas incubadas con cada uno de los péptidos que componen la vacuna S3Pvac y la detección de las citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-2 se llevó a cabo mediante ELISA en sueros (Díaz *et al.*, 2003).

1.8.- JUSTIFICACIÓN.

A pesar de que se han logrado avances en el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina, aún no se han descrito completamente los componentes de la respuesta inmune involucrados en la resistencia frente al parásito, especialmente a nivel tisular. Es por esto que es necesario estudiar el papel de las diferentes subpoblaciones de linfocitos, así como las citocinas que secretan, para poder determinar de qué manera se organiza la respuesta inmune frente al metacestodo de *T. solium*, en cerdos infectados experimentalmente, vacunados con S3Pvac y controles.

1.9.- HIPÓTESIS.

La respuesta inmune inducida por infección experimental con huevos de *T. solium* a nivel tisular en cerdos inmunizados con la vacuna S3Pvac, será predominantemente de tipo Th1 (IFN- γ), con incremento de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, mientras que en los controles será tipo Th2 (IL-4, IL-6).

1.10.- OBJETIVO GENERAL.

Determinar por inmunohistoquímica, la población de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, así como el balance de citocinas Th1 (IFN- γ) y Th2 (IL-4, IL-6) en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*, inmunizados o no con la vacuna S3Pvac.

1.10.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar por inmunohistoquímica la distribución de las células que expresen CD4⁺, CD8⁺, IL-4, IL-6 e IFN- γ , presentes en el infiltrado inflamatorio alrededor del metacestodo de *T. solium*.
- Cuantificar las células inmunopositivas de cada muestra de tejido muscular.
- Determinar el grado de inflamación y correlacionar con el número de células inmunopositivas a anti-CD4⁺, anti-CD8⁺, anti-IL-4, anti-IL-6 y anti-IFN- γ .

II.- MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 cerdos de raza Landrace x Yorkshire, de dos meses de edad, se dividieron en 2 grupos de 5 animales, un grupo fue tratado a los 60 y 90 días de edad con 250 μ L de la vacuna S3Pvac (1:1:1 de GK1, KETc1 y KETc12, Toledo *et al.*, 1999; 2001) y 100 μ L de saponina y al segundo grupo se le administró 100 μ L de saponina en las mismas edades, para servir de controles. Ambos grupos fueron desafiados con 10,000 huevos de *T. solium*. Los animales fueron sacrificados humanitariamente y se seleccionaron 3 diferentes zonas musculares con metacestodos de cada uno de los 10 animales, las cuales fueron: espaldilla, masetero y pierna. El criterio para seleccionar estas zonas se basó en la carga parasitaria observada y en el tipo de metacestodo presente, principalmente coloidales y/o calcificados. Las características de los animales se describen en el **cuadro 1**.

Cuadro 1.- Características de los animales estudiados y zonas musculares seleccionadas por cada cerdo.

No. de cerdo	Género	Peso	Músculos	Tratamiento
1	Macho	80 kg	Espaldilla, masetero, pierna	C
2	Macho	85 kg	Espaldilla, masetero, pierna	C
3	Macho	80 kg	Espaldilla, masetero, pierna	C
4	Hembra	80 kg	Espaldilla, masetero, pierna	C
5	Hembra	75 kg	Espaldilla, masetero, pierna	C
6	Hembra	90 kg	Espaldilla, masetero, pierna	V
7	Hembra	90 kg	Espaldilla, masetero, pierna	V
8	Hembra	75 kg	Espaldilla, masetero, pierna	V
9	Hembra	80 kg	Espaldilla, masetero, pierna	V
10	Macho	85 kg	Espaldilla, masetero, pierna	V

C: Control, V: Vacunado.

2.1.-Diseño experimental.

Cada muestra fue expuesta a cada uno de los anticuerpos por separado, por lo que se utilizaron 5 muestras por zona muscular y 15 por animal (**Cuadro 2**).

Cuadro 2.- Distribución de las zonas musculares y los anticuerpos primarios por cada animal.

1 cerdo	Espaldilla	Anti-pCD4 ⁺ Anti-pCD8 ⁺ Anti-pIL-4 Anti-pIL-6 Anti-pIFN- γ	5 cortes
	Masetero	Anti-pCD4 ⁺ Anti-pCD8 ⁺ Anti-pIL-4 Anti-pIL-6 Anti-pIFN- γ	5 cortes
	Pierna	Anti-pCD4 ⁺ Anti-pCD8 ⁺ Anti-pIL-4 Anti-pIL-6 Anti-pIFN- γ	5 cortes
Total:			15 cortes/animal

2.2.-Procesamiento de muestras.

Los animales se sacrificaron de forma humanitaria a los tres meses de edad, para recolectar las muestras de las zonas musculares (**Cuadro 1**), las cuales se fijaron en formol al 10% durante 24 h y posteriormente se procesaron para inclusión en parafina. Se hicieron cortes seriados de 5 μ m de grosor de cada bloque de parafina, así como tinciones con hematoxilina/eosina para determinar el grado de inflamación (Aluja y Vargas, 1988). Para la técnica de inmunohistoquímica, los cortes fueron de 2–3 μ m de grosor, montados sobre portaobjetos cargados positivamente (Starfrost, Biocare Medical). Las muestras se desparafinaron en una estufa a 56 °C durante 15-20 minutos y posteriormente se rehidrataron progresivamente en xilol, etanol absoluto, etanol de 96° y agua destilada.

2.3.-Inmunohistoquímica.

Se empleó la técnica de avidina/biotina/peroxidasa (ABC, modificado de Haines & Chelack, 1991). Una vez que los tejidos se desparafinaron y se rehidrataron, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol (1:10), durante 10 minutos. Después se hicieron lavados con agua destilada y TBS de 5 minutos cada uno.

Para reactivar sitios antigénicos se probaron tres métodos:

- 1.- Calor y amortiguador de citratos, pH 6.0 (41.5 mL de citrato de sodio, 9.5 mL de ácido cítrico, 49 mL de agua destilada).
- 2.- Pronasa al 0.0025%, pH 7.4, durante 10 minutos a 37 °C (Biocare Medical).
- 3.-Tripsina (IX Sigma) al 0.1%, pH 7.6, durante 12 minutos a temperatura ambiente.

Para la recuperación con calor y amortiguador de citratos, las muestras se colocaron en un frasco coplin de plástico con amortiguador de citratos, el cual se introdujo en una olla de presión, que contenía 900 mL de agua de la llave. La olla de presión se calentó durante 25 a 30 minutos en una platina a la máxima intensidad. Al subir el pivote de peso se bajó la temperatura a nivel intermedio durante 10 minutos. Después se retiró la olla y se dejó enfriar durante 15 minutos. Se bloqueó de nuevo la peroxidasa endógena como se describió. A continuación se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con anticuerpos, utilizando suero bloqueador comercial hecho en cabra (kit histostain-SP, Zymed Lab. Inc.) y suero preparado con 1 g de albúmina sérica bovina (96-99% ASB, Sigma-Chemical), 10 µL de Tritón X-100 y 100 mL de TBS, durante 10 minutos y 1 h, respectivamente. Después se aplicaron dos gotas del anticuerpo primario (25 µL/gota) y se incubó a 4 °C en cámara húmeda durante 12-16 h. Todos los anticuerpos primarios y el secundario biotinilado anti-cabra se diluyeron en amortiguador TBS de 0.05 M, pH 7.3 (1.38 g de Trizma base, 6.06 g de Trizma-HCl y se aforó a 1 L con agua destilada). Las características de los anticuerpos utilizados y las diluciones correspondientes para cada uno se muestran en el **cuadro 3**.

Cuadro 3.- Características de los anticuerpos primarios y secundarios.

Anticuerpos	Tipo	Especificidad	Origen	Marca	Concentración	Diluciones
Anti-CD4 ⁺	Monoclonal primario	Cerdo	Ratón	VMRD	1 mg/mL	15 µg/mL
Anti-CD8 ⁺	Monoclonal primario	Cerdo	Ratón	VMRD	1 mg/mL	15 µg/mL
Anti-IL-4	Monoclonal primario	Cerdo	Cabra	R&D Systems	100 µg/mL	15 µg/mL
Anti-IL-6	Monoclonal primario	Cerdo	Ratón	R&D Systems	500 µg/mL	25 µg/mL
Anti-IFN- γ	Policlonal biotinilado primario	Cerdo	Cabra	R&D Systems	50 µg/mL	16 µg/mL
Anti-IgG	Monoclonal secundario	Ratón	Cabra	Zymed Lab.	----	1:100
Anti-IgG	Monoclonal secundario	Cabra	Conejo	R&D Systems	----	Uso directo sin diluir

Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 minutos c/u con TBS y se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados de 5 minutos c/u con TBS para después aplicar el complejo estreptavidina/biotina/peroxidasa comercial (Kit histostain-SP, Zymed Lab. Inc.), durante 35 minutos.

Aparte de aplicar el complejo comercial, se utilizó un complejo preparado en el laboratorio, mezclando 10 µL de estreptavidina (DAKO, 1 mL), 10 µL de biotina-peroxidasa (DAKO, 1 mL), 1 mL de TBS, y se aplicó durante 1 h. Después de lavar con TBS se utilizó el cromógeno aminoetilcarbazol (Kit histostain-SP, Zymed Lab. Inc.; color rojo) aplicándolo durante 7 minutos. La contratinción se hizo con hematoxilina de Mayer (Kit histostain-SP, Zymed Lab. Inc.) durante 3 minutos.

Los portaobjetos se lavaron con agua destilada y agua de la llave, para finalmente montar con resina hidrosoluble (Kit histostain-SP, Zymed Lab. Inc.). En los tejidos utilizados como controles negativos para la prueba de inmunohistoquímica, se sustituyó el anticuerpo primario por TBS. Para los controles positivos de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, citocinas IL-4 e IL-6 se utilizaron tejidos de nódulos linfáticos mediastínicos y timo de cerdos clínicamente sanos, procesados de la misma manera que el tejido muscular. Para el control positivo de IFN- γ se utilizaron cortes de pulmón, hígado y bazo de cerdos infectados con el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (*Togaviridae*) y con *Salmonella* sp.

2.4.-Cuantificación de células inmunopositivas.

El criterio de inclusión para células positivas fue la observación de:

-Células con núcleo basófilo, rodeado de citoplasma bien delimitado y de color rojo intenso.

El conteo se llevó a cabo dividiendo en cuatro cuadrantes el infiltrado inflamatorio que rodeaba al metacestodo (**Figura 2**). De cada cuadrante se seleccionaron 5 campos aleatorios con el objetivo 40x contando siempre en el sentido de las manecillas del reloj. La suma del área de los 5 campos da 1.02 mm², por lo que el conteo se expresó en número de células por mm² (**Figura 3**). Se obtuvo la sumatoria de los 4 cuadrantes.

