

03062
2eje.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**INFLUENCIA DE MECANISMOS CELULARES Y
FACTORES GONADALES SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE AL CISTICERCO DE
*Taenia crassiceps***

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
BÁSICA**

PRESENTA
Rafael Bojalil Parra

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D.F., 1994



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 está 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.

El trabajo presentado en esta tesis se desarrolló en el
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM
bajo la dirección del **Dr. Carlos Larralde Rangel**

ABSTRACT
of the Ph.D. thesis

**INFLUENCE OF CELLULAR MECHANISMS AND GONADAL FACTORS
ON THE IMMUNE RESPONSE TO *Taenia crassiceps* CYSTICERCI**

by **Rafael Bojalil-Parra**

This work studies some biological factors on experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. This parasite has enormous structural and antigenic similarities with the cysticerci of *Taenia solium*. Besides, its asexual reproduction capability makes easier the experimental approach. Beyond the variations in susceptibility found between different mice strains, in all of them females are more susceptible than males to intraperitoneal infection by *T. crassiceps*. Previous work has shown that specific antibodies against this parasite are not protective. Herein we explored the role of cellular immune mechanisms in controlling infection by *T. crassiceps*. Moreover, we also explored if gonadal factors do exert an influence on such mechanisms, in such a way that could explain differences found between sexes.

Cellular immune responses of susceptible mice (Balb/c) were studied *in vivo* by cyclophosphamide (CY) administration and by neonatal thymectomy. A group of neonatally thymectomized mice was further transferred with T-enriched spleen cells obtained from immunized animals. The influence of specific sex hormones on susceptibility to *T. crassiceps* cysticerci was studied by reconstituting gonadectomized mice of both sexes with their own major sex hormone or with the sex hormone of the opposite sex. The hormones used were 17- β -estradiol and 5- α -dihydrotestosterone (5- α -DHT), and were delivered in the form of subcutaneous 3-week controlled dose

dependent release rate pellets. We also studied the rate of intraperitoneal parasite growth, and correlated it with delayed type hypersensitivity (DTH) response to antigens in *T. crassiceps* and with specific antibody production. *In vitro*, we studied the proliferative response to the mitogen Concanavalin A, of spleen cells from infected mice. We also studied the consequences of adding indometacin to this cell cultures.

In both sexes, CY elicited a rise in DTH to antigens in *T. crassiceps* vesicular fluid on a dose dependent basis. Concomitantly, the average number of parasites per mouse declined significantly. On the contrary, thymectomy induced a significant decrease in resistance to the parasites in mice of both sexes with respect to control values. Transfer of T-enriched cells to thymectomized animals induced a significant increase in resistance to the parasite in both sexes compared with thymectomized mice. Transferred cells returned both sexes to their original state. Reconstitution with estrogen brought about large and statistically significant increments in parasite intensities relative to gonadectomized mice, in both females and males. In contrast, reconstitution with 5- α -DHT seemed inconsequential for parasite intensities in both sexes.

Beginning on the 21st day of infection, we observed three simultaneous phenomena: an important increase in parasite intensities, a significant decrease on DTH, and an also significant decrease on proliferative responses to Concanavalin A. The proliferative response to Concanavalin A was regained when indometacin was added to the cultures.

Our results disclose that cellular immune mechanisms play a role in the immunologically mediated resistance against *T. crassiceps* cysticerci and that the immune control of this murine cysticercosis is influenced by sex hormones, which act through the thymus, and possibly also through peripheral lymphoid cells freed from thymic control before neonatal thymectomy.

It is necessary to study in the near future if inhibition of cellular immune response beyond the third week of infection, could be due to the dominance from this point of TH2 cells and their products.

Vo. Bo.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Larralde Rangel', with a stylized flourish at the end.

Dr. Carlos Larralde Rangel
Thesis Director

A mis hijos, Natalia y León Felipe

A Vero

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Modelo murino.....	3
Antecedentes.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	
Resumen de materiales y métodos publicados.....	7
Otros materiales y métodos.....	10
RESULTADOS	
Resumen de resultados publicados.....	12
Resultados complementarios.....	21
DISCUSIÓN.....	26
CONCLUSIONES.....	36
CONSIDERACIONES FINALES.....	37
LISTA DE ABREVIATURAS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
APÉNDICES.....	45

A) Artículos publicados con resultados de la tesis

- A.1 Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciuotto E, Larralde C. Thymus related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol 1993; 79: 384-9.
- A.2 Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. A role for 17- β -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol 1994; 80: 563-568.

B) Revisión publicada

Bojalil R. Respuesta inmune o tolerancia. La selección celular en el timo. Rev Invest Clin 1994; 46: 323-31.

RESUMEN

Este trabajo tiene como origen el estudio de factores biológicos en el modelo experimental murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*. Este parásito, además de poseer semejanzas estructurales y antigénicas con el de *Taenia solium*, es capaz de reproducirse asexualmente lo que facilita su manejo experimental. Aunque existen variaciones en la susceptibilidad encontrada entre distintas cepas de ratones, en todas ellas las hembras son más susceptibles que los machos a la infección intraperitoneal por *T. crassiceps*. Trabajos previos mostraron la incapacidad de los anticuerpos específicos producidos en contra de este parásito, de proteger a los animales. Este trabajo tuvo como fin explorar el papel de los mecanismos inmunes celulares en el control de la infección por *T. crassiceps*. Además, se exploró si factores gonadales influyen sobre dichos mecanismos, de tal manera que se explicaran las diferencias en susceptibilidad entre sexos.

La respuesta inmune celular *in vivo* se estudió aplicando ciclofosfamida (CY) o timectomizando neonatalmente a ratones Balb/c. A un subgrupo de estos últimos se les transfirieron células de ratones inmunizados, enriquecidas de linfocitos T. Los efectos de hormonas sexuales específicas sobre la susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps* se estudiaron aplicando a ratones previamente gonadectomizados, tabletas de liberación controlada que contenían 17- β -estradiol o 5- α -dihidrotestosterona (5- α -DHT). Se estudió también la cinética del crecimiento parasitario, en relación a la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) y a la producción de anticuerpos específicos en contra de antígenos de *T. crassiceps*. *In vitro*, estudiamos la respuesta proliferativa de células de bazo de ratones infectados, al estímulo por Concanavalina A (Con A) y el efecto de la adición de indometacina a tales cultivos.

La CY indujo un aumento de la DTH y de la resistencia de los ratones, efectos opuestos a los obtenidos con la timectomía neonatal. La transferencia de células T restableció la susceptibilidad original de los ratones. El 17- β -estradiol indujo en ratones gonadectomizados de ambos sexos un aumento en la susceptibilidad, la 5- α -DHT no la modificó. A partir del día 21 de infección se observaron tres fenómenos coincidentes: el aumento sostenido de la carga parasitaria y la caída simultánea de las respuestas de DTH y a Con A. La respuesta al mitógeno se recuperó al agregar indometacina a los cultivos.

Las evidencias apuntan a que los mecanismos inmunes celulares tienen un papel fundamental en el control de esta parasitosis, y a que dicho control inmune está influido por hormonas sexuales. Se discute la necesidad de estudiar a futuro si la inhibición de la respuesta celular a partir de la tercera semana de la infección, se debe al predominio, a partir de ese momento, de las células TH2 y sus productos.

INTRODUCCIÓN

La cisticercosis humana es una enfermedad producida por el metacéstodo de *Taenia solium*, frecuente en México, considerada como un problema de salud pública. En la Encuesta Serológica Nacional más reciente (Larralde et al, 1992), se encontró una seroprevalencia a nivel nacional del 1.2%, con grandes variaciones regionales.

Al igual que otras enfermedades parasitarias, la cisticercosis es una enfermedad crónica en donde el parásito permanece por largos períodos sin que parezca existir una respuesta efectiva del hospedero para eliminarlo, aunque probablemente sí para limitar su reproducción en el organismo. El parásito tampoco parece inducir un daño importante en el hospedero, y cuando esto sucede se debe más a su localización que a su capacidad patogénica. Su alojamiento en ciertas zonas del cerebro puede producir desde cuadros epilépticos hasta la muerte por hipertensión endocraneal, mientras que en otras zonas del cerebro o en músculos la infección puede pasar desapercibida.

Los parásitos en general se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente que rodea a la especie humana; las interacciones entre unos y otros seguramente han existido desde hace siglos, y muy probablemente la presencia de parásitos ha sido una fuerza importante en la selección de funciones inmunes que actualmente conocemos. De la misma manera, los parásitos deben de haberse adaptado a través del tiempo a las barreras que sus hospederos les han impuesto. Así, es de esperarse que una relación tan antigua haya llegado a cierto equilibrio, de tal manera que la permanencia de unos y otros se asegure. Los parásitos no afectarían la

sobrevivencia de sus hospederos o al menos no de grandes cantidades de ellos, y los hospederos montarían una respuesta inmune que limitara la invasión, pero que no necesariamente eliminara por completo al parásito, al menos no en ciertas etapas de la vida del hospedero (Mitchell, 1991).

Estas situaciones de permanencias largas y poco perturbantes de ciertos parásitos en sus hospederos, ¿se deben a que son infecciones relativamente inocuas?, ¿o tal vez a falta de recursos del sistema inmune para eliminarlos?, ¿a que aún teniendo los recursos el parásito no es reconocido como elemento ajeno al organismo?, ¿o simplemente a que el parásito tiene mecanismos evasores eficientes, que por supuesto incluirían la capacidad de inhibir la respuesta de rechazo del hospedero?

El modelo murino

Ante la dificultad de experimentar para conocer y definir diversos factores biológicos en la relación hospedero/parásito relativos a la cisticercosis humana, se adoptó y ha resultado muy útil un modelo de cisticercosis experimental murina, causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps*.

Este modelo ofrece diversas ventajas, que incluyen la posibilidad de realizar un número grande de experimentos, la facilidad operativa y las semejanzas en ciclo biológico, estructura, antigenicidad y capacidad de daño tisular con su homólogo humano (Larralde y cols 1989a).

La infección ocurre naturalmente al ingerir el ratón huevecillos del parásito, expulsados en las heces fecales de carnívoros pequeños. Experimentalmente puede inducirse con la inyección intraperitoneal de los cisticercos. La reproducción del parásito en este caso es asexual, por gemación. Esta característica del metacéstodo,

que no comparte el de *T. solium*, permite además cultivarlo, lo que facilita los estudios *in vitro*. El modelo facilita enormemente el estudio de los efectos de manipulaciones *in vivo* y de modificaciones *in vitro*, y permite obtener grandes cantidades de antígenos del parásito (Larralde y cols., 1989b, 1990, Sciutto y cols., 1990).

Antecedentes

Uno de los primeros hallazgos con este modelo experimental fue que, a diferencia de otras infecciones, las hembras resultaron más susceptibles que los machos a la infección intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps* (Sciutto y cols., 1991).

Surgió entonces la pregunta: ¿estas diferencias se deben a factores gonadales?, y ¿específicamente a hormonas sexuales?. Los primeros experimentos publicados a este respecto consistieron en gonadectomizar a los animales, con lo que las diferencias entre sexos desaparecieron debido a un aumento en la carga parasitaria de los machos aunado a una disminución de la de las hembras (Huerta y cols., 1992).

Estos resultados indicaron que los factores gonadales participan en la susceptibilidad al parásito. La posibilidad de una influencia directa de las hormonas sexuales sobre el parásito se estudió midiendo el efecto *in vitro* de estradiol, progesterona y testosterona sobre el crecimiento y la capacidad reproductora (producción de nuevas yemas) de cisticercos de *T. crassiceps* en cultivo (Huerta y cols., 1992). En ese trabajo no se encontró influencia directa de estas hormonas sobre los parámetros medidos.

Quedaba entonces por explorar la posibilidad de la influencia de los factores gonadales sobre la respuesta inmune al cisticerco de *T. crassiceps*. Se sabe por

trabajos de distintos autores, que las hormonas sexuales influyen sobre la respuesta inmune de diversas maneras. En general, el estradiol estimula la respuesta de anticuerpos y frecuentemente inhibe la respuesta dependiente de células (Ansar-Ahmed, 1985). El siguiente paso razonable era explorar si la resistencia al parásito está mediada fundamentalmente por anticuerpos o por células, y entonces definir en qué medida los factores gonadales alteran dicha respuesta.

Por trabajos previos, se sabía que era posible inducir protección relativa a *T. crassiceps* con la inoculación de antígenos específicos (Good et al, 1982). En el laboratorio se tenía la idea de que esta protección relativa no dependía de la presencia de anticuerpos, a pesar de que desde los 70 Good y Miller (1976) y Chernin (1977) demostraron la existencia de una respuesta de anticuerpos a la infección con *T. crassiceps*. En trabajos hechos por Sciutto (1990), tanto midiendo el efecto del suero *in vitro* como por transferencia pasiva de suero de animales inmunizados a ratones susceptibles, no se encontró que los anticuerpos protegieran a los animales de la infección; incluso se observó una influencia negativa (Sciutto, 1990).

Con estos antecedentes se plantearon los experimentos reportados en esta tesis, con el fin de explorar el papel de la respuesta celular en la resistencia al cisticerco de *T. crassiceps*, y su posible relación con factores gonadales. Se decidió estudiarlo inicialmente *in vivo*, aprovechando las ventajas que nos da el poseer un modelo en el que podemos contar el total de la carga parasitaria.

Se utilizó ciclofosfamida (CY), una droga que, en amplios rangos de dosis, es capaz de inducir un aumento de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), sin afectar o a veces inhibiendo la respuesta de anticuerpos. Así mismo, se empleó la timectomía neonatal como un medio para afectar la respuesta inmune de los ratones

(Balb/c). A un subgrupo de estos últimos se les transfirieron células de ratones inmunizados, enriquecidas de linfocitos T.

La influencia de las hormonas sexuales específicas sobre la susceptibilidad al cisticercos de *T. crassiceps*, se midió gonadectomizando a ratones de ambos sexos y reponiéndoles hormonas con la aplicación subcutánea de tabletas de liberación continua de 17- β -estradiol o 5- α -dihidrotestosterona (5- α -DHT). Se estudió la modificación de las cargas parasitarias en cada uno de los grupos.

Buscando definir con mayor claridad los blancos de las hormonas sexuales para influir sobre la capacidad de respuesta inmune del parásito, se estudió el efecto de la coexistencia de gonadectomía y timectomía en el mismo animal.

Se midió también la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos parasitarios, correlacionándola con la carga parasitaria y con la respuesta de anticuerpos. *In vitro* se estudió la capacidad de los mononucleares de sangre periférica de los ratones, de responder a un mitógeno de linfocitos T (Concanavalina A) en función de la carga parasitaria. Dado que se encontró que en ciertos momentos de la infección la respuesta a Con A está inhibida, y ya que está descrito en otro tipo de infecciones que los macrófagos son capaces de inhibir la respuesta por la producción de prostaglandinas, se hicieron algunos experimentos para iniciar el estudio del papel de los macrófagos y de las prostaglandinas en la inhibición de la respuesta a Concanavalina A.

MATERIALES Y MÉTODOS

RESUMEN DE LOS MATERIALES Y MÉTODOS PUBLICADOS

Los detalles de los materiales y métodos descritos en esta sección se encuentran en los artículos de los anexos A.1 (Bojalil y cols., 1993) y A.2 (Terrazas y cols., 1994), a continuación se describen en forma abreviada.

Ratones

En todos los experimentos mencionados en esta tesis se utilizaron ratones de la cepa BALB/c -susceptible a la infección por *T. crassiceps*- mantenidos desde hace más de 20 generaciones en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las edades de los ratones de ambos sexos al momento de la infección eran de 6 a 8 semanas.

Cisticercos

Se usaron cisticercos de la cepa ORF, conservados en el Instituto a través de pases sucesivos de ratón en ratón (hembras Balb/c). Su obtención para infección o como fuente de antígenos fue a partir de ratones con 2 a 4 meses de infección. Se extraían los metacístodos de la cavidad peritoneal, se lavaban en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) y se seleccionaban para infección o bien se centrifugaban en frío para la obtención de sobrenadante. Este sobrenadante, consistente fundamentalmente de líquido vesicular, se utilizó como fuente de antígenos tanto para medir las respuestas de hipersensibilidad retardada como para detectar anticuerpos específicos por el método de ELISA.

Infección

La infección experimental siempre fue inoculando en la cavidad peritoneal de los ratones 10 cisticercos de aprox. 2 mm de diámetro, sin gemar, suspendidos en 200 µl de PBS. Las cargas parasitarias resultantes siempre se midieron a los 30 días de infección (excepto cuando se especifica lo contrario).

Afectación de la respuesta inmune celular

La CY se utilizó disuelta en solución salina estéril, y se inyectó en la cavidad peritoneal de los ratones a dosis de 20 ó 200 mg/Kg de peso del ratón, 2 días antes de la infección experimental.

La timectomía neonatal se realizó transtorácicamente a ratones entre 24 y 72 horas de nacidos. Al final de la infección todos los animales se examinaron macroscópicamente e histológicamente para confirmar la ausencia de timo, descartándose aquellos en donde se hubiera encontrado alguna evidencia de su existencia. Los ratones operados sin timectomizar no mostraron diferencias con los controles, por lo que se incluyeron en este último grupo.

Las células linfoides que se transfirieron fueron obtenidas de bazo de ratones previamente inmunizados con 100 µg de extracto total de cisticercos de *T. crassiceps*. Después de lavar las células se determinó su viabilidad (>95%) y se pasaron por una columna de nylon-lana para obtener una población rica en células T (alrededor del 90%). Cada ratón transferido recibió 1×10^7 células en 200 µl de medio RPMI. Las hembras recibieron células de hembras y los machos de machos, 24 horas antes de la infección. Los ratones control recibieron únicamente medio RPMI.

Afectación de factores sexuales

Las gonadectomías se realizaron bajo anestesia a las 5 semanas de edad de los ratones. La inoculación de los parásitos se hizo tres semanas después.

Para la reconstitución hormonal se utilizaron tabletas que liberan la hormona en forma continua durante tres semanas (Innovative Research of America). Se aplicaron subcutáneamente a ratones hembras y machos previamente gonadectomizados, y a las tres semanas se repitió la dosis. A grupos distintos de ambos sexos se aplicaron hormonas femeninas (17- β -estradiol, a dosis de 0.01 y 0.1 mg/tableta) o masculinas (5- α -dihidrotestosterona, a dosis de 0.5 mg/tableta), tres días antes de la infección.

Medición de respuesta de hipersensibilidad retardada

La respuesta de hipersensibilidad retardada se midió a los 15 días de la infección, inyectando al cojinete plantar derecho de cada ratón 100 μ g de líquido vesicular en 30 μ L de solución salina estéril. El grosor del cojinete se midió antes de la inyección y a las 24 horas, y la respuesta se expresó como el porcentaje de incremento del grosor, comparando el obtenido a las 24 horas con su propio basal.

Análisis estadístico

El significado estadístico de los efectos de las variables experimentales se determinó por el análisis multifactorial de varianza (Anónimo, 1985). Para la comparación entre grupos el análisis requirió de transformación algebraica, ya que no se encontró una distribución normal de los datos y las varianzas entre los grupos no fueron homogéneas. Para la transformación se utilizó la ecuación (no. de parásitos por ratón + 1) $\times 10^{1/4}$.

OTROS MATERIALES Y MÉTODOS

Estudios *in vitro*

Para medir la respuesta a Concanavalina A (Con A), se utilizaron células de bazo de ratones. Para ello, se extrajeron los bazos en condiciones estériles y se transfirieron a solución salina balanceada (SSB). Se perfundieron con 5 ml de la misma solución y se lisaron los eritrocitos con cloruro de amonio al 0.87% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se lavaron tres veces con SSB, se contaron en una cámara de Neubauer y se ajustaron a 5×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina, 1% de aminoácidos no esenciales, 0.5% de L-glutamina 200 mM y 25 mM de Hepes. La viabilidad, medida por exclusión de azul tripano, fue siempre mayor al 95%.

A microplacas de cultivo de 96 pozos se agregaron 5×10^5 células/pozo (100 μ l); después, 100 μ l de una solución de Con A a 2 μ g/ml en medio de cultivo suplementado, o 100 μ l de medio de cultivo suplementado. Se incubaron 54 horas a 37°C con 5% de CO₂, y se agregaron 10 μ l de medio de cultivo con un μ Ci de timidina tritiada. Se volvieron a incubar esta vez por 18 horas, para después cosechar las células sobre un papel de fibra de vidrio, y contarse la marca radiactiva en un contador de centelleo. Los resultados se reportaron como índice de estimulación, que no es más que la relación entre el número de cuentas por minuto obtenido de las células estimuladas sobre el de las células no estimuladas.

En los experimentos en donde se probó el efecto de indometacina y de la eliminación de células adherentes de los cultivos, se siguieron los mismos pasos que

los descritos en la estimulación con Con A, sólo que además en el primer caso se agregaron en los pozos de la placa 40 ng (20 μ l de una solución de 2 μ g/ml) de indometacina. Para eliminar a las células adherentes, el total de células se incubó en cajas de Petri 3 horas a 37 °C con 5% de CO₂. Recuperadas las demás células se volvieron a contar y ajustar a 5×10^6 /ml.

RESULTADOS

RESUMEN DE LOS RESULTADOS PUBLICADOS

Estos resultados se encuentran descritos con mayor detalle en los artículos de los anexos A.1 (Bojalil y cols., 1993) y A.2 (Terrazas y cols., 1994).

Efectos de la Ciclofosfamida.

Con la aplicación de CY, se observó un aumento de la respuesta de hipersensibilidad retardada, dependiente de la dosis utilizada (20 y 200 mg/Kg, Tabla I, Bojalil y cols. 1993). Este aumento resultó estadísticamente significativo con la dosis de 200 mg/Kg de peso ($p < 0.0001$).

Tabla I. Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones tratados con ciclofosfamida (CY).

CY (mg/Kg)	DTH*			
	Hembras		Machos	
	n	$\bar{x} \pm ES$	n	$\bar{x} \pm ES$
0	27	5.2 \pm 0.7	20	5.7 \pm 0.5
20	18	7.2 \pm 0.7	18	8.9 \pm 1.4
200	18	30.0 \pm 3.7 ^a	18	21.1 \pm 2.4 ^a

* Medida como incremento porcentual promedio (\bar{x}) en el grosor del cojinete plantar, relativo a los valores iniciales de cada ratón, 24h después de la inyección de 30 μ l de líquido vesicular de *T. crassiceps* en el cojinete plantar. La medición se hizo 15 días después de la infección intraperitoneal. n, número de parásitos por grupo; ^a $p < .0001$ con respecto a 0 y 20 mg/kg.

En coincidencia con el aumento de la respuesta de hipersensibilidad retardada, la carga parasitaria disminuyó significativamente con la misma dosis alta de CY (Tabla II, Bojalil y cols. 1993), tanto en las hembras (56%, $p < 0.02$) como en los machos (37%, $p < 0.05$); en estos, el número de parásitos también disminuyó significativamente con la dosis baja (19%, $p < 0.05$). Con el uso de CY la respuesta de anticuerpos, siempre de mayor intensidad en las hembras, sufrió modificaciones no significativas estadísticamente; en ambos sexos aumentó con la dosis baja y disminuyó con la alta.

Tabla II. Carga parasitaria en ratones tratados con ciclofosfamida (CY).

CY (mg/Kg)	No. de parásitos*			
	Hembras		Machos	
	n	$\bar{x} \pm ES$	n	$\bar{x} \pm ES$
0	27	163.7 \pm 21.4	20	34.0 \pm 5.8
20	18	239.9 \pm 39.0	18	27.6 \pm 8.7 ^b
200	18	71.1 \pm 18.6 ^a	18	21.3 \pm 4.2 ^b

* Los animales recibieron una inoculación intraperitoneal de 10 parásitos a las 6-8 semanas de edad, y la carga parasitaria individual se midió después de 30 días. n, número de parásitos por grupo; \bar{x} , número promedio de parásitos por ratón; ^a $p < 0.02$ con respecto a controles; ^b $p < 0.05$ con respecto a controles.

Efectos de la timentomía neonatal y de la transferencia de células.

A los 30 días de infección, los ratones machos control tuvieron un número promedio de parásitos significativamente menor que el de las hembras control ($p < 0.0001$, Tabla III, Bojalil y cols. 1993).

La timentomía neonatal indujo en ambos sexos una disminución significativa de la resistencia al parásito ($p < 0.0001$, Tabla III), proporcionalmente mucho mayor en los machos (aumentó 567% la carga parasitaria) que en las hembras (aumentó el 100%), de tal manera que la relación de cargas hembras/machos pasó de 5.4 en los controles a 1.6 en los timentomizados. Consecuentemente, en estos últimos la diferencia de las cargas parasitarias entre los sexos no fue estadísticamente significativa.

La transferencia de células enriquecidas en linfocitos T a los ratones timentomizados, los regresó a su estado original de susceptibilidad (Tabla III). Es decir, en ambos sexos aumentó la resistencia con respecto a los timentomizados ($p < 0.0001$ en hembras, $p < 0.0002$ en machos) y reaparecieron las diferencias estadísticas entre sexos ($p < 0.05$).

Tabla III. Carga parasitaria en ratones timentomizados neonatalmente y transferidos con células T.

Grupo	No. de parásitos*			
	Hembras		Machos	
	n	x±ES	n	x±ES
Control	47	149.6±13.0	30	27.9±3.7 ^a
Timentomizados	27	302.9±43.8 ^b	11	186.1±36.1 ^b
Transferidos	18	129.1±30.7 ^c	5	24.2±9.0 ^d

* Los animales recibieron una inoculación intraperitoneal de 10 parásitos a las 6-8 semanas de edad, y la carga parasitaria individual se midió después de 30 días. n, número de parásitos por grupo; x, número promedio de parásitos por ratón; ^a $p < 0.0001$ con respecto a hembras control; ^b $p < 0.0001$ con respecto a su propios controles y sin significancia estadística con respecto al otro sexo; ^c $p < 0.0001$ con respecto a timentomizadas y sin significancia estadística con respecto a sus controles; ^d $p < 0.0002$ con respecto a timentomizados, sin significancia estadística con respecto a sus controles y $p < 0.05$ con respecto a las hembras transferidas.

En lo que se refiere a la respuesta de hipersensibilidad retardada a los antígenos del cisticerco, los ratones controles de ambos sexos reaccionaron de manera similar (Tabla IV, Bojalil y cols. 1993); la timectomía neonatal indujo una reducción significativa sólo en las hembras ($p < 0.002$, Tabla IV). La transferencia de células provocó, nuevamente en las hembras, una ligera recuperación de su respuesta de hipersensibilidad retardada y no modificó la de los machos. No se encontraron diferencias significativas en el título de anticuerpos entre ninguno de los grupos.

Tabla IV. Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones timectomizados neonatalmente y transferidos con células T.

Grupo	DTH*			
	Hembras		Machos	
	n	$\bar{x} \pm ES$	n	$\bar{x} \pm ES$
Control	38	4.7 \pm 0.7	20	3.4 \pm 0.6 ^a
Timectomizados	22	2.1 \pm 0.5 ^b	6	3.5 \pm 1.6
Transferidos	14	2.9 \pm 0.5 ^c	5	2.8 \pm 0.5

* Incremento porcentual promedio en el grosor del cojinete plantar, relativo a los valores iniciales de cada ratón, 24h después de la inyección de 30 μ l de líquido vesicular de *T. crassiceps* en el cojinete plantar. La medición se hizo 15 días después de la infección intraperitoneal. n, número de parásitos por grupo; ^a sin significancia estadística con respecto a timectomizados, transferidos y hembras control; ^b $p < 0.002$ con respecto a sus controles; ^c sin significancia estadística con respecto a sus controles, las timectomizadas y los machos transferidos.

En resumen, se había encontrado que la timentomía neonatal disminuye las diferencias en la resistencia al parásito entre los sexos, hasta el punto de no ser significativas, fenómeno que significa que las gónadas ejercen al menos parte de su efecto a través del timo. Sin embargo, no dejó de llamar la atención el hecho de que en cada uno de los experimentos con animales timentomizados, las hembras tenían mayores cargas parasitarias que los machos. Es decir, se antojaba probable que las hormonas sexuales tuvieran también un efecto extratímico sobre la respuesta al cisticerco de *T. crassiceps*. De esta manera se repitieron los experimentos de gonadectomizar a los animales, pero esta vez se gonadectomizaron también ratones que habían sido previamente timentomizados neonatalmente. Con esto se esperaba eliminar definitivamente las diferencias en carga parasitaria entre los sexos, como sucede con la sola gonadectomía, pero probablemente con cargas parasitarias más altas por la ausencia de timo.

En esta serie de experimentos, se encontró otra vez una gran diferencia en la susceptibilidad de las hembras control (intactas) con respecto a la de los machos control (relación 4.7:1, $p < 0.01$, Tabla V, Terrazas y cols., 1994), pero esta vez la respuesta de hipersensibilidad retardada de los machos intactos fue significativamente mayor que la de las hembras ($p < 0.02$), mientras que la respuesta de anticuerpos fue muy similar.

Efectos de la gonadectomía.

La gonadectomía redujo significativamente la carga parasitaria de las hembras con respecto a la de las hembras intactas (41%, $p < 0.01$, Tabla V), y aumentó de manera muy notable la de los machos también respecto a sus controles intactos

(190%, $p < 0.01$), de tal manera que la relación de cargas parasitarias promedio se modificó de 4.7 a 0.9. La respuesta de hipersensibilidad retardada de las hembras se incrementó significativamente con la gonadectomía (62%, $p < 0.05$, Tabla V) y disminuyó, no significativamente, en los machos (26%). Como siempre los niveles de anticuerpos anticisticercos no se modificaron (Tabla V).

Efectos de la timectomía neonatal.

Como en la serie anterior de experimentos, la timectomía neonatal provocó en ambos sexos un aumento importante y significativo ($p < 0.01$, Tabla V) de las respectivas cargas parasitarias, otra vez proporcionalmente mucho mayor en los machos (351%) que en las hembras (72%), de tal manera que la diferencia de las cargas parasitarias dejó de ser significativa. Se mantuvo una vez más una diferencia numérica a favor de las hembras (la relación bajó de 4.7 a 1.8).

La DTH esta vez sólo se redujo de manera significativa en los machos (87%, $p < 0.01$, Tabla V), ya que en las hembras disminuyó únicamente en un 13%.

Efectos de timectomía y gonadectomía coexistentes.

En las hembras, los efectos contrarios de ambos procedimientos se anularon entre sí, dando como resultado una carga parasitaria idéntica con respecto al grupo control (Tabla V). En los machos, la gonadectomía no modificó el número de parásitos obtenidos con la sola timectomía, y dio como resultado un aumento de 325% en la carga parasitaria con respecto a la de los controles ($p < 0.01$, Tabla V).

Nótese que estos dos procedimientos sumados abatieron las diferencias significativas en las cargas parasitarias entre los sexos, y las diferencias numéricas en las mismas (la relación hembras/machos bajó de 4.7 en los normales a 1.1 en los timectomizados-gonadectomizados).

La hipersensibilidad retardada en respuesta a antígenos del parásito se redujo significativamente sólo en los machos (62%, $p < 0.02$), y los títulos de anticuerpos no se modificaron en ningún sexo (Tabla V).

Tabla V. Influencia del timo y las gónadas sobre la carga parasitaria, la respuesta de hipersensibilidad retardada y el título de anticuerpos.

Grupo	No. Parásitos ^a		DTH ^b		Título de Ac's ^c	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Control	204±92 ^m (n=8)	43±21 (n=10)	4.5±2.2 ⁿ	8.8±2.2	0.65±0.19 ^o	0.72±0.08
Gx	119±80 ^{n,o} (n=10)	125±81 ^p (n=10)	7.3±2.3 ^r	6.5±2.3 ^s	0.63±0.11 ^s	0.65±0.10 ^s
Tx	351±99 ^{n,o} (n=12)	194±163 ^p (n=8)	3.9±1.7 ^s	1.1±1.1 ^p	0.73±0.19 ^s	0.75±0.16 ^s
Tx+Gx	201±157 ^{s,o} (n=8)	183±71 ^p (n=7)	4.0±2.4 ^s	3.0±1.9 ^q	0.58±0.16 ^s	0.73±0.14 ^s

^a número promedio de parásitos por ratón ± desviación estándar; ^b respuesta de hipersensibilidad retardada, medida como incremento porcentual del grosor del cojinete plantar, relativo a su grosor inicial ± desviación estándar; ^c densidad óptica promedio en ELISA para la detección de anticuerpos anti *T. crassiceps* ± desviación estándar. Gx, gonadectomizados; Tx, timectomizados; ^m $p < 0.01$ con respecto a machos control; ⁿ $p < 0.02$ con respecto a machos control; ^o sin significancia estadística con respecto a machos del mismo grupo; ^p $p < 0.01$ con respecto a sus controles; ^q $p < 0.02$ con respecto a sus controles; ^r $p < 0.05$ con respecto a sus controles; ^s sin significancia estadística con respecto a sus controles.

Efectos de la reconstitución hormonal.

Nuevamente se encontraron diferencias significativas en las cargas parasitarias entre los sexos (esta vez con una relación hembras control/machos control de 16.7, Tabla VI, Terrazas y cols., 1994). También se encontró un efecto de la gonadectomía tendiente a igualarlas por un aumento de la intensidad parasitaria de los machos de un 356% ($p < 0.01$) y una disminución de la de las hembras de un 55% ($p < 0.01$).

Con la reconstitución hormonal, a pesar de grandes variaciones dentro de los grupos, se observaron algunos cambios analizables estadísticamente (Tabla VI). La reconstitución con 17- β -estradiol con las dos dosis utilizadas (0.01 y 0.1 mg/pellet) indujo en ambos sexos, aumentos grandes y significativos ($p < 0.01$) en la carga parasitaria con respecto a los ratones gonadectomizados. Así en las hembras gonadectomizadas la dosis de 0.01 mg/pellet aumentó la carga parasitaria en 221% y la de 0.1 mg/pellet en 291%. En los machos gonadectomizados y reconstituidos, la dosis baja de estradiol indujo un aumento de 272% y la alta de 343% en el número de cisticercos. En cambio, la reconstitución con 5- α -dihidrotestosterona no tuvo efectos en la carga parasitaria en ninguno de los dos sexos.

La respuesta de hipersensibilidad retardada sufrió cambios en el sentido opuesto al de la cantidad de parásitos recuperados (Tabla VI): con la dosis mayor de estradiol bajó significativamente dicha respuesta en ambos sexos con respecto a los ratones gonadectomizados. Con la dosis menor, también bajó significativamente la respuesta de hipersensibilidad retardada de los machos, pero la de las hembras no se modificó. Con testosterona, bajó más en hembras que en machos con respecto a sus respectivos controles gonadectomizados, aunque en ninguno de los dos sexos las diferencias fueron significativas.

Como siempre, los títulos de anticuerpos no sufrieron modificaciones significativas, aunque en las hembras tratadas con la dosis mayor de estradiol el aumento observado estuvo cerca de ser estadísticamente significativo (Tabla VI).

Tabla VI. Influencia de la reconstitución hormonal sobre la carga parasitaria, la respuesta de hipersensibilidad retardada y el título de anticuerpos.

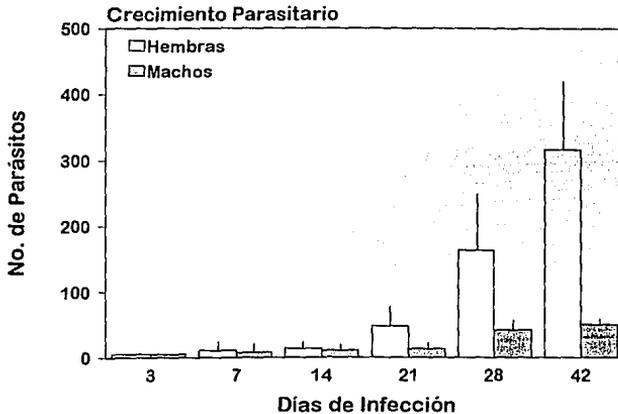
Grupo	No. Parásitos ^a		DTH ^b		Título de Ac's ^c	
	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos
Control	268±85 ^m (n=10)	16±22 (n=10)	4.0±2.2 ⁿ	8.5±2.6	0.9±0.3 ^o	0.8±0.3
Gx	119±79 ^{no} (n=10)	72±51 ^p (n=10)	4.4±2.6 ^s	7.1±3.4 ^s	0.8±0.3 ^s	1.0±0.2 ^s
17-β-E (0.01 mg)	382±269 ^t (n=6)	268±236 ^t (n=7)	4.8±2.5 ^u	4.8±1.6 ^t	1.0±0.2 ^u	0.8±0.3 ^u
17-β-E (0.1 mg)	466±209 ^t (n=5)	319±173 ^t (n=9)	1.8±2.2 ^t	2.1±2.2 ^t	1.2±0.2 ^u	0.8±0.2 ^u
5-α-DHT (0.5 mg)	152±101 ^u (n=10)	67±35 ^u (n=10)	2.7±2.2 ^u	6.8±2.0 ^u	0.9±0.3 ^u	1.0±0.2 ^u

^a número promedio de parásitos por ratón ± desviación estándar; ^b respuesta de hipersensibilidad retardada, medida como incremento porcentual del grosor del cojinete plantar, relativo a su grosor inicial ± desviación estándar; ^c densidad óptica promedio en ELISA para la detección de anticuerpos anti *T. crassiceps* ± desviación estándar. Gx, gonadectomizados; 17-β-E, reconstituidos con tabletas subcutáneas de 17-β-estradiol; 5-α-DHT, reconstituidos con tabletas subcutáneas de 5-α-dihidrotestosterona; ^m p<0.01 con respecto a machos control; ⁿ p<0.02 con respecto a machos control; ^o sin significancia estadística con respecto a machos del mismo grupo; ^p p<0.01 con respecto a sus controles; ^s sin significancia estadística con respecto a sus controles; ^t p<0.01 con respecto a los gonadectomizados del mismo sexo; ^u sin significancia estadística con respecto a los gonadectomizados del mismo sexo.

RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

Cinética del crecimiento parasitario.

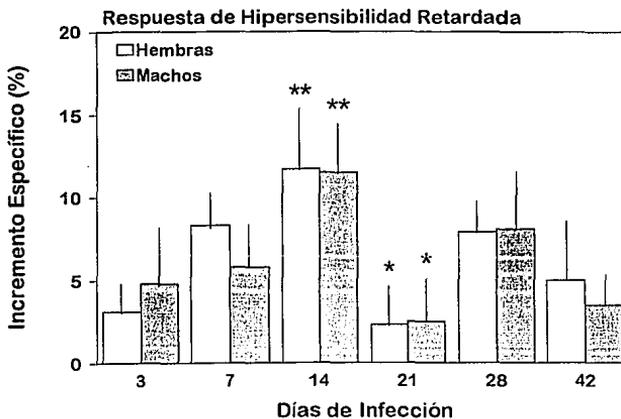
En todos los experimentos la infección se inició por la inoculación de 10 cisticercos sin yemas (de alrededor de 2mm de diámetro) en cada ratón. Para estos experimentos se hicieron grupos de animales que se fueron sacrificando a los 3, 7, 14, 21, 28 y 42 días de infección. Desde el tercer día de infección se encontraron números pequeños de parásitos, que fueron aumentando en los días subsiguientes. El cambio más importante se dio a partir del día 21, en que empezó un crecimiento sostenido de la carga parasitaria, más notable en hembras. Se comenzó a observar entonces una diferencia en susceptibilidad entre sexos, que se fue haciendo cada vez más evidente.