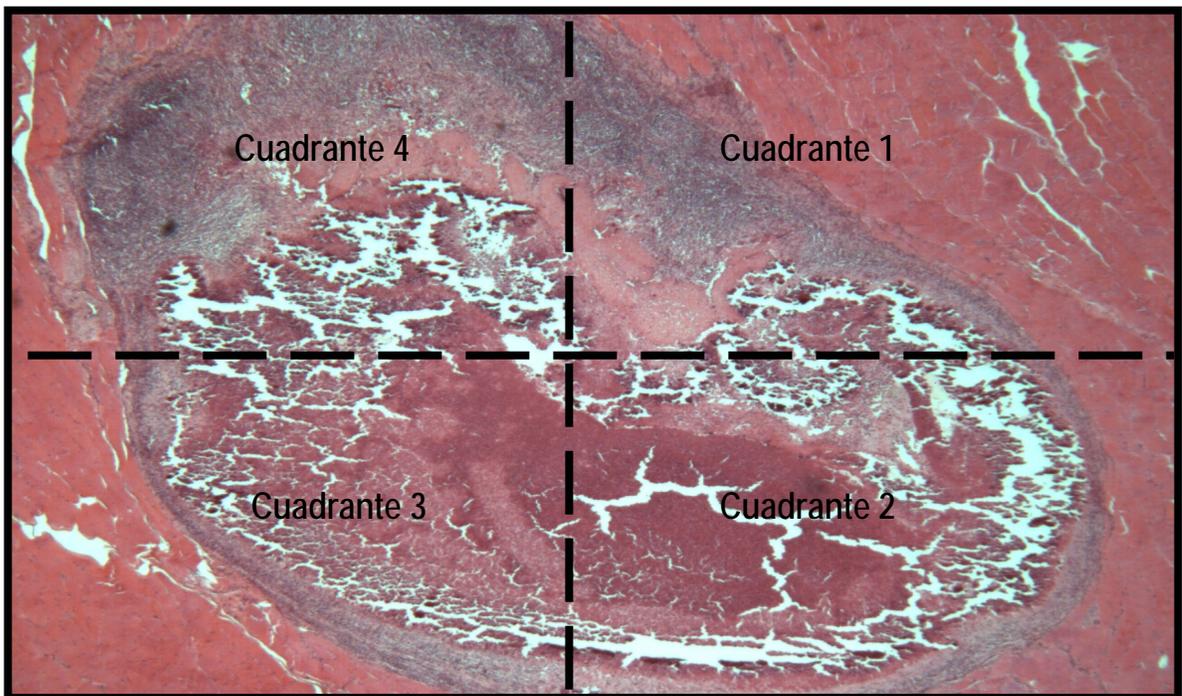


Figura 2.- División en cuatro cuadrantes del infiltrado inflamatorio grado 4-5 que rodea al metacestodo de *T. solium*, H&E, 10x.

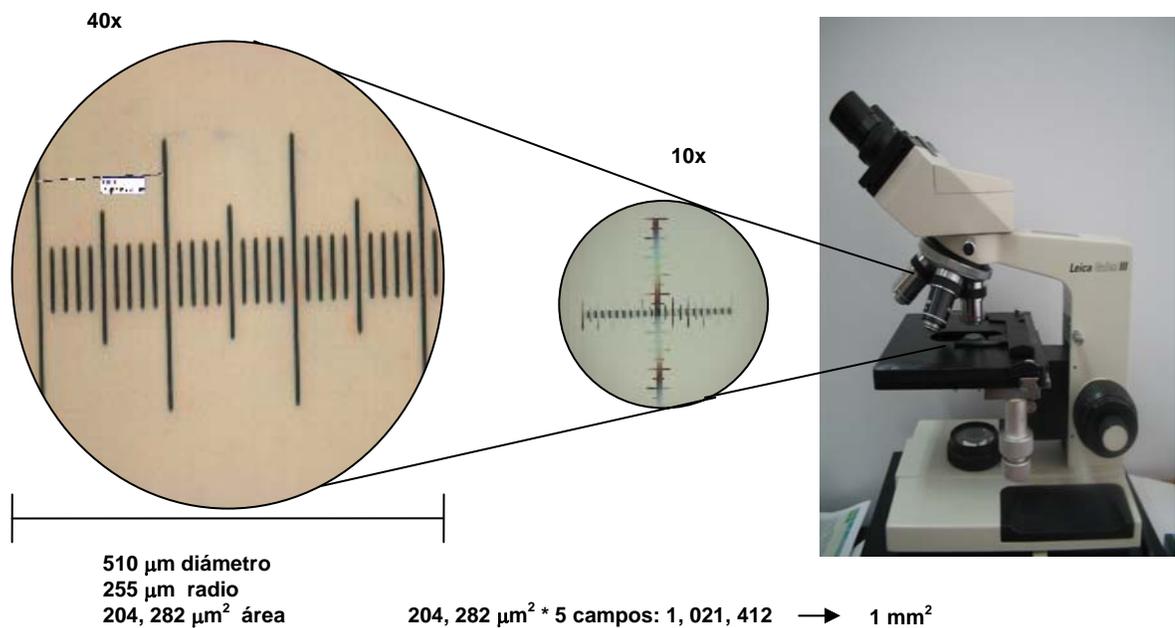


Figura 3.- Cálculo del área del objetivo de 40x y del número de campos necesarios para obtener el número de células por mm². Las imágenes son únicamente para ilustrar el ejemplo, no corresponden a las medidas reales.

2.5.-Análisis estadístico.

Del conteo total se obtuvo la sumatoria de células inmunopositivas por cada anticuerpo y para cada zona muscular, en animales controles y vacunados, y se evaluó por medio del análisis de varianza univariado del programa estadístico SPSS 10, para detectar el efecto del tratamiento (vacunados y controles), el de cada zona muscular y de cada anticuerpo sobre la cantidad final de células inmunopositivas. Se aplicó la prueba de Tukey del mismo programa estadístico, para detectar qué variable presentaba diferencias significativas, en caso de existir algún efecto sobre el conteo final de células inmunopositivas. El nivel de significancia utilizado fue de $P < 0.05$.

III.- RESULTADOS

El mejor método de reactivación antigénica fue por medio de calor y amortiguador de citratos en cortes de nódulos linfáticos (testigos positivos) de animales clínicamente sanos, para los anticuerpos anti-CD4⁺, anti-CD8⁺, anti-IL-4 y anti-IL-6, mientras que para el anticuerpo anti-IFN- γ el mejor método de reactivación fue con tripsina. Sin embargo, para el caso de los marcadores de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, no fue posible detectarlos en las muestras de animales control ni en vacunados.

Los resultados del conteo de células inmunopositivas para los anticuerpos anti-IL-4, anti-IL-6 y anti-IFN- γ se muestran en los **cuadros 4-13**.

Cuadro 4.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IL-4 en espaldilla.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Espaldilla	271	222	40	20	553
2	Espaldilla	441	339	374	270	1424
3	Espaldilla	528	434	305	112	1379
4	Espaldilla	364	269	248	298	1179
5	Espaldilla	0	0	0	0	0
6	Espaldilla	341	347	79	27	794
7	Espaldilla	296	508	295	73	1172
8	Espaldilla	434	141	135	286	996
9	Espaldilla	221	215	133	288	857
10	Espaldilla	342	73	146	0	561

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 5.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IL-4 en masetero.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Masetero	269	75	128	350	822
2	Masetero	153	46	242	102	543
3	Masetero	0	0	0	0	0
4	Masetero	202	194	104	2	502
5	Masetero	221	145	133	146	645
6	Masetero	38	48	96	137	319
7	Masetero	268	246	239	214	967
8	Masetero	376	566	593	136	2571
9	Masetero	0	0	0	0	0
10	Masetero	0	0	0	0	0

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 6.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IL-4 en pierna.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Pierna	60	17	39	44	160
2	Pierna	232	210	326	144	912
3	Pierna	66	21	184	76	347
4	Pierna	203	165	269	63	700
5	Pierna	0	0	0	0	0
6	Pierna	8	7	57	4	76
7	Pierna	723	329	31	602	1685
8	Pierna	345	384	12	53	794
9	Pierna	197	447	372	58	1074
10	Pierna	351	88	50	103	592

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 7.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IFN- γ en espaldilla.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Espaldilla	96	80	2	20	198
2	Espaldilla	87	94	163	132	476
3	Espaldilla	3	31	47	58	139
4	Espaldilla	118	115	218	86	537
5	Espaldilla	1	0	0	0	1
6	Espaldilla	45	30	2	0	77
7	Espaldilla	19	20	44	48	131
8	Espaldilla	37	9	7	19	72
9	Espaldilla	472	256	130	388	1246
10	Espaldilla	1.6	3.6	2	1.2	8.4

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 8.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IFN- γ en masetero.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Masetero	34	18	14	15	81
2	Masetero	4	5	3	4	16
3	Masetero	0	0	0	0	0
4	Masetero	0	0	0	0	0
5	Masetero	3	7	10	4	24
6	Masetero	58	116	0	17	191
7	Masetero	2	5	1	0	8
8	Masetero	12	64	0	23	99
9	Masetero	0	0	0	0	0
10	Masetero	0	0	0	0	0

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 9.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IFN- γ en pierna.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Pierna	0	0	0	0	0
2	Pierna	387	317	198	161	1063
3	Pierna	11	5	8	22	46
4	Pierna	8	26	0	2	36
5	Pierna	0	0	0	0	0
6	Pierna	8	25	30	0	63
7	Pierna	15	7	5	28	55
8	Pierna	11	10	9	1	31
9	Pierna	119	215	129	15	478
10	Pierna	72	74	2	28	176

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 10.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IL-6 en espaldilla.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Espaldilla	747	347	143	156	1393
2	Espaldilla	334	514	514	558	1921
3	Espaldilla	307	246	139	394	1086
4	Espaldilla	28	324	134	21	507
5	Espaldilla	7	87	46	0	140
6	Espaldilla	93	39	96	176	404
7	Espaldilla	756	818	530	245	2349
8	Espaldilla	364	180	1	137	682
9	Espaldilla	246	219	261	256	982
10	Espaldilla	353	443	353	361	1510

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 11.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IL-6 en masetero.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Masetero	134	177	200	13	524
2	Masetero	204	163	192	489	1048
3	Masetero	0	0	0	0	0
4	Masetero	287	217	163	12	679
5	Masetero	546	765	829	695	2835
6	Masetero	54	156	90	27	327
7	Masetero	428	497	619	911	2455
8	Masetero	230	926	410	418	1984
9	Masetero	436	351	34	0	821
10	Masetero	0	0	0	0	0

C: Control, V: Vacunado

Cuadro 12.- Número de células/mm² inmunopositivas a anti-IL-6 en pierna.

Animales	Músculo	Cuadrante 1 No. cels/mm ²	Cuadrante 2 No. cels/mm ²	Cuadrante 3 No. cels/mm ²	Cuadrante 4 No. cels/mm ²	Conteo total
1	Pierna	59	15	29	444	547
2	Pierna	296	327	284	142	1049
3	Pierna	723	507	458	774	2462
4	Pierna	60	595	210	33	898
5	Pierna	0	0	0	0	0
6	Pierna	346	185	467	169	1167
7	Pierna	53	44	55	401	553
8	Pierna	633	576	150	923	2282
9	Pierna	290	350	19	48	707
10	Pierna	49	565	729	83	1426

C: Control, V: Vacunado

Las células inmunopositivas a anti-IL-4 morfológicamente correspondían a linfocitos, también se observaron eosinófilos inmunopositivos. Los linfocitos IL-4 positivos se distribuyeron de forma difusa y generalmente se ubicaron detrás de la línea de eosinófilos y macrófagos y alejados del tegumento parasitario. En algunos casos, estos linfocitos se encontraban en la periferia de los folículos linfoides organizados en los extremos del infiltrado inflamatorio e incluso dentro de estos.