La inoculación inicial fue de 10 cisticercos sin yemas (aprox 2mm de diámetro), por vía intraperitoneal. El número de parásitos se refiere a los encontrados en dicha cavidad en los distintos días de infección.

Cinética de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH).

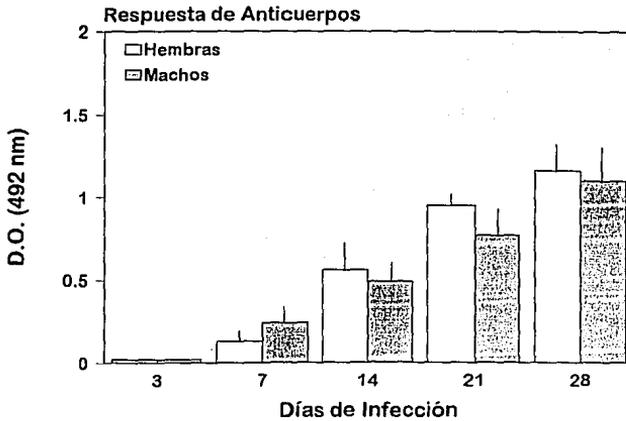
Simultáneamente a la carga parasitaria, se midió la DTH de los ratones hacia antígenos de *T. crassiceps*, a distintos días de infección. Llama la atención que tanto en hembras como en machos dicha respuesta se detecta ya por arriba de la basal desde los primeros días, y va en aumento paralelo con la carga parasitaria. El día 14 se alcanza una diferencia significativa con respecto a todos los demás tiempos de infección (** $p < 0.001$). El día 21 se observa también en ambos sexos una caída estadísticamente significativa de la DTH (* $P < 0.01$) con respecto a los días 7, 14 y 28, coincidente con el aumento en la velocidad de crecimiento parasitario. Después de este punto, la DTH fluctuó pero ya no recuperó la intensidad máxima del día 14.



Aumento porcentual promedio en el grosor del cojinete plantar, con respecto al basal, 24h después de la inyección de 30 μ l de líquido vesicular de *T. crassiceps*. * $p < 0.01$ del día 21 con respecto a los días 7, 14 y 28; ** $p < 0.001$ del día 14 con respecto a todos los demás días.

Cinética de la respuesta de anticuerpos.

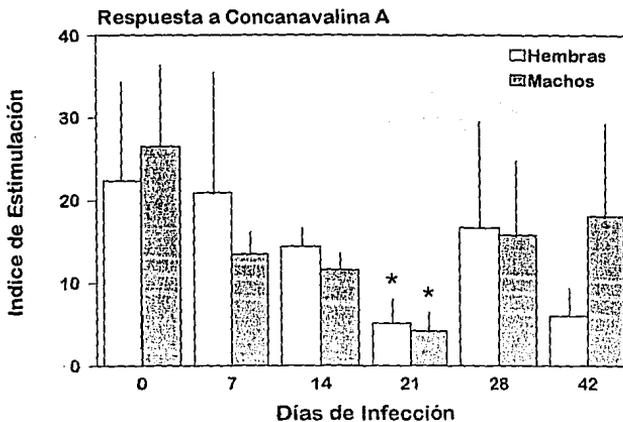
La producción de anticuerpos anticisticercos fue más lenta que la respuesta de hipersensibilidad retardada, al menos en los niveles de sensibilidad de nuestros métodos, ya que fueron detectados a partir del 7o día de infección. A diferencia de la DTH, la respuesta de anticuerpos fue aumentando a medida que pasaban los días y aumentaba la carga parasitaria. La producción de anticuerpos no mostró variaciones bruscas.



Detección de anticuerpos IgG anti *T. crassiceps*, por el método de ELISA, a distintos días de infección con el parásito.

Cinética de la respuesta a Con A.

La respuesta proliferativa de las células mononucleares de bazo de los ratones ante el estímulo por Con A, fue menor en los ratones parasitados (días 7-42) que en los controles (día 0) ya desde el 7º día de infección. La capacidad proliferativa fue disminuyendo paulatinamente a medida que pasaban los días, hasta alcanzar valores significativamente más bajos que los controles el día 21 de la infección (* $p < 0.01$). Esta disminución significativa coincidió con el aumento en la velocidad de crecimiento de la carga parasitaria y con los valores más bajos de hipersensibilidad retardada.

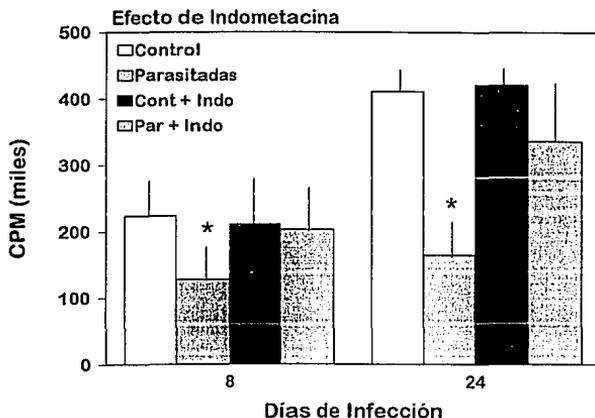


Respuesta proliferativa al estímulo por Concanavalina A, de células mononucleares de bazo de ratones infectados (días 7-42) y sus controles (día 0). Índice de estimulación = la relación entre el número de cuentas por minuto obtenidas de las células estimuladas sobre el de las no estimuladas. * $p < 0.01$ con respecto a los controles.

Efectos de la indometacina sobre la respuesta a Con A *in vitro*.

Como se esperaba de experimentos previos, la respuesta a Con A de las células de bazo de ratones hembras con 8 y 24 semanas de infección, se encontró significativamente disminuida con respecto a los controles no infectados de la misma edad (* $p < 0.05$).

Al agregar indometacina al medio de cultivo, la respuesta proliferativa de las células de los animales infectados se recuperó a niveles similares a la de los controles. No se observaron efectos de la indometacina sobre la proliferación de las células de los animales no parasitados. Al eliminar por adherencia a los macrófagos de los cultivos, los resultados fueron muy similares a los obtenidos con indometacina (datos no mostrados).



Efectos de la indometacina sobre la respuesta proliferativa al estímulo por Concanavalina A, de células mononucleares de bazo de ratones infectados y sus controles. * $p < 0.05$ con respecto a los controles.

DISCUSIÓN

Una de las primeras conclusiones que surgen de los resultados aquí presentados, es que los efectos del sistema inmune sobre el crecimiento del cisticerco de *T. crassiceps* están relacionados con mecanismos celulares, y que éstos dependen en gran medida de la presencia del timo en la etapa postnatal. Esta afirmación se basa en varios hallazgos. En primer lugar en que la dosis alta de CY indujo un aumento significativo de la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos parasitarios, y paralelamente disminuyó el número de cisticercos obtenidos de los ratones. En segundo lugar, en que, por el contrario, la timectomía neonatal provocó una caída significativa de la resistencia al parásito en ambos sexos. Finalmente, la conclusión de que los mecanismos celulares son responsables de la resistencia, se reforzó con el hallazgo de que la transferencia de células enriquecidas en linfocitos T a ratones timectomizados, restableció la resistencia de los ratones de ambos sexos a los niveles originales.

La inmunidad celular parece entonces, ser la principal responsable de la limitación del crecimiento parasitario. El éxito de la transferencia de células enriquecidas en linfocitos T deja poco lugar a dudas al respecto. Por otro lado, en general se encontró una correlación negativa entre la carga parasitaria y la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) hacia antígenos del cisticerco, en contraste con la respuesta de anticuerpos que aumentó con la intensidad de la carga. También es cierto que aún cuando la DTH se modificó en sentido opuesto a la carga parasitaria en la gran mayoría de los experimentos, no siempre hubo una correlación estadísticamente significativa entre resistencia y niveles de DTH. Esto puede deberse

a varias cosas. En primer lugar, medimos la DTH a los 15 días de la infección, cuando todavía esta respuesta puede estar alta; probablemente a los 21 días de infección la correlación hubiese sido mucho mayor. Por otro lado, es posible que la respuesta de hipersensibilidad retardada, en nuestros experimentos evaluada en función del aumento del grosor del cojinete plantar, sea una medida burda, o tal vez restringida, de las funciones celulares. El que la respuesta de hipersensibilidad retardada no sea necesariamente un reflejo del conjunto de la respuesta inmune celular, lo ha establecido claramente Dannenberg (1991) para la infección tuberculosa. Para él, la respuesta inmune celular y la de hipersensibilidad retardada son el mismo fenómeno inmunológicamente hablando, pero son distintos en sus consecuencias y en los hallazgos histopatológicos. Define la respuesta inmune celular como una respuesta beneficiosa mediada por macrófagos, atraídos al sitio de la lesión y activados por citocinas. Estas citocinas, producto de células T específicas estimuladas por antígenos, activarían a los macrófagos permitiéndoles matar a las bacterias ingeridas. En la de hipersensibilidad retardada, también participarían células T y citocinas, pero en este caso el resultado sería la muerte de los macrófagos infectados no activados y la necrosis de los tejidos circundantes. Así, aunque los dos mecanismos logran controlar el crecimiento parasitario, el costo para el organismo es mayor con la respuesta de hipersensibilidad retardada ya que sacrifica sus propios tejidos (Dannenberg, 1991).

Otro de nuestros argumentos para concluir que los mecanismos celulares están involucrados en la respuesta inmune al cisticerco de *T. crassiceps*, fue el de los efectos de la ciclofosfamida (CY) sobre la cantidad de parásitos que crecen en la cavidad peritoneal de los ratones infectados. Al respecto, podría objetarse que los resultados que se obtuvieron con la CY podrían deberse a una acción antiparasitaria

directa de la droga. Sin embargo, pensamos que esto no es así, fundamentalmente por dos razones: 1) la CY tiene efectos claros sobre la respuesta inmune (Askenase y cols., 1975; Turk y Parker, 1982; Denman y cols., 1992), mismos que se documentaron en nuestros experimentos, y 2) el fármaco tiene una vida media plasmática de 6-7 hrs (Bagley y cols., 1973); la inoculación intraperitoneal de los parásitos ocurrió 48 hrs después de la inyección de la droga.

En nuestros experimentos, la timectomía no alteró significativamente los niveles de anticuerpos anticisticercos, como se esperaba de experimentos previos de otros autores (Shimamoto y cols., 1980; Kawauchi y cols., 1983a, 1983b). El hecho de que la respuesta de anticuerpos en animales timectomizados no se afecte, podría deberse a la mezcla compleja de los antígenos parasitarios que se utilizaron, algunos de los cuales podrían inducir una respuesta timo independiente, como ocurre con ciertos polisacáridos bacterianos (Davies y cols., 1970). De hecho, se ha reportado que el cisticerco de *T. crassiceps* es capaz de inducir una expansión policlonal de linfocitos B (Good y cols., 1982). Así mismo, Shimamoto y cols (1980) encontraron que la respuesta de los ratones neonatalmente timectomizados a mitógenos de T está alterada, pero no lo está la respuesta a LPS. Incluso, recientemente Hillman y cols. (1991) reportaron que los ratones atímicos ("desnudos") Balb/c pueden producir anticuerpos de todas las subclases de IgG específicos en contra de una forma polimerizada de un péptido pequeño, sugiriendo que "un cambio de clase en los linfocitos B puede ocurrir aún en condiciones de ayuda de T limitada, dado que el inmunógeno pueda causar entrecruzamiento eficiente de sus receptores de superficie."

Otra de las conclusiones sugeridas por los resultados de nuestro trabajo es que los factores asociados al sexo que alteran los mecanismos inmunes que influyen

sobre la susceptibilidad al cisticerco de *T. crassiceps*, lo hacen al menos de dos maneras. En primer lugar a través del timo y posiblemente también a través de células linfoides periféricas que fueron liberadas a la circulación antes de la timectomía. La acción gonadal sobre la resistencia se demostró previamente por las distintas cargas parasitarias encontradas en hembras y machos y prácticamente igualadas por las gonadectomías (Huerta y cols., 1992). La posibilidad de una influencia directa de los productos gonadales sobre la capacidad reproductora del parásito, hasta ahora no ha podido ser demostrada. Experimentos *in vitro* no mostraron efectos de las principales hormonas sexuales ($17\text{-}\beta\text{-estradiol}$, testosterona y progesterona) sobre la capacidad de crecimiento o reproducción de cisticercos en cultivo (Huerta y cols., 1992). La conclusión de que el timo es un blanco importante para los factores gonadales se basa en el hecho de que la diferencia de susceptibilidades entre sexos se minimiza con la timectomía neonatal. La sugerencia de que además de su efecto sobre timo, las hormonas sexuales pudieran también ejercer una acción extratímica, surgió de la siguiente observación. La timectomía neonatal hace desaparecer las diferencias significativas entre las cargas parasitarias encontradas en los distintos sexos; sin embargo, en todos los experimentos que incluyeron este procedimiento quirúrgico, se mantuvo una diferencia notable en cargas parasitarias, siempre mayor en las hembras. La razón por la que se pudiera estar viendo un fenómeno con significado biológico pero sin significado estadístico, podría ser que el tamaño de los grupos de ratones fuera muy pequeño para detectar diferencias también pequeñas. Para demostrar que éstas existen habría que hacer un experimento calculando la cantidad de ratones requeridos por grupo, de acuerdo con la variabilidad observada.

La sugerencia de una acción extratímica de las gónadas, se reforzó con el hallazgo de que la gonadectomía realizada a animales previamente timentomizados, iguala el número de parásitos encontrados en hembras y machos. En estos últimos, los efectos de gonadectomía y timentomía en la carga parasitaria no fueron sumatorios. Esto podría interpretarse como indicativo de un efecto máximo posible definido por las limitaciones biológicas de la reproducción del parásito, pero también podría reflejar una interacción entre los sistemas inmune y endócrino, ya que se esperarían efectos sumatorios en sistemas con control independiente. Es posible entonces que la totalidad del efecto positivo de las gónadas masculinas sobre la respuesta inmune a este parásito, se ejerza a través del timo aumentando su capacidad restrictiva sobre el crecimiento parasitario. En ausencia del timo, la presencia o ausencia de las gónadas masculinas sería irrelevante para el control de la infección. Compatible con esta interpretación es la descripción de receptores para testosterona en el timo y en los timocitos, pero no en linfocitos periféricos ni de bazo (Cohen y cols., 1983; Gulsham, 1990). En las hembras, por el contrario, la timentomía más gonadectomía en el mismo animal, modifican la carga parasitaria tanto con respecto a las sólo gonadectomizadas como en relación a aquellas sólo timentomizadas. Ambos procedimientos anulan sus efectos entre sí de tal manera que las cargas parasitarias de los animales de este grupo son muy similares a las de las hembras control. Es muy posible que esto signifique que el timo no sería el único blanco de las gónadas femeninas en su influencia sobre la resistencia a la cisticercosis experimental murina, e incluso no podemos descartar la posibilidad de que su principal acción sea extratímica. De hecho, se han encontrado receptores para estrógenos en el timo y también en linfocitos T CD8+ (Cohen y cols., 1983), MQs (Hu y cols., 1988; Gulsham, 1990) y linfocitos B (Danel y cols., 1988), de tal manera

que las hormonas gonadales femeninas podrían estar afectando directamente a las células linfoides periféricas. Otros posibles blancos de las hormonas sexuales serían el tejido linfóide periférico (Ansar-Ahmed y cols., 1985) e incluso el sistema neuroendócrino (Besedovsky y cols., 1985; Blalock, 1989).

Hasta aquí se podía hablar de efectos gonadales sobre la respuesta inmune al parásito. Los datos eran congruentes con la propuesta general de que los ovarios inhiben dicha respuesta, y los testículos la estimulan. Faltaba sin embargo, definir el papel específico de las hormonas sexuales. En los experimentos de reconstitución hormonal de ratones gonadectomizados, se encontró que el estradiol provocó un aumento claro y significativo de la carga parasitaria tanto en hembras como en machos, con un decremento simultáneo de la respuesta de hipersensibilidad retardada, sin afectar la respuesta de anticuerpos. En contraste, la reconstitución con 5- α -dihidrotestosterona (5- α -DHT) no tuvo ningún efecto en carga parasitaria, hipersensibilidad retardada o título de anticuerpos en ningún grupo de ratones. Así, se llegó a la conclusión de que en las hembras normales, los altos niveles de estradiol favorecen la reproducción de los cisticercos. La ausencia de efectos de la 5- α -DHT sobre la carga parasitaria, podría hacer pensar que la resistencia relativa de los machos al crecimiento parasitario se deba más a sus niveles normalmente bajos de estrógenos que a la presencia de 5- α -DHT. Sin embargo, dado que la orquiectomía tiene consecuencias negativas sobre la resistencia, el no encontrar efectos de la 5- α -DHT no descarta un papel activo de los andrógenos. Es posible que la dosis utilizada de la hormona no haya sido la adecuada, o incluso que las tabletas de hormonas con 5- α -DHT no funcionaran. Esto último es poco probable ya que, a pesar de que no se midieron niveles hormonales circulantes, los ratones machos reconstituidos con esta hormona tenían vesículas seminales de características macroscópicas muy similares a

las de los machos normales. Hay que considerar también que si bien en la mayoría de los tejidos blanco la 5- α -DHT es el metabolito más activo, hay algunos tejidos como el músculo esquelético y la médula ósea en donde los efectos androgénicos están mediados por testosterona propiamente o por otros metabolitos (Murad and Haynes, 1980), y ese bien podría ser el caso del timo.

Dos puntos importantes que quedan por definir son el de los mecanismos específicos de la protección por células, y el de la acción de las hormonas sexuales sobre dicha protección. Ya con base en los resultados de la utilización de la CY (Bojalil y cols., 1993; ver anexo A1) propusimos que las diferencias encontradas entre sexos podrían deberse al balance entre células TH1 y TH2 como respuesta al cisticercos de *T. crassiceps*, que podría no ser igual en hembras y en machos. En la literatura es frecuente encontrar que los estrógenos están relacionados con componentes inmunológicos o influyen sobre eventos inmunes (Schuurs y Verheul, 1990; Grossman, 1991). De acuerdo con las acciones descritas y los sitios en donde se han encontrado receptores para estrógenos en la red inmunoreguladora, se pueden prever efectos de estas hormonas que pudieran favorecer a los parásitos. Por ejemplo, los estrógenos son capaces de estimular la producción de anticuerpos e inhibir respuestas celulares (Grossman, 1984; Ansar-Ahmed y cols., 1985), de manera que es posible que pudieran deprimir la función de células TH1 y estimular las de TH2.

Hay ejemplos de infecciones parasitarias en donde el balance TH1/TH2 parece tener un papel importante en la resistencia. Así, ante una infección con *Nippostrongylus brasiliensis* o con *Schistosoma mansoni*, los ratones montan una fuerte respuesta tipo TH2, con una gran producción de IL-10, con un aumento de IL-4 e IL-5 y disminución de IFN γ e IL-2 (Mosmann and Moore, 1991). Sin embargo

no es una respuesta protectora como probablemente lo sería si se activaran las células TH1, como se ha demostrado para *L. major* (Bretscher, 1992). Esto probablemente se deba, al menos en parte, a la inmunidad protectora conferida por macrófagos activados (las células TH1 producen IFN γ , potente activador de macrófagos) en contra de diversos parásitos (James y Nacy, 1993). La infección por *T. crassiceps* pudiera ser otro caso en donde las células TH1 estarían involucradas en la protección, si bien la respuesta sería predominantemente TH2, al menos en ratones de cepas susceptibles. El aumento significativo de la respuesta de hipersensibilidad retardada inducido por altas dosis de CY y su correlación con un aumento de la resistencia al parásito, y la pérdida de dicha resistencia en los ratones timectomizados, cuya deficiencia en la producción de IL-2 se ha descrito antes (Kawauchi y cols., 1983a), son datos congruentes con la idea de que las células TH1 serían protectoras en esta parasitosis. En el mismo tenor, los efectos conocidos de la CY (aumento de DTH, producción disminuida de anticuerpos) que se han atribuido a una acción inhibitoria sobre células "supresoras" (Turk y Parker, 1982), bien podrían deberse a que este efecto inhibitorio se ejerciera sobre células TH2 que afectan la función de TH1 inhibiendo la producción de citocinas (fundamentalmente IFN γ). Esto sin duda es un tema de gran interés que requiere de exploración más detallada.

Resultados preliminares de Luis Ignacio Terrazas en el mismo laboratorio, son compatibles con la sugerencia de que la respuesta a la infección por *T. crassiceps* sería tipo TH2 en las hembras de ratones Balb/c. Al estudiar la producción de citocinas por células de animales infectados, se ha observado que la respuesta tipo 2 se presenta rápidamente después del inicio de la infección en las hembras, y más lentamente en los machos. De hecho en los machos nunca se observó un aumento de IL-10. Por el contrario, las citocinas de la respuesta tipo 1 tardaron más en reducirse

en los machos que en las hembras (L.I. Terrazas, comunicación personal). Parecería entonces, que la defensa del macho consistiría en retardar el dominio de la respuesta tipo 2. Por supuesto es necesario profundizar los estudios sobre este punto.

En los estudios *in vitro* realizados, se encontró una buena correlación con lo observado *in vivo*: a la tercera semana de la infección, momento en que hay un aumento claro y sostenido en la carga parasitaria, la respuesta de hipersensibilidad retardada y la respuesta proliferativa a Con A caen significativamente, en contraste con la respuesta de anticuerpos que continúa en ascenso a medida que aumenta la cantidad de cisticercos en la cavidad peritoneal. La respuesta proliferativa a Con A de los ratones infectados, se recupera si al cultivo se agrega indometacina o, en menor medida, si se eliminan del mismo a los macrófagos. Esto significa que posiblemente los macrófagos peritoneales, a través de la producción de prostaglandina E2 (PGE2), que es inhibida por indometacina, estén provocando una supresión de la respuesta celular. La PGE2 inhibe la producción de IL-2 y además inhibe la activación de macrófagos inducida por interferón gama (IFN γ) (Unanue, 1989). Es decir, su efecto parece consistir en la eliminación de la principal citocina estimuladora del crecimiento de células T (IL-2) y además inhibir la capacidad de estas células de activar macrófagos (vía IFN γ). ¿Podrían de esta manera prevalecer las células TH2 a partir de cierto momento de la infección por *T. crassiceps*?

En los resultados de esta tesis se encontró que la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos del parásito se desploma simultáneamente con el aumento sostenido de la carga parasitaria y de los títulos de anticuerpos. Ya desde hace al menos 20 años se describió que cuando se dan respuestas inmunes intensas, la respuesta de DTH y la producción de anticuerpos son mutuamente excluyentes (Parish, 1972), y esto podría explicarse al menos parcialmente por el

antagonismo entre las células TH1 y TH2, responsables o al menos actores importantes de este par de respuestas respectivamente (Mosmann y Moore, 1991).

CONCLUSIONES

1. Los resultados tanto de los experimentos *in vivo* e *in vitro*, indican que los efectos del sistema inmune sobre el cisticerco de *T. crassiceps* están relacionados con mecanismos celulares. Estos dependen en gran medida de la presencia del timo en la etapa postnatal. Es posible que las células TH1 estén involucradas en la protección, si bien la respuesta dependería predominantemente de TH2.

2. El control inmune de esta parasitosis está influido por factores asociados al sexo, cuya acción se da a través del timo y posiblemente también a través de células linfoides periféricas liberadas del control tímico antes de la timectomía.

3. De las hormonas sexuales estudiadas, se encontró un claro efecto negativo del estradiol sobre la resistencia. Con estos datos no se puede descartar un efecto contrario de los andrógenos.

4. La respuesta celular se inhibe a partir de la tercera semana de la infección; se propone explorar si esta inhibición se debe a la prevalencia, a partir de ese momento, de las células TH2 y sus productos. Si esto es así, hay que estudiar también si el predominio de TH2 se da por factores del hospedero, o si los parásitos contribuyen inhibiendo la respuesta dañina para ellos, estimulando la que no lo es. Se debe definir si se trata de una inmunosupresión como la observada en infecciones con *Trypanosoma cruzi*, que en humanos parece estar mediada por la inhibición de la expresión del receptor de IL-2 y de CD3, CD4 y CD8 en los linfocitos (Sztein y cols., 1990).

CONSIDERACIONES FINALES

En determinadas patologías, entre las que destaca la leishmaniasis, existe evidencia que sugiere que las células TH1, una vez establecida su dominancia, median el control inmune de la enfermedad y las TH2 median su progresión (Locksley and Scott, 1991). Sin embargo, la respuesta en algunas cepas de ratones y en ciertos individuos no es la adecuada para la protección. Las células de ganglios de ratones BALB/c (susceptibles a la infección con *L. major*) producen IL-4 e IL-5 en respuesta a un estímulo *in vitro* con antígenos del parásito, y en cambio las células de ratones C3H (resistentes) producen IFN γ (Locksley y Scott, 1991). ¿Podría ser el mismo caso con la infección por cisticercos de *T. crassiceps*? En trabajos de E. Sciuotto y cols. (1991), se han observado grandes diferencias en susceptibilidad en distintas cepas de ratones, asociadas a antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC): ¿será que el predominio de la respuesta TH1 o TH2 esté relacionada con sus alelos del MHC?, ¿éstos ratones son capaces de montar respuestas diferentes a las que ya se conoce que hacen (TH1 o TH2), ante otros estímulos antigénicos?. Es decir, se sabe por ejemplo, que la respuesta inmune a infecciones por helmintos se caracteriza por una producción elevada de IgE, eosinofilia y mastocitosis (Finkelman y cols., 1991), fenómenos mediados fundamentalmente por una respuesta tipo 2. Entonces, ¿en qué medida depende la respuesta del tipo de estímulo y en qué medida de la capacidad de un organismo para establecer o mantener dicha respuesta?. Las diferencias en susceptibilidad de distintas cepas de ratones a ciertas infecciones pueden aprovecharse para contestar estas preguntas.

Se antoja interesante especular que los parásitos como *T. crassiceps* han adquirido la habilidad de modular la respuesta inmune de sus hospederos de tal manera que predominen aquellos mecanismos con los que puedan lidiar, a los que puedan enfrentar, de los que puedan escapar. Pensando en las cepas de ratones con susceptibilidades distintas se puede especular también que aquellas resistentes lo son por mantener más tiempo la respuesta adecuada y las susceptibles la cambian ante estímulos crónicos, tal vez movidos por factores del parásito, tal vez por sistemas propios de retroalimentación y control de ciertos mecanismos de respuesta.

A la luz de los nuevos conocimientos en inmunología, es factible y hasta imperativo conocer más a fondo los mecanismos de la respuesta inmune que controlan o limitan una infección, y aquellos que confieren una protección completa en contra de parásitos o microorganismos patógenos específicos. Este entendimiento implicaría también la posibilidad de modificar la respuesta de individuos naturalmente susceptibles. Antecedentes existen, Bretscher y cols (1992) encontraron que al inmunizar con bajas dosis de *Leishmania major* se fija la respuesta en una fase TH1 con activación de la respuesta de hipersensibilidad retardada y protección de los animales susceptibles ante un segundo reto. El futuro tal vez nos depare tratamientos o vacunas capaces de estimular específicamente los mecanismos inmunes protectores en contra de microorganismos patógenos que representen un reto importante para la salud o para la vida.

LISTA DE ABREVIATURAS

5- α -DHT	5- α -dihidrotestosterona
17- β -E	17- β -estradiol
Con A	Concanavalina A
CY	Ciclofosfamida
DTH	Hipersensibilidad retardada (por sus siglas en inglés: “delayed type hypersensitivity”).
IFN	Interferón (gama)
IL	Interleucina (2, 4, 10, etc.)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (por sus siglas en inglés: “major hystocompatibility complex”).
MQs	Macrófagos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
SSB	Solución salina balanceada
TH	Célula T “ayudadora” (1 ó 2)

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

BIBLIOGRAFÍA

- Anónimo, 1985. Introductory guide for personal computers. Version 6 de., SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 111 p.
- Ansar-Ahmed S, Penhale J, Talal N. Sex hormones, Immune responses and autoimmune diseases. *Am J Pathol* 1985; 121: 531-51.
- Askenase PW, Hayden BJ, Gershon RK. Augmentation of delayed type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. *J Exp Med* 1975; 141: 697-702.
- Bagley CM, Bostick FW, De Vita VT. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Research* 1973; 33: 226-33.
- Besedovsky H, Del Rey A, Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. *J Immunol* 1985; 132: 750s-4s.
- Blalock E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989; 59: 1-32.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1993; 79: 384-9.
- Bojalil R. Respuesta inmune o tolerancia. La selección celular en el timo. *Rev Invest Clin* 1994; 46: 323-31.
- Bretscher P, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 1992; 257: 539-42.
- Chernin J. Common host antigens in laboratory rats infected with the metacestode of *Taenia crassiceps*. *J Helminthol* 51: 215-20.
- Cohen J, Danel L, Gordier G, Saez S, Revillard JP. Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *J Immunol* 1983; 131: 2767-71.

- Dannenberg Jr AM. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* 1991; 12: 228-33.
- Davis AJS, Carter RL, Leuchars E, Wallis V, Dietrick FM. The morphology of immune reactions in normal, thymectomized, and reconstituted mice. III. Response to bacterial antigens: salmonellar flagellar antigen and pneumococcal polysaccharide. *Immunol* 1970; 19: 945-57.
- Denman AM, Denman DJ, Palmer RG. Alkylating agents. En Rugstad HE, Endresen L, Forre O, eds. *Immunopharmacology in autoimmune diseases and transplantation*. New York: Plenum Press 1992, pp. 139-58.
- Finkelman FD, Pearce E, Urban Jr JF, Sher A. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunoparasitol Today* 1991; 12: A62-6.
- Good AH, Miller K. Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infect Immun* 1976; 14: 449-56.
- Good AH, Siebert Jr AE, Robbins P, Zaun S. Modulation of the host immune response by the larvae of *Taenia crassiceps*. En Flisser A, Wills K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F, eds. *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. New York: Academic Press 1982, pp 593-610.
- Grossman C. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocr Rev* 1984; 5: 435-55.
- Grossman C. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991; 40: 649-59.
- Gulsham R. Oestrogen receptors in macrophages. *Scan J Immunol* 1990; 31: 691-7.
- Hillman K, Shapira-Nahor O, Blackburn R, Hernández D, Golding H. A polymer containing a repeating peptide sequence can stimulate T-cell-independent IgG antibody production *in vivo*. *Cell Immunol* 134: 1-13.
- Hu SK, Mitcho YL, Roth NC. Effect of estrogen on IL-1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1988; 10: 247-52.

- Huerta L, Terrazas LI, Sciutto E, Larralde C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol* 1992; 78: 471-6.
- James SL, Nacy C. Effector functions of activated macrophages against parasites. *Curr Op Immunol* 1993; 5: 518-23.
- Kawauchi H, Taniguchi K, Kubo C, Shimamoto Y, Nomoto K. The mechanisms of reduction of cell-mediated cytotoxicity in neonatally thymectomized mice. *Immunol* 1983a; 50: 199-205.
- Kawauchi H, Taniguchi K, Masatoshi K, Shimamoto Y, Kubo C, Nomoto K. Differences in thymus dependency among the alloreactive T-cell subpopulations in their development: graft versus host reactions appears to be mediated by delayed type hypersensitivity of tuberculin type. *Cell Immunol* 81: 403-12.
- Larralde C, Sciutto E, Huerta L, Terrazas I, Fragoso G, Trueba L, et al. Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia* 1989a; 57: 131-4.
- Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neuro cysticercosis patients. *Am J Trop Med Hyg* 1989b; 40: 282-90.
- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutierrez G, et al. Seroepidemiología de la cisticercosis humana en México. *Sal Pub Mex* 1992; 34: 197-210.
- Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunoparasitol Today* 1991; 12: A58-61.
- Mitchell GF. Co-evolution of parasites and adaptive immune responses. *Immunoparasitol Today* 1991, 12: A2-5.
- Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunoparasitol Today* 1991; 12: A49-53.

- Murad F, Haynes Jr R.C. Androgens and anabolic steroids. En Gilman AG, Goodman LS, Gilman A, eds. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 6th ed. New York: Macmillan Publishing Co., Inc 1980, pp. 1453-65.
- Parish CR. Transplant Rev 1972; 13: 35-66.
- Sciutto E. Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. Tesis doctoral. México: Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM 1990.
- Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, et al. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine cysticercosis. Parasite Immunol 1990; 12: 687-96.
- Sciutto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, et al. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence in susceptibility. Parasitol Res 1991; 77: 243-6.
- Shimamoto Y, Taniguchi K, Kubo C, Nomoto K. Differences in thymus-dependency among various T-cell functions. Immunol 41: 167-78.
- Schuurs A, Verheul H. Effects of gender and sex steroids on the immune response. J Steroid Biochem 1990; 35: 157-72.
- Sztejn MB, Cuna WR, Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human Lymphocytes. J Immunol 1990; 144: 3558-62.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. A role for 17- β -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol 1994; 80: 563-568.
- Turk JL, Parker D. Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. Immunol Rev 1982; 65: 99-113.

Unanue ER. Macrophages, antigen-presenting cells, and the phenomena of antigen handling and presentation. En Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*, 2nd ed. New York: Raven Press 1989, pp. 95-115.

APÉNDICE A

ARTÍCULOS PUBLICADOS CON RESULTADOS DE LA TESIS

THYMUS-RELATED CELLULAR IMMUNE MECHANISMS IN SEX-ASSOCIATED RESISTANCE TO EXPERIMENTAL MURINE CYSTICERCOSIS (*TAENIA CRASSICEPS*)

R. Bojalil, L. I. Terrazas, T. Govezensky, E. Sciuotto, and C. Larralde

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. AP 70228 México, D.F. 04510 México

ABSTRACT: The role of sex, thymus, and cellular immune mechanisms in mouse resistance to experimental cysticercosis with *Taenia crassiceps* was studied in male and female susceptible mice treated with cyclophosphamide, as well as in mice neonatally thymectomized and passively transferred with T-enriched lymphoid cells. High doses of cyclophosphamide increased delayed hypersensitivity and resistance of mice of both sexes without affecting antibody production. Neonatal thymectomy diminished resistance in both sexes but depressed delayed hypersensitivity in females only, without significantly affecting antibody response in either sex. Passive transfer of T-enriched lymphoid cells to thymectomized mice restored resistance to control levels without greatly affecting delayed hypersensitivity. Thus, our results indicate that cell-associated immune mechanisms are implicated in resistance to murine cysticercosis with *T. crassiceps*. Because neonatal thymectomy nearly equalized the intensity of infection of female and male mice, it is argued that the thymus is importantly involved in the interaction between gonads and the immune system in the control of this cysticercosis.

Experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis (Freeman, 1962; Smith et al., 1972) is possibly under immunoenocrinological regulation (Larralde et al., 1990; Sciuotto et al., 1990, 1991; Huerta et al., 1992). Marked variations in susceptibility have been found to be associated to vaccination, sex, and major histocompatibility complex (Sciuotto et al., 1991). Females of all strains studied sustain larger intensities of infection than males. Gonadectomy alters this resistance pattern and makes intensities equal in both sexes by increasing that of males and diminishing it in females (Huerta et al., 1992). Because vaccination induces resistance to experimental challenge, more notably in males than in females (Sciuotto et al., 1990), whereas immunodepression by irradiation minimizes sex-related differences in intensities (Huerta et al., 1992), the immune response is suspected to be involved in the control of infection in close interaction with gonadal factors. Though the host apparently is capable of developing a conspicuous humoral immune response against *T. crassiceps* larvae (Good and Miller, 1976; Chernin, 1977), most of the antibodies appear not to play an important role in immunoprotection (Sciuotto, 1990). Thus, one is led to propose that immunoenocrinological regulation involves cell-associated immunity. The present study is a first approximation to examine the role of cellular immune mechanisms and their influence on sex-associated differences in resistance to experimental murine cysticercosis caused

by *T. crassiceps*. The experimental procedures consisted of altering the immune response of susceptible mice (BALB/c) of both sexes by cyclophosphamide administration and by neonatal thymectomy. A group of neonatally thymectomized mice was further transferred with T-enriched spleen cells obtained from immunized animals. Cyclophosphamide (CY) was chosen because, at a wide range of doses, it increases the delayed hypersensitivity response (DTH) without affecting antibody titers (Askenase et al., 1975; Turk and Parker, 1982). Neonatal thymectomy was chosen because it is expected to affect the immune response drastically (Kawauchi, Taniguchi, Kubo et al., 1983) and it eliminates a target organ of the immune system known to be affected by sexual hormones (Ansar-Ahmed et al., 1985).

MATERIALS AND METHODS

Inbred BALB/c mice of both sexes, originally from Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) in 1982, have been maintained in controlled conditions at our animal facilities for more than 20 generations. All mice used were 6-8 wk old when infected.

The fast growing ORF strain of *T. crassiceps* isolated by Freeman (1962) was supplied by Dr. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) and has been kept by us by serial passages in BALB/c female mice for 7 yr. Metacercariae of *T. crassiceps* used in this study were harvested from the peritoneal cavity of female BALB/c mice after 2-4 mo of infection. The cysticerci were washed 4 times in phosphate-buffered saline (PBS) (0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and selected for infection of mice or immediately centrifuged at 20,000 rpm (45,700 g) for 1 hr at 4°C to obtain their vesicular fluid as source of antigen. The supernatant fraction, consisting mainly of vesicular flu-

Received 28 April 1992; revised 14 December 1992; accepted 4 January 1993.

id. was collected and its protein concentration measured by Lowry's method (Lowry et al., 1951) and frozen at -70°C until used. This supernatant fraction served as antigen for DTH reactions and serum antibody detection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Larralde et al., 1989).

Experimental infections were achieved by intraperitoneal injection of each mouse with 10 small (ca. 2 mm diameter) nonbudding cysticerci of *T. crassiceps* obtained as described above and suspended in 0.2 ml PBS. Resulting individual intensities of infection always were measured 30 days after infection, by opening the peritoneal cavity and counting the number of cysts found inside.

CY was dissolved in sterile saline immediately before use and injected intraperitoneally as a single dose of 20 or 200 mg/kg/mouse, 2 days before experimental infection. This dose range includes levels affecting only cellular mediated immune responses (20 mg/kg) and both cellular and humoral (200 mg/kg) responses (Turk and Parker, 1982).

Neonatal thymectomy was performed on mice of both sexes 24–72 hr after birth, according to the method described by Sjodin et al. (1963). After the final assessment of experimental responses all mice were autopsied to confirm macroscopically and histologically that they actually were free of thymus. The mice in which thymic tissue was found in the mediastinum were excluded from the study. Sham-thymectomized and control mice always had very similar numbers of parasites so they were all pooled as controls.

Lymphoid cells to be transferred to thymectomized recipients came from BALB/c mice of both sexes, immunized intraperitoneally with 100 μg of total extract of *T. crassiceps* cysticerci (Sciutto et al., 1990). Five days later their spleen cells were obtained by perfusion, washed 3 times in Hanks' solution, and resuspended in supplemented RPMI medium (GIBCO). Viability, determined by trypan blue exclusion, always was more than 95%. Cells were afterward passed through a nylon-wool column (Julius et al., 1973) to obtain a T-enriched population (ca. 90%). Each thymectomized mouse received intraperitoneally 1×10^7 cells in 200 μl RPMI medium. Female mice received cells from females and male mice from males. Cells were transferred 24 hr prior to infection. Control thymectomized mice received 200 μl of RPMI medium in the peritoneal cavity.