En el caso del IFN- γ , las células inmunopositivas correspondían morfológicamente a linfocitos y algunos macrófagos. La distribución de las células positivas a anti-IFN- γ fue de forma multifocal coalescente y se ubicaron tanto en la capa de eosinófilos como detrás de esta y entremezcladas con los macrófagos, no se observaron en los folículos linfoides.

Las células inmunopositivas a anti-IL-6 correspondían morfológicamente a linfocitos, algunos macrófagos y escasos eosinófilos. La distribución fue heterogénea y difusa, pero con mayor infiltración en la capa de macrófagos y eosinófilos. También se observaron células inmunopositivas en la periferia y dentro de los folículos linfoides. La distribución de las células inmunopositivas para cada anticuerpo fue la misma en animales controles y vacunados (**Figuras 6-11**) .

Mediante la prueba de análisis de varianza mencionada, se comprobó que no existe ningún efecto del tratamiento y de las zonas musculares sobre el número de células inmunopositivas. En el caso de los anticuerpos, si se observa efecto entre los diferentes anticuerpos y el número de las células inmunopositivas. Los datos se muestran en el **cuadro 13**.

Cuadro 13.- Efecto del tratamiento, zonas musculares y anticuerpos sobre el número final de células inmunopositivas, análisis de varianza, SPSS 10.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Significancia
Tratamiento	382906.624	1	382906.624	0.309
Zonas musculares	482663.164	2	241331.582	0.519
Anticuerpos	12744538.777	2	6372269.388	0.000
Error	30682997.247	84	365273.777	
Total	83780624.560	90		

Variable dependiente: Conteo final de células inmunopositivas.

*Se considera significativo un nivel de 0.05 o menor.

Mediante la prueba de Tukey se observaron diferencias significativas en el conteo de células inmunopositivas para los anticuerpos anti-IL-4 y anti-IFN- γ en ambos grupos, vacunados y controles, con un nivel de significancia de 0.05 (**Cuadro 14**). De igual manera el anticuerpo anti-IL-6 presentó diferencias significativas en relación al anti-IFN- γ . No hubo diferencias entre los anticuerpos anti-IL-4 y anti-IL-6 (**Figura 4**).

Cuadro 14.- Efecto de los diferentes anticuerpos sobre el conteo final de células inmunopositivas. Prueba de Tukey.

Anticuerpos	Media (a)	Media (b)
IFN- γ	175.08	
IL-4		720.80
IL-6		1091.27
Significancia	1.000	0.051

*Se considera significativo un nivel de 0.05 o menor.

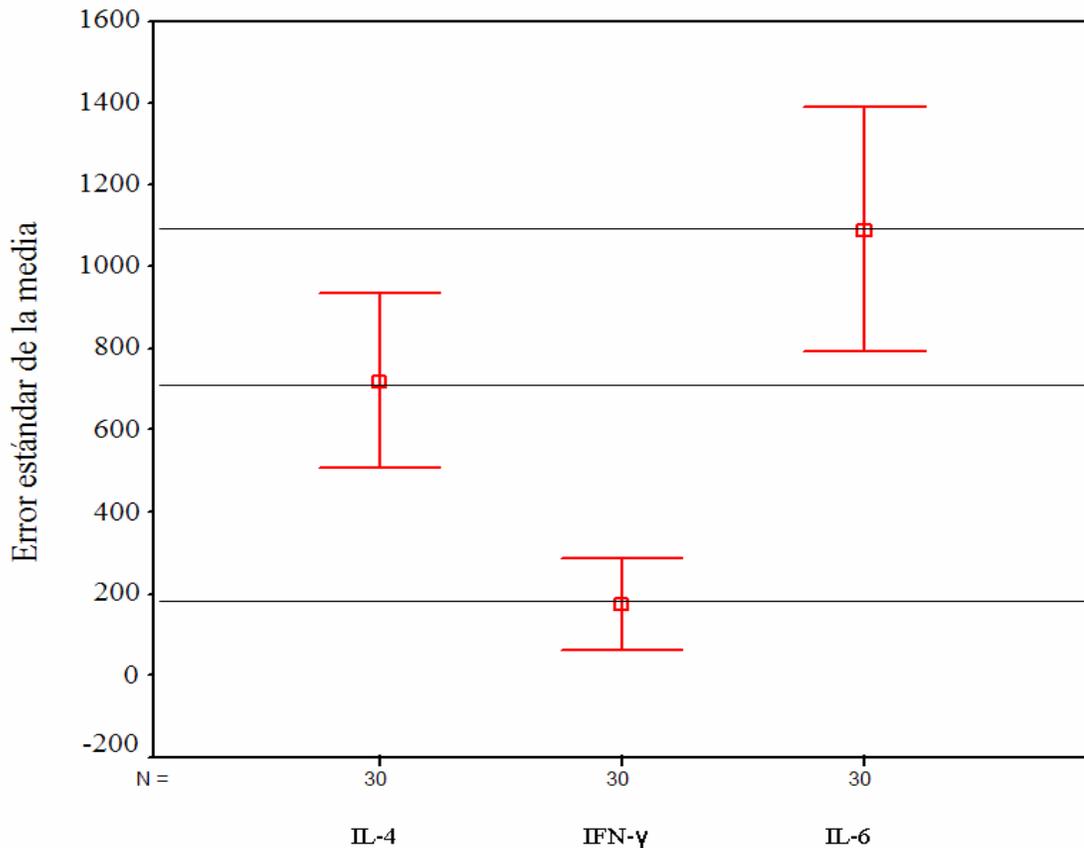


Figura 4.- Distribución y error estándar de la media del número de células inmunopositivas para IL-4, IFN- γ e IL-6, $P < 0.05$.

En los animales controles se observó que el 33.3% de las muestras (5 de 15) presentaron grado 1-2 de inflamación (según clasificación de Aluja y Vargas, 1988), donde se observó infiltrado inflamatorio de discreto a moderado de linfocitos, macrófagos y eosinófilos. El 60% de las muestras (9 de 15) presentaron grado 3 de inflamación, con abundantes eosinófilos, linfocitos, macrófagos, moderada cantidad de células plasmáticas y fibroblastos (**Cuadro 15**). Solamente una muestra (6.6 %) presentó grado 4 de inflamación donde había infiltrado inflamatorio abundante, compuesto por linfocitos, eosinófilos, macrófagos, células plasmáticas, zonas de necrosis multifocal, deterioro del tegumento y de otras estructuras internas del parásito, con depósito de detritos celulares y material basofílico compatible con calcio. También había folículos linfoides multifocales.

En animales vacunados el 33.3% de las muestras (5 de 15) tenían grado 1 de inflamación, el 33.3% de las muestras (5 de 15) tenían grado 3 de inflamación y el 33.3% restante (5 de 15) tenían grado 4-5 de inflamación (**Cuadro 16**). En los animales con grado de inflamación 3, 4 y 5 se observó mayor cantidad de eosinófilos, macrófagos y células plasmáticas, áreas de necrosis localmente extensiva, depósitos de detritos celulares y calcio, así como mayor cantidad de folículos linfoides distribuidos en la periferia. También había metacestodos que presentaban evidencia de destrucción parcial o difusa de sus estructuras externas e internas.

Cuadro 15.- Grados de inflamación por zona muscular en los animales controles.

Animales	Tratamiento	Zona muscular	Grado de inflamación
C1	Control	Espaldilla	3
C2	Control	Espaldilla	3
C3	Control	Espaldilla	3
C4	Control	Espaldilla	3
C5	Control	Espaldilla	2
C1	Control	Masetero	2
C2	Control	Masetero	3
C3	Control	Masetero	1
C4	Control	Masetero	2
C5	Control	Masetero	3
C1	Control	Pierna	3
C2	Control	Pierna	3
C3	Control	Pierna	4
C4	Control	Pierna	3
C5	Control	Pierna	1

Cuadro 16.- Grados de inflamación por zona muscular en los animales vacunados.

Animales	Tratamiento	Zona muscular	Grado de inflamación
C1	Vacunado	Espaldilla	2
C2	Vacunado	Espaldilla	3
C3	Vacunado	Espaldilla	2
C4	Vacunado	Espaldilla	5
C5	Vacunado	Espaldilla	3
C1	Vacunado	Masetero	3
C2	Vacunado	Masetero	3
C3	Vacunado	Masetero	4
C4	Vacunado	Masetero	4
C5	Vacunado	Masetero	1
C1	Vacunado	Pierna	2
C2	Vacunado	Pierna	4
C3	Vacunado	Pierna	2
C4	Vacunado	Pierna	3
C5	Vacunado	Pierna	5

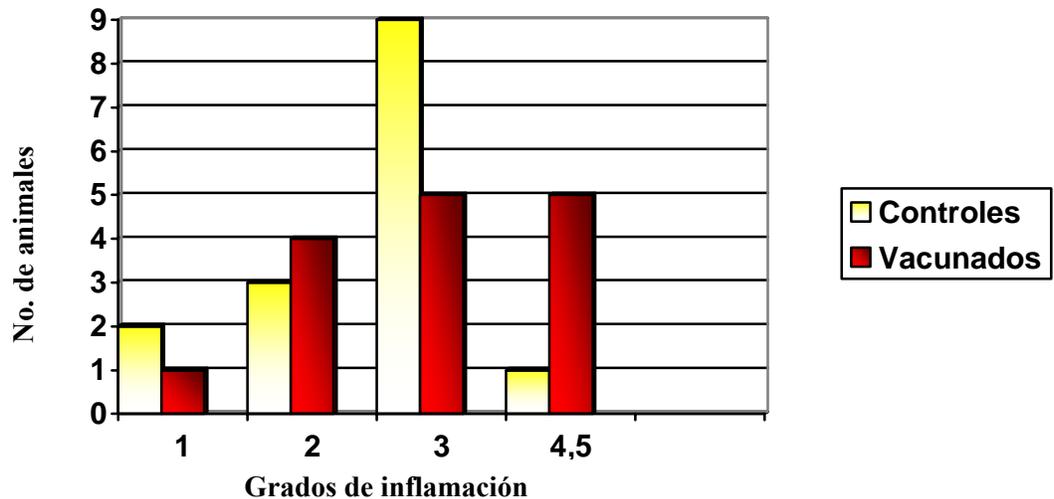


Figura 5.- Distribución de los grados de inflamación en las muestras de animales controles y vacunados.

Se observó correlación significativa entre los grados de inflamación de los animales controles y el número de células inmunopositivas a IL-4 ($P < 0.06$) e IL-6 ($P < 0.002$). En los animales vacunados hubo correlación significativa entre los grados de inflamación y el número de células inmunopositivas a IFN- γ ($P < 0.06$).