DTH was measured 15 days after infection by injecting into the right hind footpad of each mouse 100 μg of vesicular fluid antigens in 30 μl of sterile saline solution, and swelling was measured 24 hr later with a conventional dial-thickness gauge. The response was expressed as the percentage of increase in thickness comparing the original measurement to that obtained 24 hr after injection of the antigen ([thickness after minus thickness before injection divided by thickness before] times 100). The contralateral footpad was injected with 30 μl of sterile saline as a control.

Vesicular fluid from *T. crassiceps* larvae was employed as the source of antigen for detection of anti-cysticercus antibody in the sera of mice by ELISA, which was performed as described elsewhere (Larralde et al., 1989).

The statistical significance of the effects of the ex-

perimental variables on the individual intensities of infection was determined by multifactorial analysis of variance (Anonymous, 1985). Because the individual intensities of infection were not normally distributed and the variances among the different groups were not homogeneous, the analysis required algebraic transformation for appropriate comparisons between groups. The transformed data on intensities of infection that successfully met the requirements of normal distribution and homogeneous variance among groups were calculated according to the equation ([number of parasites/mouse] + 1) $E^{1/4}$. This transformation does not imply significant numeric changes in individual intensities of infection, and the addition of unity eliminates troublesome zeroes without greatly altering numeric scores. The results were also analyzed without transformation. Identical conclusions were reached with both procedures.

RESULTS

Effects of cyclophosphamide

In both sexes, CY elicited a rise in DTH to antigens in *T. crassiceps* vesicular fluid on a dose-dependent basis (Table I). DTH was significantly increased both in males and in females by 200 mg/kg of CY with respect to controls ($P < 0.0001$), but not significantly with 20 mg/kg. Concomitantly, the average number of parasites per mouse declined significantly in females treated with 200 mg/kg of CY with respect to controls (56%, $P < 0.02$, Table II) but was not significantly changed with the lower dose of 20 mg/kg (Table II). In males, both doses of CY significantly diminished the intensity of infection (19% for 20 mg/kg and 37% for 200 mg/kg, both $P < 0.05$, Table II).

Regarding the humoral immune response, 20 mg/kg of CY increased somewhat the amount of anti-cysticercus antibodies, whereas 200 mg/kg decreased it, and, in all cases, females displayed greater antibody concentrations than males. However, the differences in antibody response between sexes and dose of CY were not statistically significant.

Effects of neonatal thymectomy and of transfer of T-enriched cells

Thirty days after intraperitoneal infection control males had smaller numbers of cysticerci than control females ($P < 0.0001$, Table III), as expected from previous experiments (Freeman, 1962; Culbreth et al., 1972; Chernin, 1977; Larralde et al., 1988; Sciutto et al., 1991; Huerta et al., 1992). Thymectomy induced a significant decrease in resistance to the parasites in mice of both sexes with respect to control values ($P < 0.0001$, Table III). The increase of intensity of

TABLE I. Delayed hypersensitivity response in cyclophosphamide (CY)-treated mice.

CY (mg/kg)	Females Δ%*		Males Δ%*	
	n	$\bar{x} \pm SE$	n	$\bar{x} \pm SE$
0	27	5.2 ± 0.7	20	5.7 ± 0.5
20	18	7.2 ± 0.7	18	8.9 ± 1.4
200	18	30.0 ± 3.7	18	21.1 ± 2.4

* Mean percentage increase (\bar{x}) in footpad thickness relative to initial values of each mouse 24 hr after injection of 30 μ l of *Taenia crassiceps* vesicular fluid in the footpad. The measurement was done 15 days after intraperitoneal infection with parasites. n, number of mice per group.

infection in thymectomized animals was proportionally higher in males than in females (6.7 \times vs. 2 \times , respectively). Thus, as a result of neonatal thymectomy the differences in intensities of infection between sexes became statistically insignificant (Table III), although the individual infections always were higher in females.

Transfer of T-enriched cells to thymectomized animals induced a significant increase in resistance to the parasite in both sexes compared to thymectomized mice (females $P < 0.0001$, males $P < 0.0002$, Table III). Transferred cells returned both sexes to their original state. There also reappeared differences in individual intensities of infection between normal females and males ($P < 0.05$, Table III).

With respect to DTH, control parasitized females and males reacted similarly to the antigenic stimulus (Table IV). In contrast, thymectomized parasitized female mice manifested a statistically significant lower response than control females ($P < 0.002$, Table IV), and transfer of T-enriched cells induced in them a small increase in DTH (Table IV). In males, neither thymectomy nor passive transfer of T-enriched cells modified their DTH response.

The humoral immune response, measured by ELISA as anti-cysticercus antibody concentration, did not reveal significant differences in an-

TABLE II. Intensity of infection in cyclophosphamide (CY)-treated mice.

CY (mg/kg)	Females: number of parasites*		Males: number of parasites*	
	n	$\bar{x} \pm SE$	n	$\bar{x} \pm SE$
0	27	163.7 ± 21.4	20	34.0 ± 5.8
20	18	239.9 ± 39.0	18	27.6 ± 8.7
200	18	71.1 ± 18.6	18	21.3 ± 4.2

* Animals were injected intraperitoneally with 10 parasites at 6-8 wk of age, and the individual intensity of infection was measured after 30 days. n, number of mice per group; \bar{x} , mean number of parasites/mouse.

TABLE III. Intensity of infection in neonatally thymectomized and T-cell-recipient mice.

Group	Females: number of parasites*		Males: number of parasites*	
	n	$\bar{x} \pm SE$	n	$\bar{x} \pm SE$
Control	47	149.6 ± 13.0	30	27.9 ± 3.7
Thymectomized	27	302.9 ± 43.8	11	186.1 ± 36.1
T-cell recipients	18	129.1 ± 30.7	5	24.2 ± 9.0

* Animals were injected intraperitoneally (i.p.) with 10 parasites at 6-8 wk of age, and the individual intensity of infection was measured after 30 days. T-cell recipients received 1×10^6 cells i.p. 24 hr before infection. n, number of mice per group; \bar{x} , mean number of parasites/mouse.

tibody content in any of the following cases: between control females and males, between these and thymectomized groups, and between thymectomized mice and those passively transferred with T-enriched lymphoid cells.

DISCUSSION

High doses of CY significantly increased DTH and concomitantly decreased the number of cysticerci obtained from these mice. Neonatal thymectomy caused a significant decrease of resistance to the parasite in both sexes but decreased DTH only in females, and transfer of T-enriched cells to thymectomized mice restored resistance in mice of both sexes to its original level, not affecting DTH in either. Thus it is concluded that immunological control of *T. crassiceps* growth in susceptible BALB/c mice is related to thymus-dependent cellular immune mechanisms, related to DTH more clearly in females than in males.

The significant increase in DTH induced by high doses of CY correlating with an increased resistance and the greater number of cysticerci obtained from thymectomized mice, known to be deficient in IL-2 production (Kawauchi, Taniguchi, Kubo et al., 1983), both suggest that TH1 cells could be involved in mediating protection.

TABLE IV. Delayed hypersensitivity response in neonatally thymectomized and T-cell-recipient mice.

Group	Females Δ%*		Males Δ%*	
	n	$\bar{x} \pm SE$	n	$\bar{x} \pm SE$
Control	38	4.7 ± 0.7	20	3.4 ± 0.6
Thymectomized	22	2.1 ± 0.5	6	3.5 ± 1.6
T-cell recipients	14	2.9 ± 0.5	5	2.8 ± 0.5

* Mean percentage increase (\bar{x}) in footpad thickness relative to initial values of each mouse 24 hr after injection of 30 μ l of *Taenia crassiceps* vesicular fluid in the footpad. The measurement was done 15 days after intraperitoneal infection with parasites. n, number of mice per group.

These cells are responsible for DTH reactions and produce IL-2 and IFN- γ (Mossmann and Coffman, 1987; Street and Mossman, 1991), and CY reported effects (Askenase et al., 1975; Turk and Parker, 1982) could be due to their action on TH2 cells, which are known to inhibit TH1 cell functions (Fiorentino et al., 1989). That CY has important effects upon the immune system is well known (Askenase et al., 1975; Turk and Parker, 1982), but in the experiments reported here it also could be affecting the parasite directly. We doubt that this is the case because CY has a plasmatic half-life of 6–7 hr (Bagley et al., 1973), and we injected it 48 hr before infection. There being other examples of parasitic infections (*Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*) in which the balance between TH1 and TH2 cells plays a major role in resistance (Scott, 1989; Silva et al., 1992), it is suspected that they are involved here too.

Because the difference in susceptibility normally existing between sexes was minimized by thymectomy, results also suggest that sex-associated factors affect the immune response against *T. crassiceps* cysticerci and strengthen the notion that the thymus is an important target for gonadal influence (Ansar-Ahmed et al., 1985). The small but constant difference in intensities favoring females, which remained in thymectomized mice, suggests that, in addition to their effect upon the thymus, sex hormones may also exert an extrathymic action. This could be directly upon peripheral lymphoid cells in which female hormone receptors have been found (Cohen et al., 1983) or through peripheral lymphoid tissue or the neuroendocrine system (Ansar-Ahmed et al., 1985). It would be important to assess whether sex hormones alter the TH1/TH2 subpopulations, because it is known that female hormones can stimulate antibody production and have inhibitory effects on cellular responses (Grossman, 1984; Ansar-Ahmed et al., 1985; Carlsten et al., 1992). The possibility that gonadal products could directly affect the reproductive capacity of the parasite in the host has been shown improbable by *in vitro* cultures of cysticerci with the major gonadal hormones (17 beta-estradiol, testosterone, and progesterone) (Huerta et al., 1992).

In our experiments, thymectomy did not significantly alter the levels of anti-cysticercus antibodies, as expected from experiments by Shimamoto et al. (1980) and Kawachi, Taniguchi, Masatoshi et al. (1983), and decreased DTH only

in females. The unaffected antibody response in thymectomized mice could be due to the complex mixture of our parasite antigens, some possibly inducing a response independent of the thymus, as occurs with certain bacterial polysaccharides (Davies et al., 1970). In fact, Shimamoto et al. (1980) found that the response of thymectomized mice is altered to T mitogens (as concanavalin A), but not to lipopolysaccharides. Furthermore, recently, Hillman et al. (1991) reported that nude BALB/c mice can produce antigen-specific antibodies of all IgG subclasses to a polymerized form of a short peptide, suggesting that "isotype switching in B cells may occur even under conditions of limiting T cell help, provided the immunogen can cause efficient cross-linking of their Ig receptor" (Hillman et al., 1991). That DTH was decreased by thymectomy only in females, but parasite intensity was increased in both sexes, weakens the conclusion of cell-associated immune control of parasite growth, or it reflects the inadequacy of DTH as an indicator of immune cellular mechanisms. We favor the latter possibility, as DTH involves more than immunity (i.e., inflammatory process) and because transfer of T cells to thymectomized mice so effectively restored the resistance pattern to both female and male mice.

Our results disclose that cellular immune mechanisms play a role in the immunologically mediated resistance against *T. crassiceps* cysticerci and that the immune control of this murine cysticercosis is influenced by sex-associated factors, which act through the thymus, and possibly also through peripheral lymphoid cells freed from thymic control before neonatal thymectomy. These experiments and results are necessary foundations for more incisive research on the cells and molecules involved in the immunoenocrine regulation of the growth of *T. crassiceps* cysticerci in mice.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México, and by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM. The authors thank C. Lomeli for his technical expertise and for the animal facilities, and Isabel Pérez-Montfort for English corrections.

LITERATURE CITED

- ANONYMOUS. 1985. Introductory guide for personal computers. Version 6 ed., SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, 111 p.

- ANSAR-AHMED, S., J. PENHALE, AND N. TALAL. 1985. Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. *American Journal of Pathology* 121: 531-551.
- ASKENASE, P. W., B. J. HAYDEN, AND R. K. GERSHON. 1975. Augmentation of delayed-type hypersensitivity by doses of cyclophosphamide which do not affect antibody responses. *Journal of Experimental Medicine* 141: 697-702.
- BAGLEY, C. M., F. W. BOSTICK, AND V. T. DE VITA. 1973. Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Research* 33: 226-233.
- CARLSTEN, H. N., N. NILSSON, R. JONSSON, K. BACKMAN, R. HOLMDAHL, AND A. TARKOWSKY. 1992. Estrogen accelerates immune complex glomerulonephritis but ameliorates T-cell mediated vasculitis and sialadenitis in autoimmune MRL lpr/lpr mice. *Cellular Immunology* 144: 190-202.
- CIERNIN, J. 1977. Common host antigens in laboratory rats infected with the metacestode of *Taenia crassiceps*. *Journal of Helminthology* 51: 215-220.
- COHEN, J. H. M., L. DANIEL, G. GORDER, S. SAEZ, AND J. P. REVILLARD. 1983. Sex steroid receptors in peripheral T cells. *Journal of Immunology* 131: 2767-2771.
- CULBRETH, K. L., G. W. ESCH, AND R. E. KUHN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of ^{14}C -leucine. *Experimental Parasitology* 32: 272-281.
- DAVIES, A. J. S., R. L. CARTER, E. LEUCHARS, V. WALLIS, AND F. M. DIETRICK. 1970. The morphology of immune reactions in normal, thymectomized, and reconstituted mice. III. Response to bacterial antigens: Salmonella flagellar antigen and pneumococcal polysaccharide. *Immunology* 19: 945-957.
- FIORENTINO, D. F., M. W. BOND, AND T. R. MOSSMANN. 1989. Two types of mouse T helper cell IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *Journal of Experimental Medicine* 170:2080-2095.
- FREEMAN, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800). *Rudolphi*, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969-990.
- GOOD, A., AND K. MILLER. 1976. Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infection and Immunity* 14: 449-456.
- GROSSMAN, C. J. 1984. Regulation of the immune system by sex steroids. *Endocrine Reviews* 5: 435-435.
- HILLMAN, K., O. SHAPIRA-NAHOR, R. BLACKBURN, D. HERNANDEZ, AND H. GOLDING. 1991. A polymer containing a repeating peptide sequence can stimulate T-cell-independent IgG antibody production in vivo. *Cellular Immunology* 134: 1-13.
- HUERTA, L., L. I. TERRAZAS, E. SCIUTTO, C. LOMELI, R. M. MONTOYA, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, AND C. LARRALDE. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacystodes. *Journal of Parasitology* 78: 471-476.
- JULIUS, M. H., E. SIMPSON, AND L. A. HERZEMBERG. 1973. A rapid method for isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *European Journal of Immunology* 3: 645-649.
- KAWAUCHI, H., K. TANGUCHI, C. KUBO, Y. SHIMAMOTO, AND K. NOMOTO. 1983. The mechanism of reduction of cell-mediated cytotoxicity in neonatally thymectomized mice. *Immunology* 50: 199-205.
- _____, K. MASATOSHI, Y. SHIMAMOTO, C. KUBO, AND K. NOMOTO. 1983. Differences in thymus dependency among the alloreactive T-cell subpopulations in their development: Graft-versus host reaction appears to be mediated by delayed type hypersensitivity of tuberculin type. *Cellular Immunology* 81: 403-412.
- LARRALDE, C., R. M. MONTOYA, E. SCIUTTO, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, AND E. COLTORTI. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 282-290.
- _____, E. SCIUTTO, J. GRUN, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, AND R. M. MONTOYA. 1988. Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*: Influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination. *In Cell function and disease*. L. E. Cancedo, L. E. Todd, L. Packer, and J. Jaz (eds.). Plenum Press, New York, p. 325-332.
- _____, J. SOTELO, R. M. MONTOYA, G. PALENCIA, A. PADILLA, T. GOVEZENSKY, M. L. DIAZ, AND E. SCIUTTO. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 926-928.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, AND R. J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- MOSSMANN, T. R., AND R. L. COFFMAN. 1987. Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation. *Immunology Today* 8: 223-227.
- SCIUTTO, E. 1990. Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacestodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. Ph.D. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México, 234 p.
- _____, G. FRAGOSO, M. L. DIAZ, F. VALDEZ, R. M. MONTOYA, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, AND C. LARRALDE. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
- _____, L. TRUEBA, D. LEMUS, R. M. MONTOYA, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, G. TAPIA, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine:

- Cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687-696.
- SCOTT, P. 1989. Minireview. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 68: 369-372.
- SHIMAMOTO, Y., K. TANIGUCHI, C. KUBO, AND K. NOMOTO. 1980. Differences in thymus-dependency among various T-cell functions. *Immunology* 41: 167-178.
- SILVA, J. S., P. J. MORRISSEY, K. H. GRABSTEIN, K. M. MOHLER, D. ANDERSON, AND S. G. REED. 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine* 175: 169-174.
- SJODIN, K., A. P. DALMASSO, J. M. SMITH, AND C. MARTINEZ. 1963. Thymectomy in newborn and adult mice. *Transplantation* 1: 521-525.
- SMITH, K. J., G. W. ESCH, AND R. E. KHUN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda): Aneuploidy in the anomalous ORF strain. *International Journal for Parasitology* 2: 262-263.
- STREET, N. E., AND T. R. MOSSMANN. 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB Journal* 5: 171-176.
- TURK, J. L., AND D. PARKER. 1982. Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunological Reviews* 65: 99-113.

I checked this proof and marked all changes or corrections I wish to be made. I sent proofs to Editor. I sent Reprint Order to Allen Press.

PLEASE FORWARD ILLUSTRATION
PHOTOPRINTS TO THE EDITOR
WITH YOUR PROOFS.

B - Parasitology - D ... 7564 ... Gal. 81

J. Parasitol., 80(6), 1994, p. 000-000
© American Society of Parasitologists 1994

PH: TERRAZAS ET AL.—IMMUNITY, ESTROGEN, AND CYSTICERCOSIS

Telephone 525 - 622-38-54

SEND PROOFS TO EDITOR.
REPRINT ORDER TO ALLEN PRESS.

A ROLE FOR 17- β -ESTRADIOL IN IMMUNOENDOCRINE REGULATION OF MURINE CYSTICERCOSIS (*TAENIA CRASSICEPS*)

Luis I. Terrazas, Rafael Bojalil, Tzipe Govezensky, and Carlos Larraide

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México, D.F. 04510

ABSTRACT: In experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*, parasite reproduction is favored by thymectomy or by orchidectomy, and restricted by ovariectomy. Hormonal reconstitution experiments showed that 17- β -estradiol increases parasite numbers whereas 5- α -dihydrotestosterone was ineffective. Parasite numbers decreased with increments in cellular immunity but were insensitive to antibody levels. A possible immunoenocrinological interaction involving estrogen as a depressor of cellular immunity is envisaged in the control of cysticercosis.

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962; Culbreth et al., 1972) is well known as a source of cross-reacting antigens useful in immunodiagnosis of human cestode diseases (Gottstein et al., 1986; Schantz et al., 1988; Larraide et al., 1990), as well as a practical model for testing candidate vaccines against porcine *Taenia solium* cysticercosis (Sciutto et al., 1990). It is also a manageable experimental system in which to explore the role of biological factors involved in host susceptibility. Thus, the relevance of sex and of the H-2 genes in mice susceptibility to *T. crassiceps* cysticercosis have been documented (Chermin, 1975; Sciutto et al., 1991) as has the value of cellular and humoral immune mechanisms in immunological resistance (Hermánck and Prokopic, 1989; Sciutto, 1989; Bojalil et al., 1993). Further, the striking differences in susceptibility between female and male mice possibly involve the joint action of the immune system and the gonads (as opposed to direct hormonal action) (Huerta et al., 1992).

Here we probe the possible immunoenocrinological interactions regulating parasite reproduction in the host by way of relating neonatal thymectomy, prepupal gonadectomy, and hormonal reconstitution by 17- β -estradiol (estrogen) and 5- α -dihydrotestosterone in infected male and female mice, with whole parasite counts, antibody response, and delayed-type hypersensitivity (DTH) response to the parasite's antigens. Results point to estrogen as a major protagonist in promoting cysticercus growth and

suggest it is mediated by interfering with the thymus-dependent cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth.