IV.- DISCUSIÓN

La respuesta inmune en infecciones por helmintos se caracteriza por cantidades abundantes de eosinófilos y concentraciones elevadas de IgE. El perfil de citocinas Th1/Th2 expresado por las células CD4⁺ también ha sido descrito ampliamente, principalmente en el modelo murino en infecciones por *Schistosoma mansoni*, *Trichuris muris*, *Brugia malayi*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *T. crassiceps*. En la mayoría de los casos, el perfil de citocinas asociado a la protección o resistencia a la infección es de tipo Th2, con producción de IL-4, IL-5 y anticuerpos de la clase IgE, principalmente. Sin embargo, en la cisticercosis murina por *T. crassiceps* se ha informado de una respuesta inmune tipo Th1, con expresión de IFN- γ , IL-2, IL-18, NO y presencia de macrófagos (Else *et al.* 1994; Finkelman *et al.* 1994; Pearlman *et al.* 1993; Robinson *et al.* 1997; Terrazas *et al.* 1998; Toenjes *et al.* 1999; Rodríguez-Sosa *et al.* 2003, Toenjes *et al.* 2003).

En el caso de la cisticercosis por *T. solium* en humanos, la respuesta inmune es de tipo Th1/Th2, en donde existe un balance entre las dos subpoblaciones de linfocitos con el objetivo de limitar el daño al tejido del hospedador, ya que se presentan fases de infección con expresión de citocinas de tipo Th1 y cuadros sintomáticos, y expresión de citocinas tipo Th2 en pacientes asintomáticos (Restrepo *et al.* 2001; Chavarría *et al.* 2003). En la cisticercosis porcina la respuesta inmune presenta características parecidas a las del humano y del ratón; sin embargo, es necesario hacer un análisis cuidadoso antes de extrapolar los resultados de estudios del modelo murino y de humanos hacia los cerdos.

En el presente estudio se evaluó el perfil de citocinas de la respuesta inmune en músculos con metacestodos de *T. solium*, de cerdos infectados experimentalmente con huevos de este parásito. También se evaluó el efecto de la vacuna S3Pvac sobre el perfil de citocinas de la respuesta inmune.

Se observó que no habían diferencias significativas en el número de células inmunopositivas para IL-4, IL-6 e IFN- γ , entre animales controles y vacunados, tampoco había diferencia con respecto a la zona muscular. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas entre el número de células que expresan IL-4 (721 células/mm²) e IFN- γ (175 células/mm²), tanto en animales vacunados como controles. La IL-6 (1091 células/mm²) también difería significativamente del IFN- γ , pero no de la IL-4. Esto indica que la respuesta inmune se inclina hacia el tipo Th2, en animales vacunados y controles, pero se demuestra que la vacuna no tiene efecto sobre el número de células inmunopositivas a estas citocinas.

En el caso de los animales controles el 60% de las muestras analizadas presentaban infiltrado inflamatorio moderado grado 3 (Aluja y Vargas, 1988). Este tipo de infiltrado inflamatorio alrededor de los metacestodos, ha sido descrito en cerdos infectados naturalmente (de Aluja y Vargas, 1988; Londoño *et al.* 2002, Álvarez *et al.* 2002), teniendo las mismas poblaciones celulares, incluso observando mayor aumento de eosinófilos conforme el grado de inflamación aumenta, así como una mayor destrucción del parásito. Este aumento se observa comúnmente en granulomas en la cisticercosis porcina, sin embargo, no suele compartir las mismas características celulares con la neurocisticercosis humana, en donde se ha descrito menor número de eosinófilos conforme el grado de inflamación aumenta, y un incremento de células plasmáticas (Álvarez *et al.*, 2002). Es posible que el aumento en la población de eosinófilos observada en el presente trabajo, tenga como objetivo el recubrimiento completo del metacestodo por parte de estas células y una destrucción más rápida del parásito, organizada por los linfocitos Th2. Las células que expresan IL-4 en animales controles y vacunados morfológicamente correspondían a linfocitos y algunos eosinófilos. Estas células son consideradas la principal fuente de IL-4 (Abbas and Lichtman, 2004), aunque en otros modelos experimentales, particularmente con *S. mansoni*, se ha observado que los eosinófilos son la principal fuente de esta citocina (Rumbley *et al.*, 1999). La distribución que presentaron también se ha observado en otros estudios de cisticercosis porcina natural (Londoño *et al.*, 2002; Pérez-Torres *et al.*, 2002).

La organización de folículos linfoides puede explicarse por la expresión de estas citocinas de tipo Th2 como IL-4 e IL-6 que actúan como factores de crecimiento para las células B (Romagnani, 1996; Romagnani, 1997; Kidd, 2003; Abbas and Lichtman, 2004). Las células B también pueden producir IL-4, lo que podría explicar la presencia de células inmunopositivas a anti-IL-4 en folículos linfoides (Mosmann y Sad, 1996).

Las células inmunopositivas a anti-IL-6 en animales controles y vacunados morfológicamente correspondían a linfocitos, algunos macrófagos y escasos eosinófilos. Las principales células productoras de IL-6 son los linfocitos T, macrófagos y en algunos informes los eosinófilos son considerados como productores principales de citocinas tipo Th2, particularmente en algunas infecciones por helmintos (Rumbley *et al.*, 1999; Abbas and Lichtman, 2004; Raymond and Wilkie, 2004). La distribución de las células positivas fue difusa, con mayor infiltración en la capa de macrófagos y eosinófilos, así como en la periferia y dentro de los folículos linfoides, en donde la IL-6 podría estar estimulando la organización de estos folículos, así como la proliferación de células productoras de anticuerpos. Se ha propuesto que la IL-6 puede inducir la polarización de linfocitos T a células tipo Th2, estimulando la producción de IL-4 (Romagnani, 1997, Raymond and Wilkie, 2004).

Las células inmunopositivas para anti-IFN- γ en animales controles y vacunados correspondieron a linfocitos y algunos macrófagos. La distribución de las células IFN- γ positivas fue multifocal coalescente, ubicadas en la capa de eosinófilos ó detrás de esta, y entremezcladas con los macrófagos, sin presentarse en folículos linfoides, lo que parece indicar que la producción de IFN- γ está asociada a los linfocitos Th1, que podrían estar regulando la actividad de los macrófagos; sin embargo, la actividad del IFN- γ puede estar parcialmente inhibida por la acción de citocinas tipo Th2, como IL-4 e IL-6, ya que estas citocinas ejercen una acción antagonista a los efectos del IFN- γ (Romagnani, 1996; Allen and Maizels, 1997; Abbas and Lichtman, 2004).

En los tejidos de los animales vacunados, se observó un aumento en el grado de inflamación, lo que probablemente se deba a un efecto promotor de la vacuna S3Pvac sobre la respuesta inmune, como se ha descrito anteriormente por Huerta *et al.* (2000), lo que favorece el incremento de la reacción inflamatoria y la destrucción del metacestodo. Aunque en el presente trabajo no hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de células inmunopositivas para IL-4, IL-6 e IFN- γ entre animales controles y vacunados, debe considerarse el efecto que la vacuna tiene sobre el perfil de citocinas, presentando diferencias numéricas entre animales vacunados y controles, y correlación significativa entre los grados de inflamación y el número de células inmunopositivas a IL-4, IL-6 en controles, y el número de células inmunopositivas a IFN- γ en vacunados. También debe tomarse en cuenta el incremento de la inflamación en animales vacunados debido a los cambios que las citocinas a su vez ejercen sobre diferentes tipos celulares. Por ejemplo, la proliferación de linfocitos T, la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas, productora de IgE, la proliferación de eosinófilos promovida por IL-4, IL-6 y particularmente por IL-5 que si bien no fue evaluada en este trabajo, no se descarta su participación en la respuesta inmune, ya que está considerada dentro del perfil de citocinas tipo Th2 (Mossman y Sad, 1996; Evans *et al.*, 1998; Kidd, 2003; Chavarria *et al.*, 2003). Debido a que existe asociación entre el número de células IFN- γ^+ y la inflamación en animales vacunados, es posible que esta citocina contribuya en la activación de los macrófagos, favoreciendo la destrucción rápida del metacestodo.

El perfil de citocinas presente en ambos grupos, controles y vacunados, se inclina hacia el tipo Th2, sin embargo, la presencia de IFN- γ puede clasificar la respuesta inmune observada como Th1/Th2, concordando con lo que ya se ha reportado, que la respuesta inmune frente a infecciones por helmintos es de tipo Th2, o bien una mezcla de ambos tipos (Mosmann y Sad, 1996; Romagnani, 1997; London *et al.* 1998; Meeusen, 1999; Rumbley *et al.*, 1999; Kidd, 2003; Abbas and Lichtman, 2004).

En la cisticercosis porcina y murina se han identificado las células presentes en el infiltrado inflamatorio que rodea a los parásitos así como las citocinas expresadas. En cerdos no se han caracterizado con precisión las citocinas producidas pero, la respuesta inmune se ha clasificado como tipo Th2 o Th1/Th2, por la presencia de IL-4 e IFN- γ (Toenjes *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2002; Londoño *et al.*, 2002). De manera similar, en tejidos de ratones, los antígenos del metacestodo de *T. solium* inducen una respuesta inmune Th1/Th2 (Cortes *et al.*, 2003).

De acuerdo a lo expuesto, la respuesta inmune del cerdo frente a este parásito está definida como una mezcla de ambos tipos de subpoblaciones Th1/Th2. Aunque algunos investigadores (Caballero, 1998) consideran necesario evitar la forma categórica en que se pretende clasificar la respuesta inmune y encasillarla en sólo dos opciones. Las subpoblaciones de linfocitos Th han sido clasificadas de acuerdo a los experimentos realizados en el modelo murino, pero debe tenerse mucho cuidado al intentar traspolar estos resultados a otros modelos experimentales, en particular el cerdo.

En contraste a lo anterior, estudios recientes en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*, han demostrado que la respuesta inmune es principalmente de tipo Th1. Al bloquear la acción de la IL-10 con anticuerpos se observaron menores cantidades de parásitos y los ratones desarrollaron una respuesta tipo Th1. Al aplicar anticuerpos anti-IFN- γ se incrementó la susceptibilidad a la infección y aumentó la carga de parásitos. Se han utilizado proteínas de IFN- γ e IL-2 recombinantes y han disminuido la carga parasitaria, mientras que la IL-10 recombinante aumenta el número de parásitos (Terrazas *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que en las fases iniciales de la formación de los granulomas por *T. crassiceps*, el perfil de citocinas predominante es de tipo Th1, mientras que en las fases tardías, cuando se observa mayor destrucción del parásito, el tipo de respuesta es Th1/Th2 (Robinson *et al.* 1997). Esto sugiere que existe una colaboración entre ambas subpoblaciones de linfocitos Th para destruir al parásito, tal como cita Cortes *et al.* (2003), que describe una respuesta Th1/Th2 en ratones desafiados con antígenos de *T. solium*.

Toenjes y Kuhn (2003), han identificado mayor presencia de IFN- γ en células de exudado peritoneal, esplenocitos y en células de nódulos linfáticos mesentéricos, durante la primera semana de la infección por *T. crassiceps* en ratones, que rápidamente es seguida por un incremento en la producción de IL-10 y una subsecuente reducción en IFN- γ . Por otro lado, al utilizar ratones BALB/c STAT6^{-/-} se estudió el papel de este factor de transcripción en la inducción de la respuesta Th2, observando una mayor producción de IgG2a, IL-12, IFN- γ , así como NO. En tanto que los ratones BALB/c silvestres produjeron niveles altos de IgG1, IgE, IL-4 e IL-13 y permanecieron susceptibles a la infección por *T. crassiceps* (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2001).

Se ha estudiado el papel de algunas moléculas co-estimuladoras en el desarrollo de la respuesta inmune en la cisticercosis murina. Los macrófagos que expresan CD40 pueden desempeñar un papel importante en la inducción de la respuesta tipo Th2, pero no pueden inducir el tipo Th1 en células CD4 (Rodríguez-Sosa *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos en experimentos con la vacuna S3Pvac tanto en ratones (Toledo *et al.*, 1999, 2001) como en cerdos infectados naturalmente (Díaz *et al.*, 2003), demuestran mayores niveles de citocinas Th1 (IFN- γ , IL-2) en sueros, y escasos niveles o incluso ausencia de citocinas tipo Th2 (IL-4 e IL-10). Se ha informado que la migración de linfocitos Th1 y Th2 a diferentes sitios, tales como nódulos linfáticos periféricos y mucosas, está asociada a las citocinas, adhesinas y ligandos presentes en cada microambiente y no al sitio donde fueron activadas las células T vírgenes. De tal manera que, factores como agentes infecciosos, fármacos, vacunas presentes en los distintos tejidos, pueden modular la respuesta inmune local y afectar el patrón de migración de los linfocitos (Meeusen, 1998). Se ha investigado la migración de linfocitos Th en borregos, y se ha observado mayor presencia de células Th1 en nódulos linfáticos poplíteos y preescapulares, en tanto que en nódulos linfáticos mesentéricos las células eran de tipo Th2. Ambos tipos celulares se estimularon policlonalmente y desde distintos sitios, comprobando que el sitio inicial de activación no determina la ubicación de los linfocitos Th, sino el microambiente donde se encuentren estas células (Premier y Meeusen, 1998).

Lo anterior parece indicar que una respuesta inmune sistémica no necesariamente es el reflejo de lo que ocurre a nivel local, particularmente en el caso de linfocitos Th1 y Th2, como observamos en el presente trabajo.

A pesar de lo que se ha descrito en la infecciones por helmintos, la respuesta inmune puede variar entre las diferentes especies, al menos en lo que se refiere al perfil de citocinas, por lo que debe analizarse tomando en cuenta diversos factores que influyen en el tipo de células inmunes involucradas.

La clasificación de linfocitos Th se hizo con base en los estudios de ratones (Mosmann *et al.*, 1986), por lo tanto es necesario ser cuidadosos al momento de comparar el perfil de citocinas de esta especie con el tipo de citocinas de los cerdos u otras especies. En los bovinos se ha visto que la mayoría de las clonas de células T específicas contra parásitos, coexpresan IFN- γ e IL-4 (Brown *et al.*, 1998). Se sabe que los cerdos presentan características únicas en las poblaciones de células del sistema inmune. Se han clasificado cuatro subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica; CD4⁻ CD8⁺, CD4⁻ CD8⁻ (estas células expresan receptores $\gamma\delta$), CD4⁺ CD8⁻ y CD4⁺ CD8⁺. El cerdo es la única especie, hasta ahora, en la que se ha demostrado una gran proporción de linfocitos CD4⁺ CD8⁺ en sangre periférica y en órganos extratímicos, que oscila entre 8-60% y se incrementa con la edad y el estado inmunológico del animal (Salmüller *et al.*, 1987; Salmüller *et al.*, 2002). Estos son datos importantes al momento de comparar la respuesta inmune entre el modelo murino y los cerdos.

Otros factores importantes que influyen en la respuesta inmune, son la dosis antigénica y la co-estimulación. En la mayoría de los casos, bajas dosis de antígenos inducen respuestas tipo Th1, mientras que dosis altas de antígeno inducen respuestas tipo Th2 (Bretscher *et al.*, 1992; Hosken *et al.*, 1995). En el caso de la co-estimulación, se ha visto que niveles elevados de CD80 ó CD86 puede inducir una respuesta inmune Th2, aunque no se han obtenido resultados contundentes (Kuchroo *et al.*, 1995).

Por otro lado, el propio parásito puede modular la respuesta inmune del hospedador mediante la secreción de diferentes moléculas, como la taeniaestatina, que es una proteasa serina de *T. solium* que inhibe la activación del complemento, regula la proliferación de linfocitos y bloquea la producción de citocinas. La paramiosina es otra proteína del parásito, que inhibe la función de la vía clásica del complemento (Laclette *et al.*, 1992; Landa *et al.*, 1993). Se han descrito polisacáridos sulfatados que activan el complemento lejos del parásito (Letonia y Hammerberg, 1983).

El bagaje genético de los animales, en este caso los cerdos, también puede influir en los tipos de respuesta inmune que se presenten (Toledo *et al.*, 1999, 2001), ya que los animales que se crían en las zonas rurales son resultado de cruces entre diferentes razas.

Tomando en consideración todo lo anterior, se observa en los resultados del presente estudio, un tipo de respuesta inmune que es principalmente de tipo Th2, aunque de acuerdo a lo que se ha expuesto, lo más correcto sería describir un perfil de citocinas predominantemente de tipo Th2 con menor expresión de citocinas tipo Th1, o bien, una respuesta inmune Th1/Th2. También hay que recalcar que la mayor parte de las muestras presentaban grados de inflamación 3, es decir, se encontraban en etapas tardías con infiltrado inflamatorio crónico, compatible con una respuesta inmune tipo Th2. Aunque los resultados indican que la vacuna S3Pvac no ayuda a inducir la respuesta tipo Th2, es posible que provoque la destrucción directa del metacestodo y esto, consecuentemente, promueva la polarización de la respuesta inmune por parte del hospedador, hacia el tipo Th2, acelerando la eliminación del parásito mediante la ayuda de mayor cantidad de linfocitos T que organicen la respuesta inmune alrededor del metacéstodo, mayor número de linfocitos B diferenciándose a células plasmáticas y produciendo más anticuerpos IgE, que finalmente ayudarán a una mejor adhesión de los eosinófilos al tegumento parasitario y a que estos puedan destruir rápida y efectivamente al metacestodo. Y la participación de las citocinas tipo Th1, como IFN- γ , puede favorecer una mayor activación de macrófagos y producción de enzimas, radicales libres y óxido nítrico que contribuyen a la destrucción del parásito.

No fue posible detectar células inmunopositivas a CD4⁺ y CD8⁺ en las muestras de animales control y vacunados, aunque la muestra testigo de nódulo linfático de cerdo sano resultó positiva. Se ha descrito que los cerdos tienen cuatro subpoblaciones de linfocitos T; CD4⁻ CD8⁺, CD4⁻ CD8⁻, CD4⁺ CD8⁻ y CD4⁺ CD8⁺. En el caso de las células dobles negativos, expresan receptores $\gamma\delta$ y se considera que constituyen un porcentaje importante de las subpoblaciones de linfocitos T (Saalmüller *et al.*, 2002). En el presente estudio la causa probable de que los resultados de la inmunohistoquímica para CD4⁺ y CD8⁺ fueran negativos, puede estar asociada a una mayor cantidad de células doble negativo en el infiltrado inflamatorio alrededor del metacestodo, superando la cantidad de los linfocitos CD4⁺ CD8⁻ que es el fenotipo clásico de las células Th.

V.- CONCLUSIONES.

- El perfil de citocinas en el infiltrado inflamatorio que rodea al metacestodo de *T. solium* en tejido muscular de cerdos infectados experimentalmente, es predominantemente de tipo Th2 (IL-4 e IL-6), en animales controles y en vacunados con S3Pvac.

- La vacuna S3Pvac no influye sobre el perfil de citocinas (IL-4, IFN- γ e IL-6) del infiltrado inflamatorio que rodea al metacestodo.

- Se observa un efecto de la vacuna S3Pvac sobre los grados de inflamación en los animales vacunados, de tal manera que se sugiere un efecto promotor sobre la destrucción del metacestodo.

- La técnica de inmunohistoquímica con el complejo ABC es aplicable para el estudio del perfil de citocinas (IL-4, IL6, IFN- γ) *in situ* en músculos de cerdos infectados con metacestodos de *T. solium*.

- Los métodos de recuperación antigénica con mayor eficacia para la detección de citocinas en músculos de cerdos son:

1.-Calor más amortiguador de citratos para IL-4 e IL-6.

2.- Enzimáticos con tripsina para IFN- γ .

VI.- LITERATURA CITADA.

- 1.- Abbas KA, Lichtman HA. Inmunología celular y molecular. Edit. Elsevier. Quinta edición, Madrid, España. 2004.
- 2.- Acevedo HA. Economic impact of porcine cysticercosis. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C. 1982.
- 3.- Allan JC, Avila G, García J, Mencos F, Liu D, Wang-Weng H, Zhou P, Stringer R, Rogan M, Zeyhle E. Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and teniasis in dog and humans. *Parasitol* 1992; 104: 347-355.
4. - Allen JE, Maizels RM. Immunology of human helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109:3-10.
- 5.- Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?. *Immunol Today* 1997; 18:387-392.
- 6.- Aluja AS, Vargas G. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 1988; 28: 65-77.
- 7.- Aluja AS, Flisser A, González D, Rodríguez-Carvajal J. Histological description of tomographic images of *Taenia solium* cysticerci in pig brains. *Clin Imaging* 1989; 13: 292 –298.
- 8.- Aluja AS. Frequency of porcine cysticercosis in México. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. (Eds), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York, 1982; 39-46.

9.- Aluja AS, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette J, Larralde C, Madrazo I, Velásquez K. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Instituto Nacional de Salud Pública. Fondo de Cultura Económica. México 1987; 13-14.

10.- Aluja AS, Núñez EJF, Villalobos N. Efecto de la irradiación gamma Co60 sobre el metacestodo de *Taenia solium*. Vet Mex 1993; 24: 297-301.

11.- Aluja SA, Villalobos N. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. Vet Mex 2000; 31 (3): 239-244.

12.- Alvarez JI, Londoño DP, Trujillo ALAJ, Jaramillo MM, Restrepo BI. Granuloma formation and parasite disintegration in porcine cisticercosis: comparison with human neurocysticercosis. J Comp Pathol 2002; 127:186-193.

13.- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. Parasitol Res 1998; 84: 117-122.

14.- Balic A, Bowles VM, Meeusen ENT. Immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. Adv Parasitol 1999.

15.- Boa ME, Kassuku AA, Willingham III, Keyyu JD, Phiri IK, Nansen P. Distribution and density of cysticerci of *Taenia solium* by muscle groups and organs in naturally infected local finished pigs in Tanzania. Vet Parasitol 2002; 106: 155-164.

16.- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes susceptible mice resistant to *Leishmania major*. Science 1992; 257: 539-542.

17.- Brown WC, Rice-Fitch AC, Estes MD. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 62 : 45-55.

18.- Caballero SML. Inmunología de la infección por helmintos. *Rev Esp Alergol Immunol Clin* 1998; 13 (6): 297-313.

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

20.- Cheng CT. *Parasitología General*. Editorial Delta A.C. España. 1978.

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

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

23.- Chavarría A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein, Larralde C, Sciutto E. Th2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microb and Infec* 2003; 5: 1109-1115.

24.- Del Bruto OH, Sotelo J, Roman GC. *Neurocysticercosis. A Clinical Handbook*. Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands. 1998.

25.- Díaz MA, Villalobos N, Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 81-90.

26.- Else KJ, Finkelman FD, Maliszewski CR, Grecis RK. *J Exp Med* 1994; 179: 347-351.