MATERIALS AND METHODS

The fast-growing ORF strain of *T. crassiceps* isolated by Freeman (1962) was used in all experiments. Since 1986 the parasites have been maintained in female BALB/c mice by sequential intraperitoneal inoculation of metacystodes (Freeman, 1962). Larvae for experimental infection were obtained from female donor mice infected 3-6 mo before.

BALB/c inbred mice of both sexes were used at different ages (newborn [48 hr] and 8 wk of age) according to each experimental protocol. They were all bred in our animal facilities by the "single-line breeding system" over 20 generations (Green, 1981), starting with original stock from Jackson Laboratories in 1982; they were fed Purina Diet 5015 ad libitum.

Neonatal thymectomy was performed upon mice of both sexes within 48 hr after birth, according to the method described by Sjödin et al. (1963). Thymectomized mice were used for experiments at 8 wk of age. After the final assessment of experimental responses all mice were examined to confirm (macroscopically and histologically) that they actually were free of thymus tissue. The results obtained in mice with thymic tissue remaining in the mediastinum were excluded from this study.

Gonadectomies were performed surgically under anesthesia with ether on 5-wk-old thymectomized and nonthymectomized mice of both sexes. They were then allowed a 3-wk recovery period before inoculation with parasites.

Ten small (approximately 2 mm diameter), non-budding *T. crassiceps* larvae were suspended in 0.3 ml phosphate-buffered saline (PBS, 0.15 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) and injected intraperitoneally into each mouse using a 0.25-gauge needle. Mice were killed 30 days after infection and all the cysts found inside the peritoneal cavity were counted.

In all mice, DTH was measured 28 days after infection by footpad injection of 100 μ g of vesicular fluid proteins in 30 μ l of sterile saline solution per mouse. Footpad swelling was measured 24 hr later with a dial-

TABLE I. Effects of thymus and gonads upon parasite intensity (no. of parasites/mouse), delayed-type hypersensitivity, and antibody level in experimental murine cysticercosis by *Taenia crassiceps*.

Treatment	Parasite intensity		Delayed-type hypersensitivity		Antibody level	
	Females	Males	Females	Males	Females	Males
Control	204 ± 92* (n = 8)	43 ± 21 (n = 10)	4.5 ± 2.2†	8.8 ± 2.2	0.65 ± 0.19‡	0.72 ± 0.08
Gonadectomized	119 ± 80 (n = 10)	125 ± 81 (n = 10)	7.3 ± 2.3	6.5 ± 2.3	0.63 ± 0.11	0.65 ± 0.10
Thymectomized	351 ± 99 (n = 12)	194 ± 163 (n = 8)	3.9 ± 1.7	1.1 ± 1.1	0.73 ± 0.19	0.75 ± 0.16
Thymectomized and gonadectomized	201 ± 157 (n = 8)	183 ± 71 (n = 7)	4.0 ± 2.4	3.0 ± 1.9	0.58 ± 0.16	0.73 ± 0.14

* Mean parasite intensity ± standard deviation.

† Mean % increase of foot-pad volume relative to contralateral control foot ± standard deviation.

‡ Mean optical density reading in ELISA assays for serum anti-cysticercus antibodies ± standard deviation.

thickness gauge (Mitotoyo, Japan); the original (before inoculation) footpad thickness was used as an internal control.

Vesicular fluid from *T. crassiceps* larvae was employed as the source of antigens for detection of anti-cysticercus antibody in the sera of mice by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), as described elsewhere (Larrañaga et al., 1989).

Gonadectomized mice of both sexes were hormonally reconstituted with their own major sex hormone or with the sex hormone of the opposite sex. The hormones used were estrogen (17β -estradiol) and the androgen 5- α -dihydrotestosterone. They were delivered in the form of subcutaneous 3-week controlled dose-dependent release rate pellets (Innovative Research of America, Toledo, Ohio). Doses of estrogen were 0.1 mg/pellet or 0.01 mg/pellet, whereas the only dose used of the androgen 5- α -dihydrotestosterone was a 0.5-mg/pellet. All mice had the pellet implanted 3 days before infection. This was done to assure an adequate hormonal environment in the hosts at the time when cysticerci were inoculated. Twenty-one days after the implantation of the hormone pellets, all mice received a second pellet of the same dose to maintain hormonal levels for another week. The biological hormonal function of pellets was confirmed by observation of the size of the uterus in gonadectomized females and the size of seminal vesicles in orchidectomized males.

Statistical analysis of parasite intensities with respect to treatment variables was performed by multifactorial analysis of variance (MANOVA) using $(n + 1)^{1/4}$ as a response variable, where n is the number of parasites in each individual mouse (Anonymous, 1985). The addition of unity to n was to eliminate occasional 0 values and the rooting to normalize distributions of parasite intensities. The DTH response and antibody levels were analyzed by a MANOVA using the original data (footpad thickness and optical density values, respectively) without transformation.

RESULTS

The notable differences in parasite intensities (no. of parasites/mouse) between control female and male mice are immediately appreciated in

Table I; 4.7 times greater ($P = 0.01$) parasite intensities were found in normal females (204 ± 92) than in normal males (43 ± 21). The DTH was significantly higher in males than in females ($P = 0.02$), whereas antibody response appeared to be equal in both sexes ($P > 0.5$).

Gonadectomy significantly reduced the parasite intensities of females by 41% relative to controls ($P < 0.01$), whereas it increased that of males in 190% ($P < 0.01$), bringing down the female/male intensity quotient from 4.7 to 0.9 (Table I). Gonadectomy in females increased the DTH by 62% ($P < 0.05$) and decreased it 26% in males although not significantly ($P = 0.9$). Whole antibody serum levels were not significantly affected ($P > 0.5$) by gonadectomy in either female or male mice (Table I).

Thymectomy increased parasitic intensities in females by 72% relative to controls ($P < 0.01$) and up to 351% ($P < 0.01$) that of males (Table I), reducing the female/male intensity quotient from 4.7 to 1.8 ($P > 0.05$). The DTH was significantly reduced by thymectomy in males 87% ($P < 0.01$) but only in 13% in females ($P = 0.09$), whereas the antibody response was not significantly modified in either sex.

In females that were both thymectomized and gonadectomized, the reducing effect of gonadectomy upon parasite intensity together with the increasing effect of thymectomy, countered each other to reach a net effect of only 1% reduction relative to control values ($P > 0.05$) (Table I). In males, however, the effects of gonadectomy and of thymectomy upon parasite intensity caused a net increase of 325% relative to controls ($P < 0.01$). As a consequence, the female/male intensity quotient in this group was reduced from 4.7

TABLE II. Effects of hormonal reconstitution upon parasite intensity (no. of parasites/mouse), delayed-type hypersensitivity, and antibody level in gonadectomized mice experimentally infected by *Taenia crassiceps*.

Treatment	Parasite intensity		Delayed-type hypersensitivity		Antibody level	
	Females	Males	Females	Males	Females	Males
Control	268 ± 85* (n = 10)	16 ± 22 (n = 10)	4.0 ± 2.2†	8.5 ± 2.6	0.86 ± 0.31‡	0.82 ± 0.32
Gonadectomized	119 ± 79 (n = 10)	72 ± 51 (n = 10)	4.4 ± 2.6	7.1 ± 3.4	0.83 ± 0.31	0.99 ± 0.24
17- β -estradiol (0.01 mg)	382 ± 269 (n = 6)	268 ± 236 (n = 7)	4.8 ± 2.5	4.84 ± 1.57	0.95 ± 0.18	0.80 ± 0.32
17- β -estradiol (0.1 mg)	466 ± 209 (n = 5)	319 ± 173 (n = 9)	1.78 ± 2.2	2.1 ± 2.2	1.17 ± 0.20	0.82 ± 0.21
5- α -dihydrotestosterone (0.5 mg)	152 ± 101 (n = 10)	67 ± 35 (n = 10)	2.71 ± 2.2	6.75 ± 2.0	0.93 ± 0.26	0.95 ± 0.24

* Mean parasite intensity \pm standard deviation.

† Mean % increase of foot-pad volume relative to contralateral \pm standard deviation.

‡ Mean optical density reading in ELISA assays for serum antileishman antibodies \pm standard deviation.

to 1.1. The DTH was significantly decreased 62% by gonadectomy and thymectomy in males ($P < 0.02$), whereas antibody response was not significantly modified in either sex (Table I).

Table II shows the results obtained in a different set of experiments designed to evaluate the effects of hormonal reconstitution upon the parasite intensity of gonadectomized mice. Here, again, the sex-associated differences in parasite intensities of normal control mice, now favoring females over males by a factor of 16, was observed. Likewise, the changes in parasite intensities brought about by gonadectomy alone was replicated as in Table I.

Hormonal reconstitution experiments met with the problem of large variation in parasite intensities within groups of reconstituted mice as compared to the other groups, i.e., the variation coefficient (mean/standard deviation) of control females was 3.1, whereas that in reconstituted females was equal to 1.4, 2.2, and 1.5. However, some solid inferences may be drawn from the data. Reconstitution with estrogen in both low and high doses brought about large and statistically significant ($P < 0.01$) increments in parasite intensities relative to gonadectomized mice, in both females (221 and 291%, $P < 0.01$) and males (272 and 343%, $P < 0.01$). In contrast, reconstitution with androgen seemed inconsequential for parasite intensities in both sexes ($P > 0.05$). The DTH was significantly decreased by reconstitution with 0.1 mg of estrogen as compared to control ($P < 0.01$) in gonadectomized mice of both sexes (females 59%, males 75%). The lower dose (0.01 mg) of estrogen had similar effects upon the DTH but only in males; females

were essentially unaffected. Reconstitution with androgen did not have a significant effect on the DTH of gonadectomized mice in either females (38% decrement) or males (4% decrement), although DTH reduction in females bordered on significance ($P = 0.08$). Antibody levels were not significantly altered by hormonal reconstitution in either sex or treatment combination, although the 40% increment noted in females reconstituted with the high dose of estrogen also bordered on being significant ($P > 0.07$). Figure 1 shows a statistically significant negative correlation be-

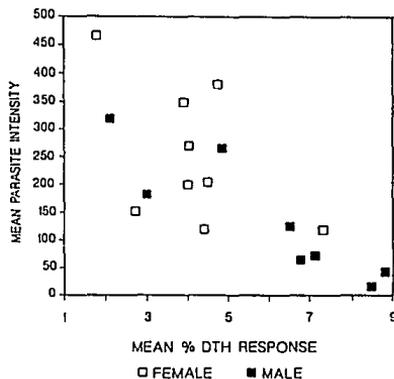


FIGURE 1. Negative linear correlation ($r^2 = 0.477$, $P < 0.01$) between mean parasite intensities (no. of parasites/mouse) and mean % delayed-type hypersensitivity (DTH) responses in male and female mice from all experiments.

tween average DTH response and average parasite intensity when considering all experimental groups ($r^2 = 0.477$, $P < 0.01$).

DISCUSSION

Reproduction of *T. crassiceps* (ORF strain) cysticerci in the peritoneal cavity of mice was shown to be under strong regulation by gonadal and thymic factors. The testis would seem to hinder parasite reproduction and the ovary to promote it, as gonadectomy greatly increased parasite intensities in the male hosts and caused a moderate decrease in the female hosts. The thymus restricts parasite growth since thymectomy increased parasite intensities in both sexes, albeit more intensely so in males than in females. Cellular immunity (in as much as it is measured by the DTH to the parasite antigens) would appear to be principally responsible for inhibiting parasite growth as documented by the negative correlation between parasite intensities and the DTH responses. In contrast, antibody response increased with parasite intensity. The effects of gonadectomy and thymectomy upon parasite intensity were not additive in mice that were both thymectomized and gonadectomized. This could be interpreted as indicating a maximal possible effect set by the parasite's biological limitations on reproduction. The absence of an additive effect could also reflect an interaction between the immune and endocrine systems, as additive effects would be expected in independent control systems.

The endocrinological and immunological factors affecting cysticercus reproduction may of course proceed independently, but the endocrine interactions between host and parasite (in both directions) are progressively being recognized in many animal species, including mammals (Lin et al., 1990). In the case of *T. crassiceps*, there are hints of a possible immunoendocrinological interaction, vis-à-vis the inhibiting effect of orchidectomy upon DTH, the somewhat lesser DTH responses of control female mice with respect to males, and the disappearance of sex-related differences in parasite intensities following thymectomy as well as after gonadectomy. Also suggestive are the reduction of parasite intensities in the gonadectomized females, accompanied by a statistically significant increase (62%) in the DTH and the increased parasite intensity of gonadectomized males concomitant with a 26% decrease in the DTH. At this point, the notion

would be that either the ovary depresses cellular immunity, or the testis stimulates it, or both.

The hormonal reconstitution experiments of gonadectomized female and male mice point to estrogen as an important protagonist in this gonad-thymus-cysticercus scheme. Reconstitution with estrogen resulted in increased parasite intensities in both gonadectomized female and male mice and simultaneously decreased the DTH without affecting antibody levels. In contrast, reconstitution with androgen proved ineffective for parasite intensity, DTH, and antibody synthesis in all mice. Thus, one is led to the conclusion that the relative resistance of males to parasite growth derives more from their normally low levels of parasite-permissive estrogen than from parasite-restrictive 5- α -dihydrotestosterone, whereas the high levels of estrogen in normal females would favor the reproduction of the cysticerci.

Thus, *T. crassiceps* cysticercosis is added to the growing list of sex-associated parasitic disease, e.g., murine *Taenia taeniaeformis* egg infection (Williams et al., 1982), trichinosis in rats (Luebke et al., 1984), toxoplasmosis (Pung and Luster, 1986), leishmaniasis (Mock and Nacy, 1988), murine malaria (Benten et al., 1992), and schistosomiasis (Eloi-Santos et al., 1992). However, murine *T. crassiceps* cysticercosis is unusual in that here it is the female that is the most susceptible gender, and antibodies appear not to be restrictive of parasite growth. These contrasts illustrate the complexity in the parasite-host regulatory network, each parasite applying different strategies for survival in different or similar hosts, and argue against oversimplification in the associations between gender, immunity, and susceptibility to disease.

Literature abounds with cases where estrogens are related to immunological components or influence immune events (Cohen et al., 1983; Hu et al., 1988; Gulsham, 1990; Schuurs and Verheul, 1990; Grossman, 1991). By locating the sites where receptors for estrogens have been found in the immunoregulatory network (Cox and Liew, 1992; Sher and Coffman, 1992), many effective actions of estrogen can be envisaged that would favor the parasite. A combination of estrogen-mediated events consistent with our results in *T. crassiceps* should depress TH₁ cell function (interleukin-2, tumor necrosis factor, and interferon-gamma production), while stimulating TH₂ cell function (antibody and interleukins 10 and 6 production).

Furthermore, such estrogen-mediated immune regulation could in turn be potentiated reactively by the products of immune stimulation, as some of the interleukins have effects on the synthetic pathway of sex hormones (Wayne et al., 1992). Interleukin-6, a metabolic product of TH₂ cells (Cox and Liew, 1992) has, in fact, a clear estrogenization effect (Gorospe et al., 1992) that could cycle back to further depress TH₁ cells and stimulate TH₂ cells and so on. Few other diseases involve, as dramatically as *T. crassiceps* does, sexual or other hormones in their strategy to cope with the host's immunological restrictions to establish, grow, and reproduce in their hosts. Finally, perhaps this extreme and somewhat artificial case of a parasitic disease contains a clue as to how one may reach, by the clever coupling of endocrinological and immunological maneuvers, a more effective control in the outcome of massive immune confrontations.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financed by Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (Project No. 207489). The authors thank Ms. Violeta Aguilar for post processing and Dr. Ciro Lomeli (head of animal facilities at our institute and member of the bioethical commission on humane use of laboratory animals) for supply and care of BALB/c mice and supervision of experimental procedures performed upon them. We also thank Dr. Burkhard Enders (Behringwerke, Germany) for supplying us with the ORF strain of *T. crassiceps*.

LITERATURE CITED

- ANONYMOUS. 1985. Introductory guide for personal computers. Version 6. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, 111 p.
- BENTEN, W., F. WUNDERLICH, AND H. MOSSMANN. 1992. *Plasmodium chabaudi*: Estradiol suppresses acquiring, but not once acquired immunity. *Experimental Parasitology* 75: 240-247.
- BOJALLI, R., L. I. TERRAZAS, T. GOVEZENSKY, E. SCIUTTO, AND C. LARRALDE. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 79: 384-389.
- CHERNIN, J. 1975. The growth of the metacystodes of *Taenia crassiceps* in white mice. *Journal of Helminthology* 40: 297-300.
- COHEN, J., L. DANIEL, G. CORDIER, S. SAEZ, AND J. P. REVILLARD. 1983. Sex steroid receptors in peripheral T cells: Absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. *Journal of Immunology* 131: 2767-2771.
- COX, F. E. G., AND F. Y. LIEW. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunology Today* 13: 445-448.
- CULBRETH, K. L., G. W. ESCH, AND R. E. KUHN. 1972. Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationships between larval biomass and the uptake and incorporation of C¹⁴-leucine. *Experimental Parasitology* 32: 272-281.
- ELOI-SANTOS, S., N. J. OLSEN, R. CORREA-OLVERA, AND D. G. COLLEY. 1992. *Schistosoma mansoni*: Mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Experimental Parasitology* 75: 168-175.
- FREEMAN, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969-990.
- GOROSPE, C. W., M. F. HUGHES, AND B. L. SPANGLIO. 1992. Interleukin 6: Effects on and production by rat granulosa cells *in vitro*. *Endocrinology* 130: 1750-1752.
- GOTTSTEIN, B., V. C. TSANG, AND P. M. SCHANTZ. 1986. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *T. solium* metacystode antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 308-313.
- GREEN, E. 1981. Breeding systems. In *The mouse in biomedical research*, H. Foster, D. Small, and J. Fox (eds.), Academic Press, New York, p. 91-107.
- GROSSMAN, C. 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 40: 649-659.
- GULSHAM, R. 1990. Oestrogen receptors in macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* 31: 691-697.
- HERMÁNEK, J., AND J. PROKOPIC. 1989. Influence of thymic preparations on the result of experimental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. *Folia Parasitologica* 36: 331-340.
- HU, S. K., Y. L. MITCHIO, AND N. C. ROTH. 1988. Effect of estrogen on IL-1 synthesis by macrophages. *International Journal of Immunopharmacology* 10: 247-252.
- HUERTA, L., L. I. TERRAZAS, E. SCIUTTO, AND C. LARRALDE. 1992. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacystodes. *Journal of Parasitology* 78: 471-476.
- LARRALDE, C., R. M. MONTOYA, E. SCIUTTO, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, AND E. COLTORTI. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 282-290.
- , J. SOTELO, R. M. MONTOYA, G. PALENCIA, A. PADILLA, T. GOVEZENSKY, M. L. DIAZ, AND E. SCIUTTO. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 926-928.