27.- Escobar A. The pathology of neurocysticercosis. In: Palacios E, Rodríguez - Carbajal J, Taveras JM. (Eds.), *Cisticercosis of the Central Nervous System*. Charles C. Thomas, Springfield, IL 1983; 27 –54.

28.- Evans C, García H, Hartnell A, Gilman R, José P, Martínez M. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun* 1998; 66: 4522-4525.

29.- Finkelman FD, Madden KB, Cheever AW. *J Exp Med* 1994; 179: 1563-1572.

30.- Flisser A, Plancarte A, Correa D. Diagnóstico: Tratamiento y mecanismos de evasión inmune de la cisticercosis por larvas de *Taenia solium* en seres humanos y cerdos. Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM 1991: 338-412.

31.- Flisser A, González D, Shkurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodríguez-Carvajal J. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. *Parasitol Res* 1990; 76: 263 –269.

32.- Flores PFI. Efecto de dosis bajas de irradiación gamma Co 60 sobre el metacestodo de *Taenia solium* (tesis de licenciatura). México, D.F. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM 1996.

33.- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernández M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998; 66: 760 – 764.

34.- Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernández M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, García E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* 49: 1996; 185 – 189.

35.- Heath D. *In vitro* culture of cysticerci: an aid to investigations of morphological development and host-parasite relationships. En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. (Edited by Flisser A, Willms K, Laclette J, Larralde C, Ridaura C, and Beltran, F.) Academic Press. New York, USA. 1982.

36.- Huerta M, Sciutto E, García G, Villalobos N, Hernández M, Fragoso G, Díaz J, Díaz A, Ramírez R, Luna S, García J, Aguilar E, Espinoza S, Castilla G, Bobadilla JR, José MV, Larralde C, Aluja AS. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: role of age, genetic background and antibody response. *Vet Parasitol* 2000; 90: 203-219.

37.- Huerta M, Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, Gevorkian G, Acero G, Díaz A, Álvarez I, Ávila R, Beltrán C, García G, Martínez JJ, Larralde C, Sciutto E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis: succesful vaccination in a controlled trial in rural Mexico. *Vet Parasitol* 2003; 20: 262-266.

38.- Hosken NA, Shibuya K, Heath AW, Murphy KM, O'Garra A. The effect of antigens dose on CD4⁺ helper T cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. J Exp Med 1995; 182: 1579-1584.

39.- Kidd P. Th1/Th2 Balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and diseases. Alt Med Rev 2003; 8 (3):223-246.

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

41.- Küchenmeister F. Die in und an dem Körper des lebenden Menschen vorkommenden Parasiten. Ein Lehr und Handbuch Verlag B.G. Teubner Leipzig 1855.

42.- Lacleste JP, Shoemaker BC, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1q. J Immunol 1992; 148 (1): 124-126.

43.- Landa A, Lacleste JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker, C.B. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitory activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). Mol Biochem Parasitol 1993; 60: 343-348.

44.- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia-Coyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. Las enfermedades infecciosas en la era de la aldea global. Salud Pública de México 1992: 34 (2).

45.- Larralde C. Inmunodiagnóstico de la cisticercosis: del laboratorio a la industria. Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. México DF Limusa 1992; 187.

46.- Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC. Sex hormones changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. J Steroid Biochem Mol Biol 1995; 52 (6): 575-580.

47.- Leuckart R. The parasites of man and the diseases wich proceed from them. A textbook for students and practitioners, translated by WE Hoyle. Yung J. Pentland Edinburgh 1879; 771.

48.- Lombardero OJ. Los nombres científicos de los parásitos y su significado. Edición Universitaria de Buenos Aires 1978: 51.

49.- Londoño PD, Álvarez JI, Trujillo J, Jaramillo JJ, Restrepo BI. The inflammatory cells infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. Vet Parasitol 2002; 109: 249-259.

50.- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. J Parasitol 1996; 82: 250-254.

51.- Medina-Escutia E, Morales Z, Proaño-Narvaez JV, Bermúdez V, Vázquez-Talavera J, Madrid V, Ortiz-Navarrete V, Laclette JP, Correa D. Th1/Th2 Cytokines in patients with active *Taenia solium* neurocysticercosis. First International Congress on Cytokines/Chemokines in Infectious Diseases 1999.

52.- Meeusen ENT. Differential migration of Th1 and Th2 cells- implications for vaccine and infections studies. *Vet Immunol Immunopathol* 1998;63: 157-166.

53.- Meeusen ENT. Immunology of helminth infections, with special reference to immunopathology. *Vet Parasitol* 1999; 84:259-273.

54.- Meeusen ENT, Balic A. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites?. *Parasitol Today* 2000; 16:95-101.

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

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

57.- Mosmann TR, Cherwinsky H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136: 2348-57.

58.- Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145.

59.- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996.

- 60.- Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995; 45: 127-137.
- 61.- Noble E, Noble GA, Shad GA, MacInness A. *Parasitology. The Biology of animal parasites*. 6ta. Ed. Lea and Febiger Philadelphia, London 1989; 574.
- 62.- O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immun* 1998; 8: 275-283.
- 63.- Pearlman E, Kroeze WK, Hazlett FE. *Exp Parasitol* 1993; 76: 200-208.
- 64.- Pérez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, Aluja SA. *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally-infected pigs. *Parasitol Res* 2002; 88: 150-152.
- 65.- Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowers MV. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 1999; 9: 643-664.
- 66.- Quiroz H. Cestodos. En Cordero del Campillo M y Rojo Vázquez FA. editores. *Parasitología Veterinaria*. España (Madrid), 1999.
- 67.- Rabiela MT, Rivas-Hernández A, Rodríguez-Ibarra J, Castillo-Medina S, Cancino F. Anatomopathological aspects of human brain cisticercosis. En: *Cisticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. (Edited by Flisser A, Willms K, Laclette J, Larralde C, Ridaura C, and Beltran F.). Academic Press. New York. 1982;179-200.
- 68.-Raymond RC, Wilkie BN. Th1/Th2 type cytokine profiles of pig T cells cultures with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells. *Vaccine* 2004; 22:1016-1023.

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

70.- Restrepo B, Alvarez J, Castaño J, Arias L, Restrepo M, Trujillo J, Colegial C, Teale J. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun* 2001; 69: 4554-4560.

71.- Robinson P, Atmar RL, Lewis DE, White C. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun* 1997; 65 (7):2925-2931.

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

73.- Rodríguez-Sosa M, Satoskar RA, David JR, Terrazas LI. Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol* 2003; 33: 703-711.

74.- Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996; 80 (3): 225-235.

75.- Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997; 18 (6):263-266.

76.- Rosenfeld EA, Byrd SE, Shulman ST. Neurocysticercosis among children in Chicago. *Clin Infect Dis* 1996; 23: 262-268.

77.- Rumbley CA, Sugaya H, Kekavat SA, El Refaei M, Perrin PJ, Phillips MS. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the *Schistosoma* granuloma. Am Assoc Immunol 1999; 1003-1009.

78.- Sallmüller A, Jonjic S, Bühring HJ, Reddehase MJ, Koszinowski UH. Monoclonal antibodies reactive with swine lymphocytes. Detection of an antigen on resting T cells down-regulated after activation. J Immunol 1987; 138:1852-1857.

79.- Sallmüller A, Werner T, Fachinger V. T-helper cells from naive to committed. Vet Immunol Immunopathol 2002; 87: 137-145.

80.- Santamaria E, Plancarte A, Aluja A. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: Immune response and efficiency of establishment. J Parasitol 2002; 88(1): 69-73.

81.- Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutiérrez OI, Aguilera J, Roberts J, Flisser A. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 49-52.

82.- Sciutto E, Aluja AS, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos ANM, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezensky T, Díaz S, Larralde C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: Factors related to effective protection. Vet Parasitol 1995; 60: 53-67.

83.- Sciutto E, Hernández M, García G, Aluja SA, Villalobos ANM, Rodarte LF, Parkhouse, Harrison L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological test for detection of circulating antibody and viable parasites. Vet Parasitol 1998; 78:185-194.

84.- Sompuran SR, Vania KMS, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol* 2004;121:190-199.

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

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

87.- Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE. Gamma-Delta-T cells do not play a major role in controlling infection in experimental cysticercosis. *Parasitol* 1999; 119: 413-418.

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

89.- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Kubli C, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent Th1 response. *Infect Immun* 1999; 69: 1766-1773.

90.- Toledo A, Fragoso G, Larralde C, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández B, Acero G, Huerta M, Sciutto E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent Th1 response. *Infect Immun* 2001; 69:1766-1773.

91.- Valdéz F, Hernández M, Govezensky T, Fragoso G, Sciutto E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. J Parasitol 1994; 80: 931-936.

92.- Vargas M, Saldierna V, Navarro FR, Acevedo HA, Flisser A, Aluja SA. Localización del cisticerco de la *Taenia solium* en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria. Vet Mex 1986;17: 275-279.

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

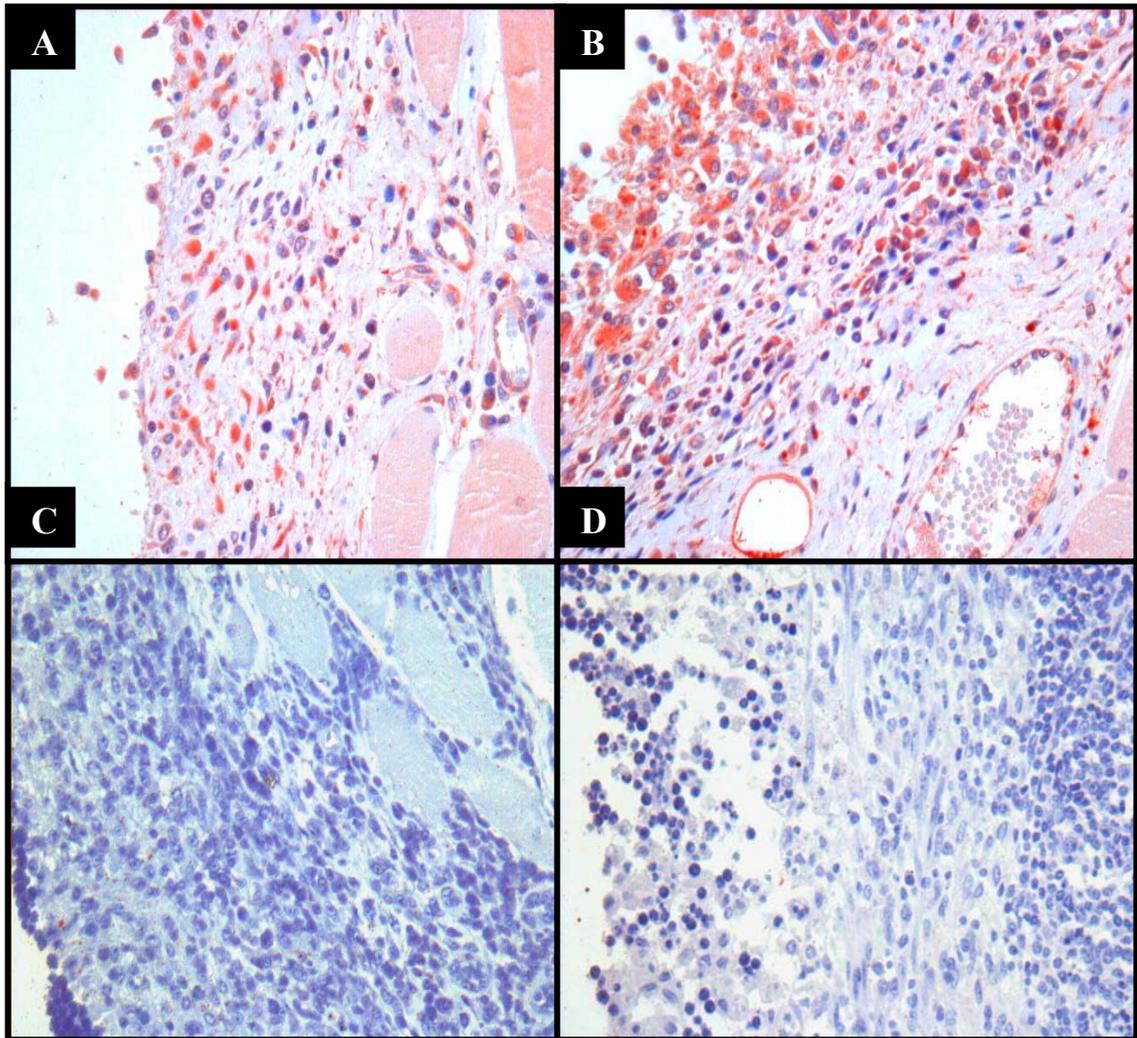


Figura 6.- Células inmunopositivas a anti-IL-4 (A) y anti-IL-6 (B) en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*. C y D corresponden a tejidos de muestras control sin anticuerpo primario, 40x, IHC.

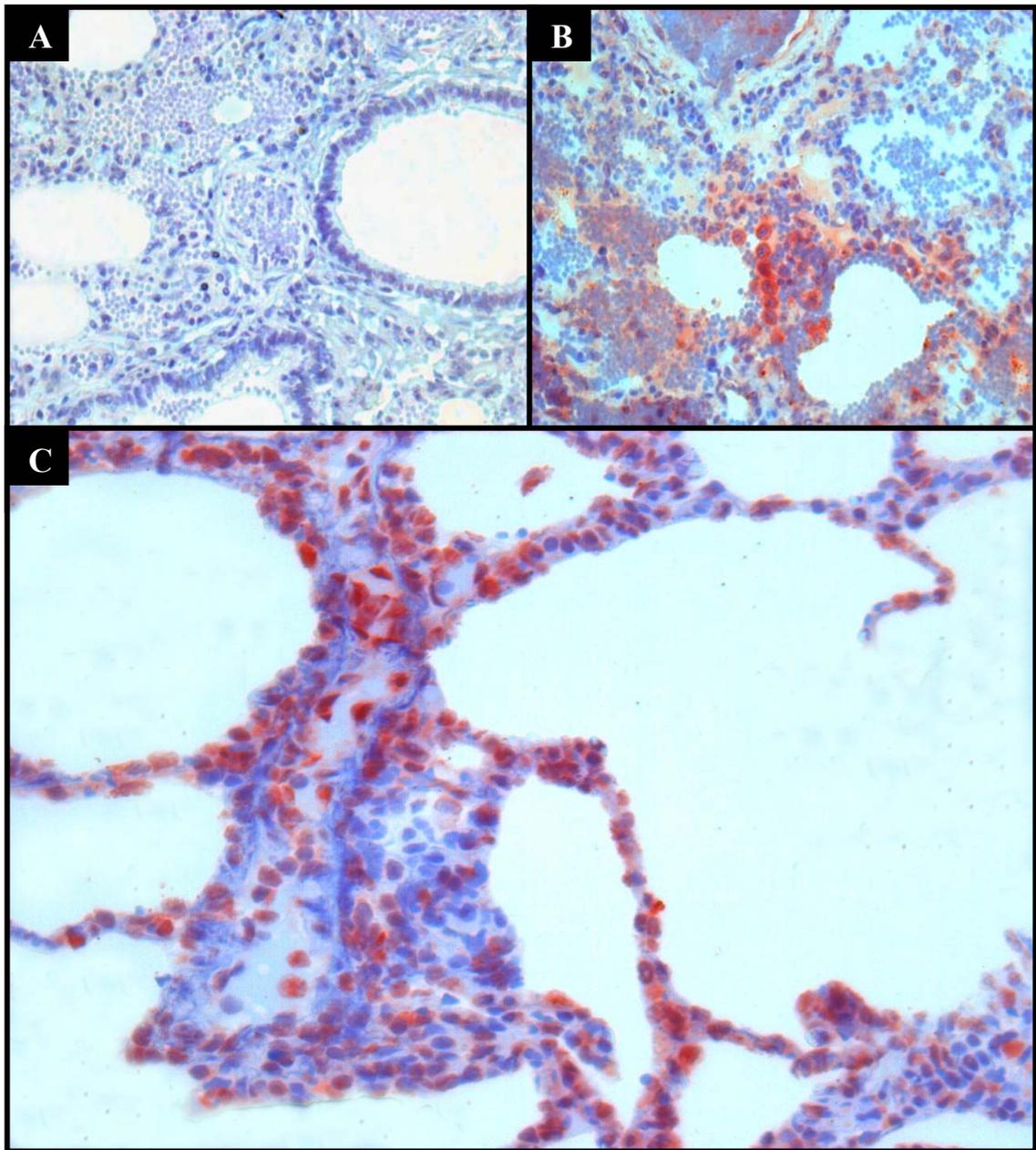


Figura 7.- Células inmunopositivas a anti-IFN- γ (B y C) en septos alveolares de pulmones de cerdos infectados con el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductor Porcino. Las muestras control no se les aplicó el anticuerpo primario (A), 40x, IHC.

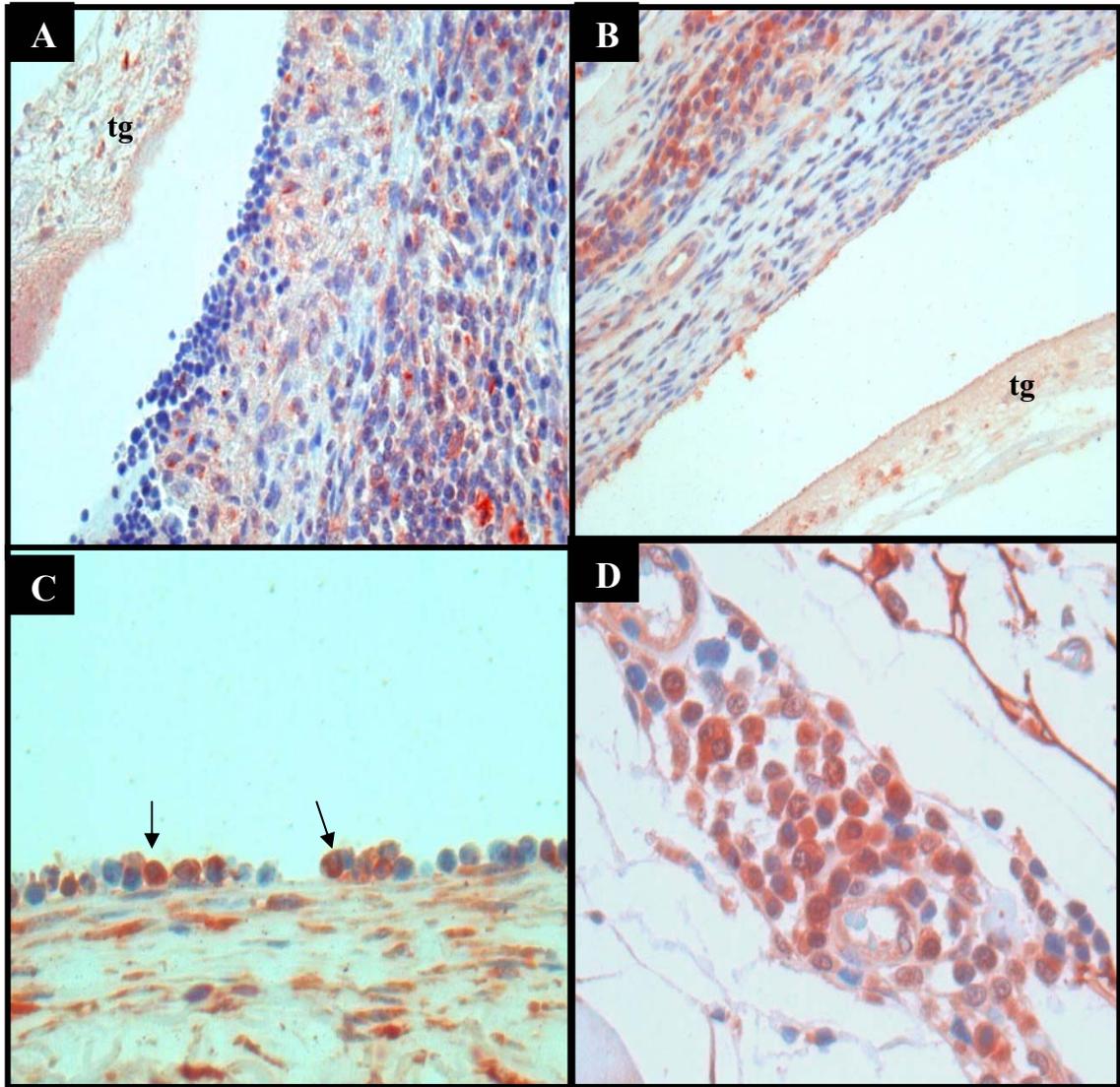


Figura 8.- Células inmunopositivas a anti-IL-4 en músculos de cerdos infectados con huevos de *T. solium*, vacunados con S3Pvac (A y C) y no vacunados (B y D). Las células positivas (flechas) se distribuyen formando una línea, entremezcladas con células no inmunopositivas (C). También se observan células inmunopositivas alrededor de vasos sanguíneos (Vs) (D), tegumento (tg), 40x, IHC.