- LIN, Y. C., Y. RIKIHISA, H. KONO, AND Y. GU. 1990. Effects of larval tapeworm (*Taenia taeniiformis*) infection on reproductive functions in male and female host rats. *Experimental Parasitology* 70: 344-352.
- LUEBKE, R. W., M. I. LUSTER, J. H. DEAN, AND H. T. HAYES. 1984. Altered host resistance to *Trichinella spiralis* infection following subchronic exposure to diethylstilbestrol. *International Journal of Immunopharmacology* 6: 609-618.
- MOCK, B. A., AND C. A. NACY. 1988. Hormonal modulation of sex differences in resistance to *Leishmania major* systemic infections. *Infection and Immunity* 56: 3316-3319.
- PUNG, O., AND M. LUSTER. 1986. *Toxoplasma gondii*: Decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Experimental Parasitology* 61: 48-56.
- SCHANTZ, P. M., V. C. W. TSANG, AND S. E. MADDISON. 1988. Serodiagnosis of neurocysticercosis. *Review of Infectious Diseases* 10: 1231-1240.
- SCHUURS, A., AND H. VERHEUL. 1990. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *Journal of Steroid Biochemistry* 35: 157-172.
- SCIUTTO, E. 1989. Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. Ph.D. Thesis. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 234 p.
- _____, G. FRAGOSO, M. L. DÍAZ, F. VALDEZ, C. LOMELI, T. GOVEZENSKY, R. M. MONTOYA, AND C. LARRALDE. 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
- _____, L. TRUEBA, D. LEMUS, M. L. DÍAZ, R. M. MONTOYA, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687-696.
- SHER, A., AND R. L. COFFMAN. 1992. Regulation of immunity to parasitic by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Reviews of Immunology* 10: 385-409.
- SJODIN, K., A. P. DALMASO, J. M. SMITH, AND C. MARTINEZ. 1963. Thymectomy in newborn and adult mice. *Transplantation* 1: 521-525.
- WAYNE, A., J. CARDOSO, N. DACOSTA, K. BIOSHOV AND W. E. SAMLOWSKY. 1992. Direct and indirect effects of murine interleukin-2, gamma interferon, and tumor necrosis factor on testosterone synthesis in mouse Leydig cells. *Journal of Andrology* 13: 437-443.
- WILLIAMS, J. F., P. G. ENGELKIRK, AND M. C. LYNDYAS. 1982. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*, A. Flisser, K. Willms, J. P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltran (eds.). Academic Press, New York, p. 621-632.

See: der
(please)

:
See: OK as
not, please
punctuated

APÉNDICE B

REVISIÓN PUBLICADA

Respuesta inmune o tolerancia. La selección celular en el timo

*Rafael Bojalil

Resumen

Actualmente existe una investigación activa sobre los mecanismos que dan lugar a la selección celular en el timo. La selección tímica de células precursoras durante su desarrollo, es pieza clave del proceso de formación del repertorio de linfocitos T con que un organismo es potencialmente capaz de desarrollar una respuesta inmune en contra de un reto antigénico reconocido como ajeno, y a su vez potencialmente incapaz de hacerlo ante estímulos propios. Este trabajo busca reseñar avances recientes en el conocimiento del proceso por el cual se seleccionan positiva o negativamente las células que, a partir de una fuente muy amplia, finalmente forman el repertorio de células T de un individuo.

Palabras clave: Selección celular, Timo, Tolerancia, Respuesta inmune.

IMMUNE RESPONSE OR TOLERANCE, CELLULAR SELECTION BY THE THYMUS

Abstract

There is currently a very active research on the mechanisms that give rise to the cell selection of lymphocyte precursors by the thymus. This selection is basic for the process of formation of the repertoire of T cells with which an organism is potentially capable of developing an immune response to a foreign antigen, and not doing so when encountering its own antigens. This work pretends to detail some recent advances in the knowledge of the process by which cells are

positively or negatively selected by the thymus, to give rise to the T cell repertoire of an individual.

Keywords. Cell selection, Thymus, Tolerance, Immune response.

Introducción

Los linfocitos T tienen un papel fundamental en el sistema inmune, ya que poseen funciones tanto reguladoras como efectoras, modulan en gran proporción la respuesta de anticuerpos, y son además responsables de la llamada inmunidad celular. Una de las características de estos linfocitos es que, a diferencia de los B cuyos receptores de superficie (inmunoglobulinas) son capaces de reconocer antígenos solubles, sus receptores para antígeno sólo reconocen antígenos ajenos en la superficie de una célula presentadora, que los expone como un fragmento peptídico asociado a una proteína del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) (Fig. 1). Este fenómeno recibe el nombre de restricción por MHC, y da lugar a una paradoja: el mismo receptor del linfocito T debe reconocer moléculas propias, además de las ajenas, sin que este reconocimiento sea fuente de autoinmunidad.

El receptor para antígeno de los linfocitos T (TCR en la nomenclatura internacional por sus siglas en inglés) es un heterodímero que puede presentarse en dos formas: $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$. En este trabajo nos referiremos exclusivamente al TCR $\alpha\beta$, que es sobre el que más se ha estudiado la selección celular, y además se encuentra en la superficie del 95% de las células T. El TCR forma un complejo con otro antígeno de superficie, el CD3, que funciona como

* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM, México, D.F.

Dirección actual y solicitud de reimpresos: Rafael Bojalil Parra, Departamento de Inmunología, Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Tlalpan, 14080 México, D.F.

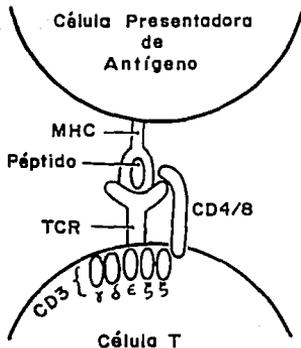


Figura 1. La célula que presenta al antígeno lo procesa y lo expone en forma de péptido asociado a una molécula del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). La célula T reconoce al péptido a través de su receptor para antígeno (TCR), que forma un complejo con las moléculas CD4 ó CD8 y CD3, que coadyuvan en el reconocimiento del MHC y en la transducción de señales transmembranales (Basada en referencias 1 y 60).

transductor de señales transmembranales (Fig. 1); se acompaña además de otros antígenos de superficie, entre los que se encuentran CD4 y CD8 (Fig. 1), que coadyuvan en el reconocimiento de la molécula del MHC y funcionan como correceptores en la transducción de las señales a través de la membrana.¹ Las células CD4⁺ están restringidas por moléculas clase II del MHC y a grandes rasgos constituyen el grupo de precursores inmediatos de los llamados linfocitos T ayudadores; las CD8⁺ están restringidas por moléculas clase I del MHC, y corresponden en general a precursores de células T citotóxicas.

Los linfocitos T se originan de células precursoras que proceden de tejido hematopoyético: migran al timo en donde tienen lugar procesos de selección y diferenciación de los que emergen sólo una pequeña proporción (alrededor del 10%). Esta selección, junto con la inducción periférica de tolerancia y la expansión clonal que se efectúa en los órganos linfoides periféricos, finalmente da lugar a lo que se ha llamado el repertorio de células T. El seguimiento del desarrollo de los linfocitos T se basa principalmente en el estudio de dos aspectos: 1) el rearrreglo y la expresión de los genes que codifican para el TCR, y 2) la expresión de CD4 y CD8.

Las células más inmaduras, que provienen de la médula ósea, se encuentran en la periferia de la

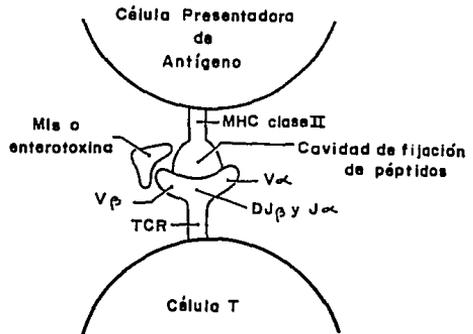


Figura 2. La región variable del receptor para antígeno del linfocito T (TCR) consta de segmentos V α y V β en la cadena α y V α y V β en la cadena β . Los antígenos menores estimuladores de linfocitos (MIs) o las enterotoxinas se asocian a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y a elementos V β específicos induciendo su selección positiva o su eliminación (Tomada de la referencia 60).

corteza del timo: expresan Thy-1 en bajas concentraciones, pero no TCR, y son CD4- CD8- (doble negativas).^{2,3} Durante las primeras fases del desarrollo, se dan los rearrreglos de los segmentos génicos que codifican para la región variable del TCR (V y J para la cadena α , y V, D y J para la cadena β) (Fig. 2), y éste se expresa en bajas concentraciones en la superficie celular, asociado a CD3 (Fig. 1). A la vez se expresan simultáneamente CD4 y CD8, también a bajas concentraciones, por lo que las células ahora son doble positivas. Posteriormente las células expresan CD4 y CD8 a mayor concentración.^{2,4} Hasta aquí, el repertorio generado por el rearrreglo aleatorio de todos los segmentos génicos, su unión imprecisa, la inserción de nucleótidos y la asociación de ambas cadenas es de entre 1×10^8 y 1×10^{15} posibles especificidades distintas que, por supuesto, incluyen la potencialidad de reaccionar con antígenos propios.^{4,7} Sin embargo, probablemente cuando las células se encuentran en esta fase de desarrollo, se da el proceso de selección de tal manera que se favorece la maduración sólo de aquellas capaces de reconocer MHC propio (selección positiva), pero se eliminan aquellas que además tienen un receptor autorreactivo y por lo tanto potencialmente dañino (selección negativa).^{4,5} Las células sobrevivientes adquieren funciones efectoras maduras, expresan una alta concentración de TCR y sólo CD4 o CD8 en su superficie, y emigran a tejido linfóide

periférico y a formar parte de los linfocitos circulantes.^{3,6,8}

La selección celular en el timo es, pues, pieza clave del proceso de formación del repertorio de células T con el que un organismo es capaz de desarrollar una respuesta inmune en contra de un reto antagónico, cualquiera que éste sea, y a su vez potencialmente incapaz de montar una respuesta ofensiva ante estímulos del propio organismo.

Selección positiva

TCR, MHC y moléculas accesorias en la selección positiva.

Como mencionamos antes, los timocitos que llegan a madurar sólo logran el reconocimiento de antígenos exógenos si estos se asocian a moléculas propias de MHC. Esto significa que durante el proceso de selección positiva deben cumplirse dos cosas: en primer lugar que el TCR de los timocitos ya se encuentre en la superficie celular, lo que efectivamente sucede;⁹ y en segundo lugar, que dicho receptor entre en contacto con moléculas del MHC propio de tal manera que se induzca la maduración sólo de aquellas células que sean capaces de reconocerlo. Esto se ha estudiado, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que expresan TCRs específicos, en los que se ha encontrado que la proporción de timocitos poseedores del TCR transgénico se eleva solo en los ratones con el MHC reconocido por el receptor transgénico.¹⁰ Esto se ha observado tanto para TCRs que se asocian a moléculas clase I¹¹⁻¹³ como para aquellos restringidos por moléculas clase II.¹⁴ En el mismo sentido, la administración de anticuerpos anti-clase II a ratones recién nacidos, inhibe específicamente la aparición de precursores de células T, en este caso CD4*.¹⁵

Para que se lleve a cabo la selección positiva, además del TCR también es necesaria la participación de las moléculas CD4 y CD8: la inyección de anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8 *in vivo* bloquea el desarrollo de las correspondientes poblaciones celulares maduras (CD4* y CD8* respectivamente).^{16,17} Esto probablemente se deba a que las moléculas accesorias son requeridas como coreceptores durante la selección celular.¹⁸

La utilización de ratones transgénicos ha ayudado también a concluir que la expresión de CD4 ó CD8 en la superficie de una célula madura depende de la

especificidad del TCR por moléculas del MHC: se expresa CD4 si el receptor reconoce moléculas clase II,¹⁴ y CD8 si reconoce clase I.¹¹

Células responsables de la selección positiva.

El estroma tímico está compuesto tanto por células derivadas de la médula ósea (células dendríticas y macrófagos tímicos) como por otro tipo de células, principalmente epiteliales, que expresan antígenos del MHC tanto clase I como clase II.

A pesar de que Longo y cols.¹⁹ propusieron que la selección positiva está mediada por células derivadas de la médula ósea, y de que recientemente se ha mostrado que efectivamente, aunque de manera ineficiente, células hematopoyéticas en el timo son capaces de seleccionar positivamente a linfocitos,²⁰ la explicación más aceptada es que la selección positiva es principalmente responsabilidad de las células epiteliales de la corteza del timo. Esto se sugirió originalmente para células T restringidas por antígenos clase II^{21,22} y clase I,²³ al obtener selección positiva exitosa transplantando timo normal o tratado de tal manera que se eliminaron las células dendríticas/macrófágicas. Más recientemente, en ratones transgénicos que expresan antígeno IE en distintas células del timo,⁸ se encontró que estas moléculas deben expresarse en las células epiteliales de la corteza tímica, para que se lleve a cabo la selección positiva. Otro grupo, al inyectar intratímicamente una línea de células epiteliales de timo, demostró selección positiva de los linfocitos que reconocieron como propio el MHC de dicha línea celular.²⁴

Autopéptidos en la selección positiva.

Como ya mencionamos antes, los linfocitos T que logran madurar, para activarse deben reconocer el MHC propio asociado siempre a un antígeno ajeno. Sin embargo, hasta donde se sabe, el proceso de selección positiva se da en ausencia de antígenos ajenos.

Existen resultados experimentales que sugieren que autopéptidos presentados en la concavidad de la molécula del MHC de células del epitelio tímico, podrán estar involucrados en la selección positiva del repertorio de T al interactuar con los receptores de los timocitos.^{25,29} El grupo de Marrack

ha propuesto que en el epitelio tímico el MHC podrá estar asociado a una colección de péptidos derivados de células de este mismo epitelio, que no se expresarán en ninguna otra célula del animal y que de alguna manera representarían el universo de los antígenos ajenos.²⁵ Se ha sugerido que estos péptidos podrán tener propiedades semejantes a MIs.²⁶

Los autores se basan en hallazgos como los que sugieren que las células T pueden distinguir entre moléculas de IE (MHC clase II) en distintos tipos celulares.^{27,28} Este fenómeno podría deberse a diferencias cuantitativas o cualitativas en la expresión de MHC entre distintas células. Aunque ambas diferencias no son mutuamente excluyentes, los autores favorecen la explicación de las diferencias cualitativas ya que no encontraron mayor densidad de proteínas del MHC en células epiteliales corticales del timo que en linfomas de B; postulan que es posible que el TCR estudiado reaccione específicamente con algún antígeno (asociado a la molécula de MHC) que se expone únicamente en ciertas células, o bien que los polipéptidos de IE se expresan de distinta manera en las diferentes células.^{27,28}

Selección negativa

La selección negativa o autotolerancia es el proceso que conduce a la marginación o a la eliminación del repertorio de linfocitos T, de aquellas células potencialmente autor reactivas. Que esta tolerancia ocurre durante el desarrollo intratímico, se demostró desde 1977³⁰ cuando se observó que las células T que maduran en cultivos de timo fetal reaccionan en mucho mayor medida a células estimulantes alogénicas que a las singénicas. Posteriormente se comprobó que la selección negativa al igual que la positiva, se da sólo en el contexto de la expresión tímica de antígenos del MHC.^{31,34}

Mecanismos para la selección negativa.

Se han propuesto tres posibles mecanismos que darán lugar a la autotolerancia: la supresión, la inactivación funcional, y la eliminación física de las clonas autorreactivas.⁶ Recientemente, con la utilización de anticuerpos monoclonales, se han obtenido resultados que dan gran relevancia a la última opción. Dichos anticuerpos reconocen y

permiten demostrar la presencia de determinados segmentos V de la cadena b del TCR (Fig. 2). Con ellos se ha encontrado que las cepas de ratón que expresan determinados antígenos propios (casi siempre del MHC), tienen muy pocas células periféricas o timocitos unipositivos que expresan el producto Vb con reactividad específica para el antígeno propio en cuestión. Por ejemplo, la cepa de ratones C57BR es IE (MHC clase II) y tiene un segmento génico VB17 a funcional, pero no tiene células T periféricas que expresen en sus TCR el producto de dicho segmento génico, que le da al linfocito una alta probabilidad de reactividad con la molécula IE.³⁵ También se ha encontrado que la coexpresión de otros antígenos propios (como el MISA) con productos del MHC induce la eliminación de una gran proporción de células con ciertos segmentos VB.^{25,36} De esta manera, la tolerancia correlaciona con la ausencia de expresión de ciertos segmentos VB en los TCR de los linfocitos T periféricos.

Cabe destacar sin embargo, que la tolerancia no necesariamente requiere de la eliminación de todas las células que expresan un TCR autoespecífico. Teh y cols.³⁷ encuentran que en ratones machos transgénicos son eliminadas la mayoría de las células T CD4⁺8⁺ y CD48⁺ que expresan el TCR transgénico. Sin embargo, las células CD4⁺ con baja expresión de CD8 y altos niveles del TCR transgénico no son eliminadas. Es decir que, al igual que en la selección positiva, es posible que las moléculas CD4 y CD8 funcionen como correceptores y que incluso se requieran para aumentar la afinidad de la interacción. De esta manera, en algunos casos, sólo en su presencia se eliminarán clonas de células autorreactivas.¹⁸

Células responsables de la tolerancia.

Para demostrar qué células son las responsables de la selección negativa en el timo se han utilizado diferentes métodos⁶ que incluyen: a) la irradiación de animales para eliminar a las células derivadas de médula ósea, y su reconstitución con células alogénicas o semialogénicas, lo que resulta en un estroma tímico con células epiteliales del receptor y células derivadas de la médula ósea provenientes del donador; b) trasplantes de lóbulos tímicos; y c) el estudio de ratones transgénicos. Con todos ellos, los resultados indican que se crea tolerancia a los antígenos del MHC (tanto clase I como clase II)

expresados principalmente en las células derivadas de la médula ósea. Aunque esto es lo más frecuente, cabe destacar que también las células del epitelio medular del timo^{28,39} y subpoblaciones de linfocitos B^{40,41} son capaces de inducir tolerancia.

Super antígenos en la selección negativa.

Uno de los mecanismos propuestos de inducción de tolerancia es la eliminación de células T debido a la presencia de antígenos propios.^{26,42} En este caso, la eliminación de células autorreactivas dependerá no solo de la expresión de antígenos del MHC, sino también de un conjunto de productos génicos codificados fuera del MHC. Estos productos, también denominados cotolerógenos, incluyen a los antígenos del MIS que por ejemplo, eliminan prácticamente todas las células T VB3* (si el animal es Mls-2a)⁴² o a las VB8.1+²⁶ y VB6³⁸ si es Mls-la+. Se ha implicado también a otros antígenos como el Mtv-9 (provirus endógeno relacionado con el tumor mamario del ratón) que elimina a las células VB5.2+.⁴³

Es posible que también posean un papel importante superantígenos ajenos como la enterotoxina B del estafilococo (44)(Fig. 2), que administrada a ratones neonatos, elimina a todas las células maduras medulares y a algunas inmaduras corticales con TCR VB3+, VB8.1+, VB8.2+, VB8.3+ y otros. Esto implica que podría provocar tolerancia a antígenos exógenos, a través de la eliminación intratímica de células T reactivas.

Se ha sugerido que la inducción de tolerancia por eliminación de células T debido a super antígenos propios podría ser el mecanismo más difundido de de determinados VBs.⁴⁴ Estos antígenos al eliminar a todas las células con TCRs que expresan componentes específicos, podrían eliminar a algunas que de otra manera escaparían a la inducción de tolerancia (p. ej. antígenos menores como la proteína básica de mielina o la colágena). Las amplias posibilidades de reacción de los super antígenos podría hacer suponer que, de ser prevalentes entre las moléculas propias o ajenas, pocas células sobrevivirían al proceso de autotolerancia y se podría perder capacidad de respuesta de las células T, ya que incluso pueden provocar la eliminación de hasta un tercio del repertorio de dichas células de ratón.⁴⁵ Sin embargo, el que por su potencialidad autorreactiva se elimine una gran cantidad de TCRs específicos para

antígenos ajenos, no necesariamente resulta en un «punto ciego» en el repertorio de T, en la medida en que puedan utilizarse genes alternativos cuyos productos no tengan reactividad cruzada con autoantígenos. Es decir, el proceso de inducción de autotolerancia parece alterar el repertorio de genes de TCR utilizados en respuesta a antígenos ajenos, sin necesariamente alterar la capacidad inmune del individuo.⁴⁵

Lugar de la selección celular

Los linfocitos tímicos maduran durante su migración de la región cortical a la medular, de manera que los linfocitos corticales son principalmente CD48 en tanto los medulares son CD4+8- o CD4+8+. Ahora se sabe que es durante este período de maduración que se dan tanto la selección positiva como la negativa. Hengartner y cols.⁴⁶ a través de análisis inmuno-histoquímicos y citofluorométricos, muestran que tanto en ratones Mls^a como en ratones Mls existe en la corteza tímica una gran cantidad de células T que expresan V-6, pero en los animales Mls^a no entran a la médula del timo. Los autores indican que la demostración directa de que ciertos linfocitos T no existen en la médula tímica, pero se encuentran a niveles normales en la corteza, es consistente con la hipótesis de que la eliminación se da en la unión córtico-medular. Estos datos también podrían indicar que existen diversos sitios dentro de la corteza en donde se da la eliminación de las células autorreactivas. Sin embargo, la unión córtico-medular es rica en células dendríticas, que son las células a las que se ha atribuido la inducción de tolerancia.