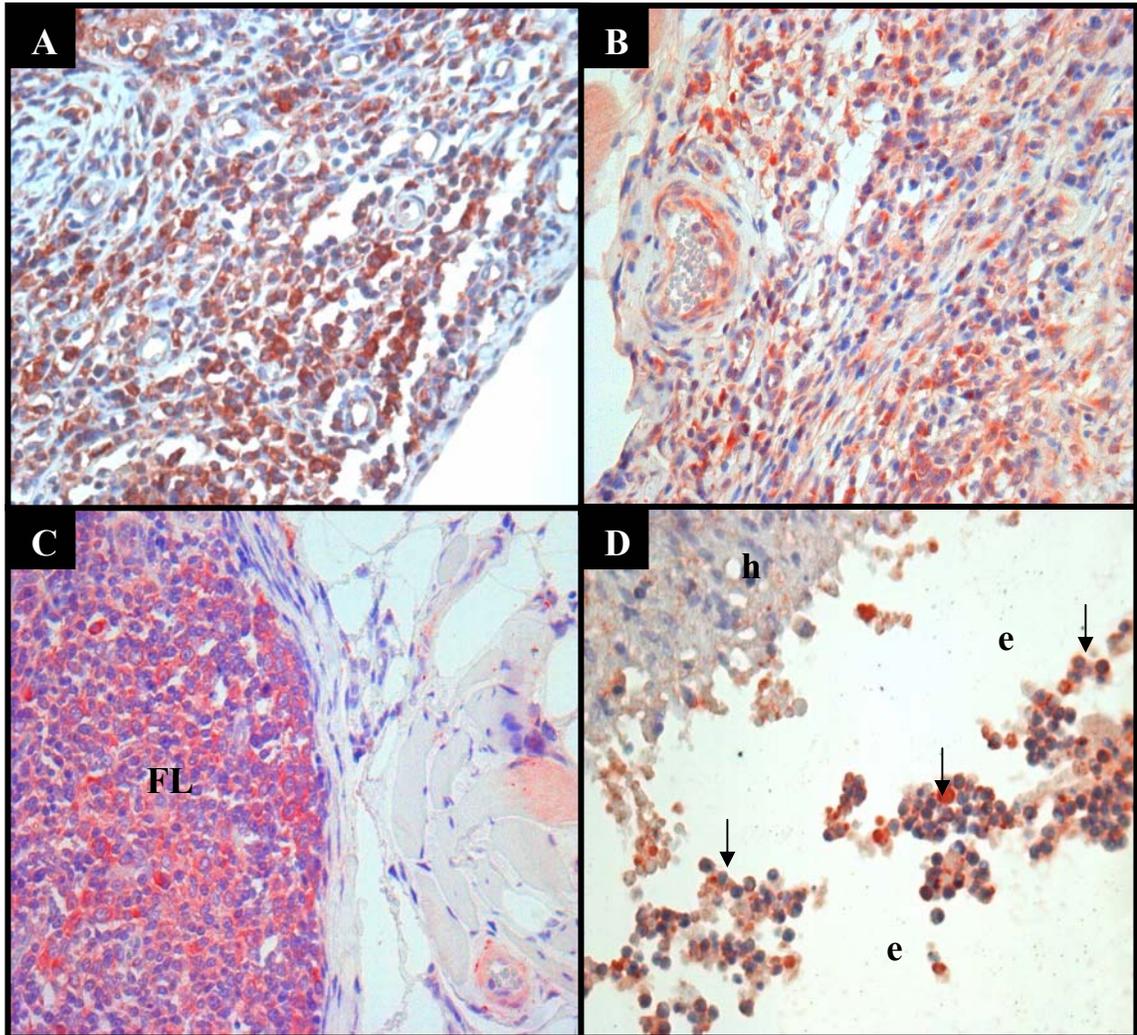


Figura 9.- Células que presentan inmunopositividad intensa a anti-IL-6 en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*, vacunados con S3Pvac (A,C,D) y no vacunados (B). Las células inmunopositivas se distribuyen en los folículos linfoides (FL) de forma difusa (C) y de forma multifocal (flechas) en el espacio (e) entre el hospedador (h) y el metacestodo (D), 40x, IHC.

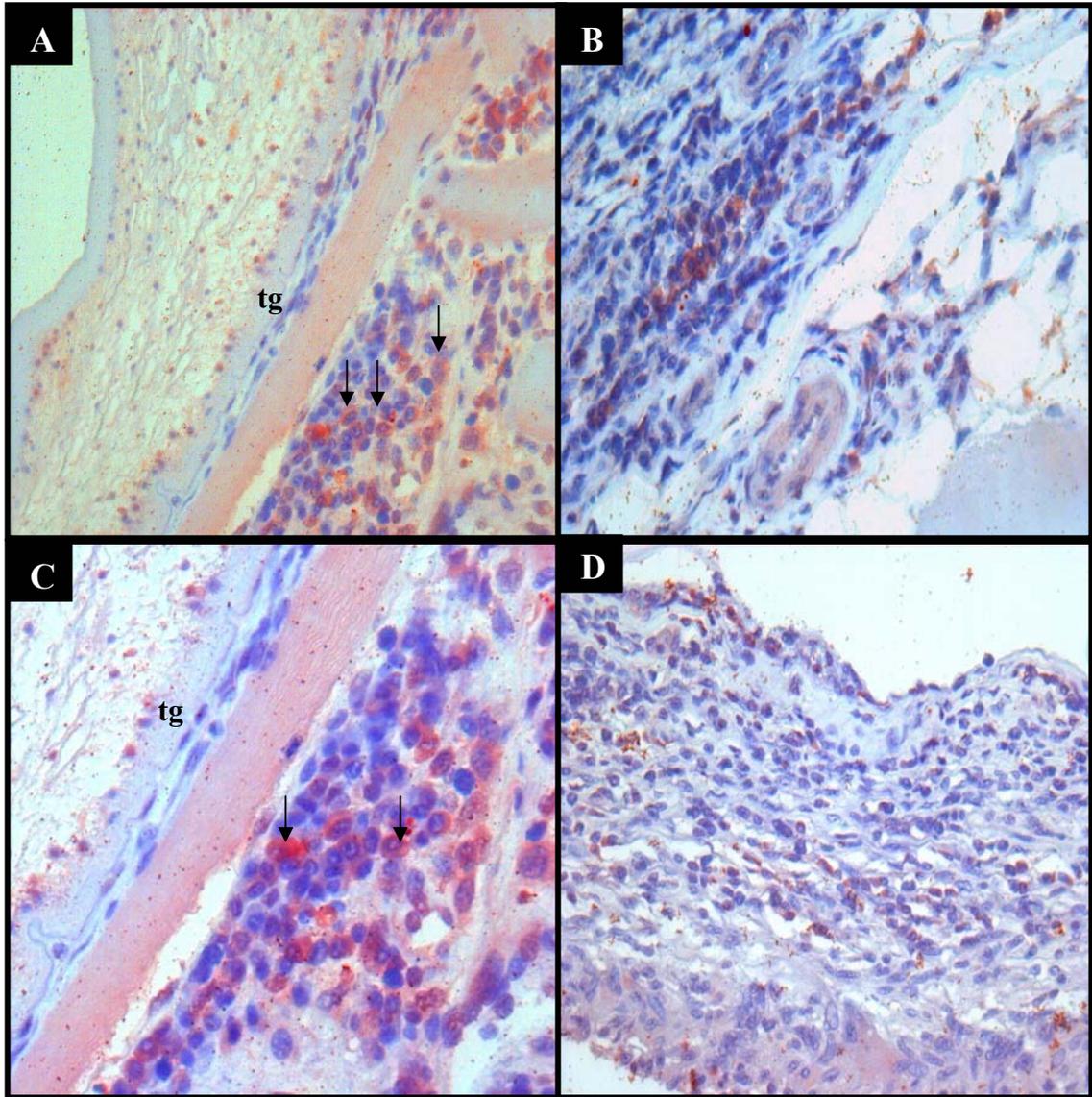


Figura 10.- Células inmunopositivas a anti-IFN- γ en músculos de cerdos infectados experimentalmente con huevos de *T. solium*, vacunados con S3Pvac (A y C) y no vacunados (B y D). Las células se distribuyen de forma multifocal (flechas) y detrás de la línea de encuentro con el tegumento (tg) del metacestodo (A y C), 40x, IHC.

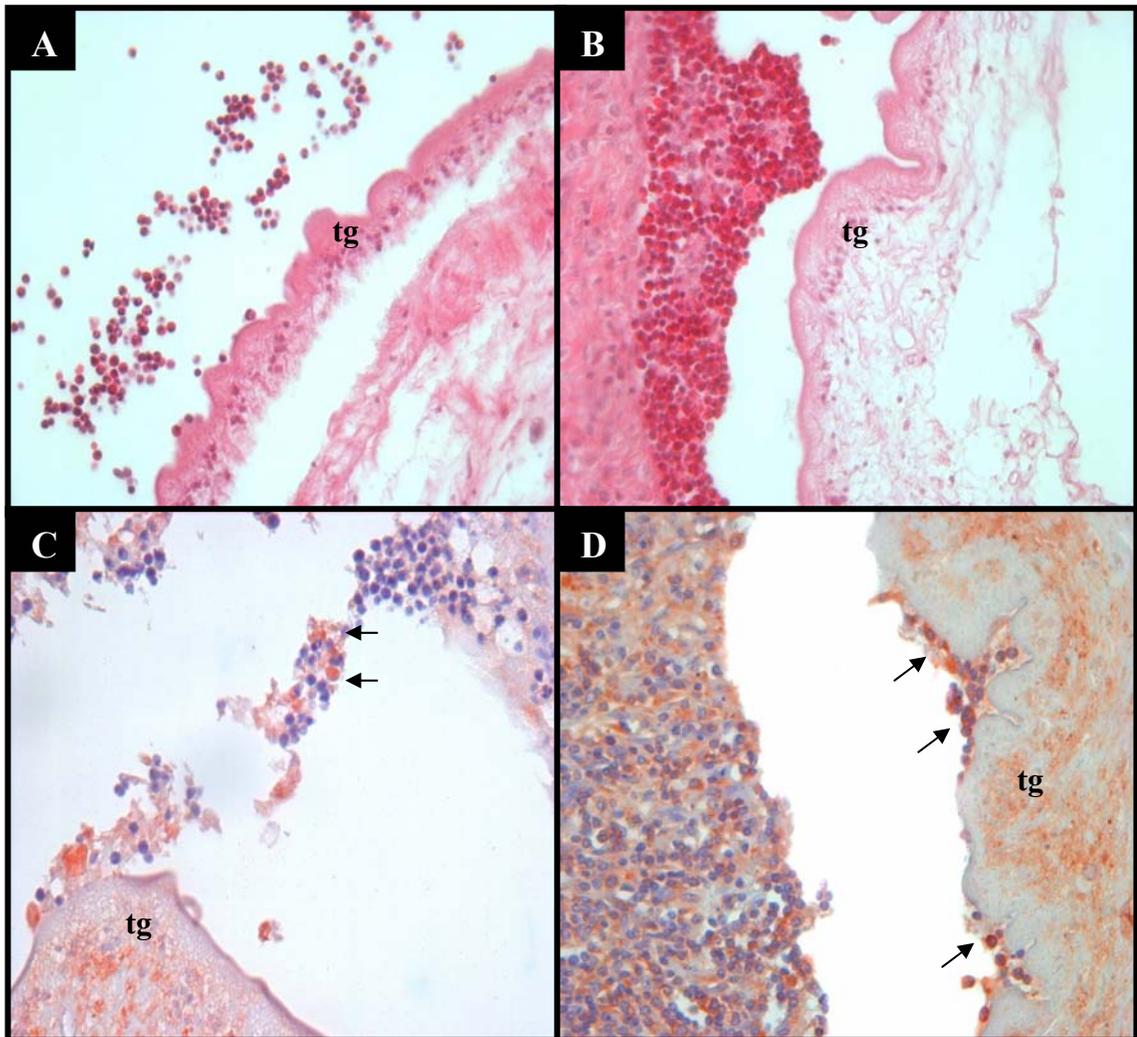


Figura 11.- Infiltrado eosinofílico, moderado, zonalmente extensivo, en un animal control (A) con grado 3 de inflamación. de moderado a grave, zonalmente extensivo, y de moderado a grave, en un animal vacunado (B) con grado 3-4 de inflamación, HyE. Distribución de las células inmunopositivas (flechas) a IL-6 en controles (C) y vacunados (D), tegumento (tg), 40x, IHC.