Momento del desarrollo en que se da la selección celular

El resultado de la selección positiva se hace evidente solo en etapas tardías de la maduración (en células que ya expresan únicamente CD4 ó CD8),⁹ lo que probablemente signifique que la señal para la selección positiva se da en el momento en que las células corticales doble positivas se diferencian a CD4+ o CD8+, o que aún dándose en etapas mas tempranas, solo se manifiesta hasta ese momento, como consecuencia de que la selección positiva evitaría la hipotética muerte programada de estas células que, de otra manera,

correrían la misma suerte que la mayoría de los timocitos.²⁷

Es decir, la selección positiva rescataría a ciertas células de uno de los mecanismos más importantes de la falta de selección y de la selección negativa: la inducción de apoptosis.^{7,35,36} La señal para la selección negativa parece tener lugar en un punto de transición entre timocitos inmaduros (con baja expresión de TCR) y timocitos maduros (con alta expresión de TCR). Diversos hallazgos muestran que la eliminación se ejerce sobre las células CD4+8+ y refuerzan las sugerencias previas^{18,49} de que éstas son precursoras de las unipositivas. Así por ejemplo, con la utilización de anticuerpos monoclonales se observó que el segmento V-17a se expresa en una proporción significativa de timocitos doble positivos de la cepa C57BR, pero está totalmente ausente de la población de timocitos unipositivos.³² Las células que se eliminan en esta cepa de ratones no solo son las CD4+, sino también las CD8+ que expresan el segmento V-17a (a pesar de que su especificidad es a clase II y por lo tanto está restringida a CD4+). De manera similar, los ratones poseedores del antígeno Mls^a, eliminan a las células CD4 VB6 (36) y VB8.1 (50) pero también eliminan a las células CD8, a pesar de que la reacción con el Mls^a es específica de células T CD4. Asimismo, la administración neonatal de anticuerpos monoclonales anti-CD4 evita no sólo la eliminación de las células CD4 VB6 en los ratones Mls^a, sino también la de las células CD8+ VB6+.¹⁵

Y aunque la señal para la inducción de muerte programada se da en etapas tempranas del desarrollo, es posible que sólo se manifieste hasta etapas posteriores. Así, se ha descrito que el timo neonatal contiene una población importante de células CD4+, fenotípicamente maduras, con TCRs potencialmente autorreactivos (en este caso VB6+), que cuando se ponen en cultivo, muere selectivamente una gran proporción de ellas (alrededor del 60%). En este caso, la timectomía neonatal no aumenta la proporción de células que sobreviven, lo que indica que las que mueren ya estaban programadas para ello.⁵¹

Hipótesis en torno al proceso de selección celular

Se han elaborado diversas hipótesis que buscan explicar los mecanismos por los que las células son seleccionadas positivamente o eliminadas del

repertorio. De ellas pueden identificarse claramente dos principales:

1. Que la selección se dar, en función de la afinidad del TCR por los antígenos del MHC. Así, se seleccionarán positivamente todas aquellas células con TCR que reconociera el MHC de las células epiteliales del timo, y la célula sería estimulada a expandirse o salvada de la muerte programada. Un segundo paso en la selección eliminaría a aquellas células con alta o mediana afinidad por el MHC tímico, sobreviviendo sólo las de receptores de baja afinidad para el mismo.^{6,28} Una propuesta más elaborada sugiere que, en procesos independientes, una señal débil (reconocimiento solo de moléculas de MHC) daría lugar a la selección positiva, y una fuerte (MHC más autoantígeno) a la negativa.^{7,52} En este caso, la ausencia de señal (MHC incorrecto) también induciría muerte celular. Trabajos recientes⁵³ apoyan fuertemente esta hipótesis.
2. Que la selección celular dependería de las células encargadas de efectuarla: las señales transmitidas por las células epiteliales (responsables de la selección positiva) serían distintas a las enviadas por las derivadas de la médula ósea (responsables de la selección negativa). Esto podría deberse a cambios en las moléculas del MHC expresadas (27, 28) o a que a sin ser distintas, las proteínas del MHC del epitelio tímico se asociarían con una serie de péptidos, únicamente expresados en esas células, que semejarían al universo de antígenos ajenos potenciales, y las células derivadas de la médula ósea expondrían a su vez una serie de péptidos eliminantes diferentes de los del epitelio tímico.^{25,27,29,44} Así, tanto la selección positiva como la negativa se darían por interacciones del TCR con el MHC más antígenos propios. Como datos en contra de esta hipótesis, cabe recordar que tanto las células epiteliales tímicas son, en determinadas circunstancias, capaces de eliminar clonas,^{38,39} como las derivadas de la médula ósea capaces de seleccionarlas positivamente.^{19,20}

Además de las dos hipótesis destacadas previamente, existen otras explicaciones complementarias, algunas de las cuales describimos a continuación:

- A. Que la selección positiva o la negativa se darían dependiendo de la densidad de complejos

MHC-autopéptidos.^{2,32} Esta hipótesis propone que la densidad de complejos MHC-autopéptidos necesarios para la selección positiva es menor que la que se requiere para la selección negativa o para la activación de los linfocitos periféricos. De esta manera, sólo aquellos autopéptidos que se encuentran en concentraciones suficientemente altas inducirían eliminación física o anergia clonal. Los demás autopéptidos unidos al MHC de las células epiteliales corticales no alcanzarían concentraciones suficientes para inducir eliminación o anergia, pero tampoco para estimular la activación de las células periféricas, por lo que serían seleccionadas positivamente. El repertorio así formado sería inocuo en condiciones fisiológicas.²

- B. Que la selección dependería del estado de desarrollo de los timocitos (54-56). Es decir que, durante el desarrollo de las células T, diferencias en el estado de asociación del TCR al CD3 generarían señales intracelulares distintas al ocuparse el receptor (ver Fig. 1). Así, los autores definen tres fases del complejo TCR-CD3:^{55,56} a) En aproximadamente la mitad de los timocitos inmaduros, la fijación del ligando al TCR no induce movilización de Ca^{2+} y no provoca la muerte celular (selección positiva), probablemente por una disociación funcional entre el TCR y el CD3 (54, 56), o por una alteración de este último;⁵⁷ b) En la otra mitad de los timocitos inmaduros, la fijación del ligando se induce la movilización de Ca^{2+} , y lleva a una rápida eliminación de la célula (selección negativa), c) En las timocitos maduros, la ocupación del TCR conduce a su activación. En estos casos también hay movilización de Ca^{2+} , aunque se acompaña de activación de la proteína cinasa C (PKC). Esto es importante ya que la muerte celular inducida a través del CD3 es por apoptosis, que es un fenómeno dependiente de un aumento temprano y sostenido de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Sin embargo, es posible que en las células maduras la activación de la PKC evite la apoptosis, a pesar de la movilización de Ca^{2+} .⁵⁸

Aunque todavía falta desentrañar por completo los mecanismos a través de los que se seleccionan los linfocitos T que finalmente forman el repertorio de un individuo, es de esperarse que un entendimiento más completo de este proceso

pueda contribuir en un futuro próximo a una mejor comprensión y manejo de diversos procesos patológicos entre los que destaca la autoinmunidad. De hecho, ya existen distintos grupos que estudian el repertorio de TCR, tanto en circulación como en tejidos dañados, de pacientes con diversas patologías, autoinmunes.⁵⁹ Estudios de este tipo podrían también influir en el manejo de los problemas presentados, por ejemplo, por el trasplante de órganos.

Glosario

Antígenos menores estimuladores de linfocitos (MIs, por sus siglas en inglés). En ratón se han descrito estos antígenos que pueden inducir reacciones entre linfocitos y que se encuentran fuera del MHC. Están codificados en diversos loci con dos alelos cada uno, de los cuales uno es estimulador en reacciones mixtas de linfocitos, y el otro no lo es. Al primer alelo se le ha llamado haplotipo a y al nulo o que no estimula, haplotipo b. A cada locus génico se le ha asignado un número arábigo, por lo que una cepa de ratones puede ser por ejemplo MIs-la o MIs-lb (60).

Apoptosis. Muerte celular programada, en oposición a necrosis o muerte accidental. Se caracteriza por disminución del tamaño celular, colapso nuclear, y ruptura de la cromatina a fragmentos nucleosómicos.⁶¹

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Es un conjunto de genes que se encuentra en el cromosoma 6 del humano y en el 17 del ratón. Juega un papel importante en la inmunidad: codifica para antígenos de histocompatibilidad (o de reconocimiento intercelular) y participa en la regulación de la respuesta inmune. Codifica entre otras cosas para las llamadas moléculas clase I y clase II. Las moléculas clase I se expresan en casi todas las células, y son altamente polimórficas. Se han descrito loci que las codifican: HLA-A, HLA-B y HLA-C en el humano, y H-2K, H-2D y H-2L en el ratón. Las moléculas clase II se expresan principalmente en las células del sistema inmune (linfocitos B, macrófagos, células de Langherhans, células dendríticas, epitelio tímico y linfocitos T activados). En el humano se han descrito tres loci: DP, DQ y DR; en el ratón dos: I-A e I-E.⁶²

Superantígenos. E C son un conjunto de antígenos proteicos que al asociarse con determinados productos del MHC crean ligandos



que se unen con prácticamente todos los TCR que tienen ciertos elementos V, (ver Fig. 2).⁶³

Transgénicos. En ratones se refiere a aquéllos a los que se introducen genes ya refregados a su línea germinal. La introducción de genes de un TCR con especificidad conocida para MHC y para antígeno, inhibe el rearreglo de los genes endógenos de TCR debido al fenómeno llamado exclusión alélica, de manera que una gran proporción de timocitos expresa exclusivamente el TCR transgénico.⁷

Agradecimientos

Mis agradecimientos al Dr. Carlos Larraide por el apoyo y las facilidades prestadas para elaborar este documento durante mis estudios doctorales en su laboratorio; y al Dr. Pedro A. Reyes L. por la lectura crítica del trabajo.

Referencias

- Janeway CA. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 645-74.
- Nicolic-Zugic J. Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of at T cells. *Immunol Today* 1991; 12: 65-70.
- Ikuta K, Uchida N, Friedman J, Weissman IL. Lymphocyte development from stem cells. *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 759-83.
- Marrack P, Kappler J. The T-cell repertoire for antigen and MHC. *Immunol Today* 1988; 9: 308-15.
- Schwartz RH. Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell* 1989; 57: 1073-81.
- Fowlkes BJ, Pardoll DM. Molecular and cellular events of T cell development. *Adv Immunol* 1989; 44: 207-64.
- Pardoll D, Carrera A. Thymic selection. *Curr opin Immunol* 1992; 4: 162-5.
- Benoist C, Mathis D. Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* 1989; 58: 1027-33.
- Richie ER, McEntire B, Crispe N, Kimura J, Lanier LL, Allison JP. α/β T-cell antigen receptor gene and protein expression occurs at early stages of thymocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1174-8.
- Kisielow P, Teh HS, Bluthman H, von Boehmer H. Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 1988; 335: 730-3.
- Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y, Bluthmann H, et al. Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988; 335:229-33.
- Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocyte in transgenic mice. *Nature* 1988; 335: 271-4.
- Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 1988; 336:73-6.
- Berg LJ, Pullen AM, Fazekas de Groth B, Mathis D, Benoist C, Davis MM. Antigen/MHC-specific T cells are preferentially exported from the thymus in the presence of their MHC ligand. *Cell* 1989; 58:1035-46.
- Marrack P, Kushnir E, Born W, McDuffie M, Kappler J. The development of helper T cell precursors in mouse thymus. *J Immunol* 1988; 140:2508-14.
- MacDonald HR, Hengartner H, Pedrazzini T. Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. *Nature* 1988; 335:174-6.
- Ramsdell F, Fowlkes BJ. Engagement of CD4 and CD8 accessory molecules is required for T cell maturation. *J Immunol* 1989; 143:1467-71.
- Wallace VA, Penninger J, Mak TW. CD4, CD8 and tyrosine kinases in thymic selection. *Curr opin Immunol* 1993; 5:235-40.
- Longo DL, Kruisbeek AM, Davis ML, Matis LA. Bone marrow-derived thymic antigen-presenting cells determine self-recognition of Ia-restricted T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:5900-4.
- Bix M, Raulat D. Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells. *Nature* 1992; 359:330-2.
- Zinkernagel RM. Selection of restriction specificities of virus-specific cytotoxic T cells in the thymus: no evidence for a crucial role of antigen-presenting cells. *J Exp Med* 1982; 156:1842-7.
- Lo D, Sprent J. Identity of cells that imprint H-2 restricted T cell specificity in the thymus. *Nature* 1986; 319:672-5.
- von Boehmer H, Karjalainen K, Pelkonen J, Borgulya P, Rammensee HG. The T-cell receptor for antigen in T-cell development and repertoire selection. *Immunol Rev* 1988; 101:21-37.
- Vukmanovic S, Grandea AG, Faas SJ, Knowles BB, Bevan MJ. Positive selection of T lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line. *Nature* 1992; 359:729-31.
- Marrack P, Lo D, Brinster R, Palmer R, Burkly R, Flavell RH, et al. The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell* 1988; 53:627-34.
- Kappler JW, Staerz U, White J, Marrack P. Self tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex. *Nature* 1988; 332:35-40.
- Marrack P, Kappler J. T cells can distinguish between allogeenic major-histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 1988; 332:840-3.
- Marrack P, McCormack J, Kappler J. Presentation of antigen, foreign major histocompatibility complex proteins and self by thymus cortical epithelium. *Nature* 1989; 338:503-5.
- Nicolic-Zugic J, Bevan MJ. Role of self-peptides in positively selecting the T-cell repertoire. *Nature* 1990; 344:65-7.
- Robinson JH, Owen JTT. Generation of T-cell function in organ culture of foetal mouse thymus. II. Mixed lymphocyte culture reactivity. *Clin Exp Immunol* 1977; 27:322-7.
- Dos Reis GA, Shevach EM. Antigen-presenting cells from nonresponder strain 2 guinea pigs are fully competent to present bovine insulin B chain to responder strain 13 T cells. Evidence against a determinant selection model and in favor of a clonal deletion model of immune response gene function. *J Exp Med* 1983; 157:1287-99.
- Groves ES, Singer A. Role of the H-2 complex in the induction of T cell tolerance to self minor histocompatibility antigens. *J Exp Med* 1983; 158:1483-97.
- Rammensee HG, Bevan MJ. Evidence from *in vitro* studies that tolerance to self antigens is MHC-restricted. *Nature* 1984; 308:741-4.
- Matzinger P, Zamoyska R, Waldman H. Self-tolerance is H-2 restricted. *Nature* 1984; 308:738-41.
- Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987; 49:273-80.

36. MacDonald HR, Schneider R, Lees RK, Howe RC, Acha-orbea H, Festenstein H, et al. T-cell receptor VB₈ use predicts reactivity and tolerance to Mls_a-encoded antigens. *Nature* 1988; 332:40-5.
37. Teh HS, Kishi H, Scott B, von Boehmer H. Deletion of autospesific T cells in T cell receptor (TCR) transgenic mice spares cells with normal TCR levels and low levels of CDB molecules. *J Exp Med* 1989; 169:795-806.
38. Schonrich G, Mornburg F, Hammerling GJ, Arnold B. Anergy induced by thymic medullary epithelium. *Eur J Immunol* 1992; 22:1687-91.
39. Hoffmann MW, Allison J, Miller JFAP. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:2526-30.
40. Mazda o, Watanabe Y, Gytokto JJ, Katsura Y. Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls reactive T cells in the thymus. *J Exp Med* 1991; 173:5394-8.
41. Inaba M, Inaba K, Hosono M, Kumamoto T, Ishida T, Muramatsu S, et al. Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J Exp Med* 1991; 173:549-59.
42. Pullen AM, Marrack P, and Kappler JW. Evidence that Mls-2 antigens which delete VB3 T cells are controlled by multiple genes. *J Immunol* 1989; 142:3033-7.
43. Woodland D, Happ MP, Bill J, Palmer E. Requirement for cotolerogenic gene products in the clonal deletion of I-E reactive T cells. *Science* 1990; 247:964-7.
44. White J, Herman A, Pullen AM, Kubo R, Kappler JW, Marrack P. The VB₈-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* 1989; 56:27-35.
45. Frangoulis B, Pla M, Ramensee HC. Alternative T cell receptor gene usage induced by self-tolerance. *Eur J Immunol* 1989; 19:553-5.
46. Hengartner H, odgrematt B, Schneider R, Schreyer M, Walle G, MacDonald HR, et al. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature* 1988; 336:388-90.
47. von Boehmer H. The selection of the B heterodimeric T-cell receptor for antigen. *Immunol Today* 1986; 7:333-6.
48. Smith L. CD4 murine T cells develop from CDB precursors in vivo. *Nature* 1987; 326:798-800.
49. Carbone AM, Marrack P, Kappler JW. Demethylated CDB gene in CD4+ T cells suggests that CD4 cells develop from CDB+ precursors. *Science* 1988; 242:1174-6.
50. Pircher H, Mak TW, Lang R, Ballhausen W, Ruedi E, Hengartner H, et al. T cell tolerance to Mls_a encoded antigens in T cell receptor VB8.1 chain transgenic mice. *EMBO J* 1989; 8:719-27.
51. MacDonald HR, Lees RK. Programmed death of autoreactive thymocytes. *Nature* 1990; 343:642-4.
52. Sprent J, Lo D, Gao EK, Ron Y. T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 1988; 101:173-90.
53. Kruisbeek AM. Development of aB T cells. *Curr opin Immunol* 1993; 5:227-34.
54. Finkel TH, Marrack P, Kappler JW, Kubo RT, Cambier JC. aBT cell receptor and CD3 transduce different signals in immature T cells. Implications for selection and tolerance. *J Immunol* 1989; 142:3006-12.
55. Finkel TH, Cambier JC, Kubo RT, Born WK, Marrack P, Kappler JW. The thymus has two functionally distinct populations of immature aB+ T cells: one population is deleted by ligation of aBT_{CR}. *Cell* 1989; 58:1047-54.
56. Finkel TH, Kubo RT, Cambier JC. T-cell development and transmembrane signaling: changing biological responses through an unchanging receptor. *Immunol Today* 1991; 12:79-85.
57. Mercep M, Weissman AM, Frank SJ, Klausner RD, Ashwell JD. Activation-driven programmed cell death and T cell receptor zeta-teta expression. *Science* 1989; 246:1162-5.
58. McConkey DJ, Hartzell P, Amador-Pérez JF, orrenius S, Jondal M. Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J Immunol* 1989; 143:1801-6.
59. Zouali M, Kalsi J, Isenberg D. Autoimmune diseases at the molecular level. *Immunol Today* 1993; 14:473-6.
60. Acha-orbea H, Palmer E. Mls_a retrovirus exploits the immune system. *Immunol Today* 1991; 12:356-61.
61. Cohen JJ, Duke RC. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:267-93.
62. Paul WE. The immune system: an introduction. En: Paul WE. *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, 1989: 3-19.
63. Herman A, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:745-72.