

11281



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
ENTIDAD: INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR**

10

**ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD MITOGENICA DE UN  
FACTOR DE METACESTODO DE *Taenia solium* Y DE SU  
EFECTO SOBRE LA PRODUCCION DE INTERLEU-  
CINAS EN LINFOCITOS T HUMANO Y MURINOS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**P R E S E N T A:**

**ESPERANZA LUISA GARRIDO GONZALEZ**

**TUTOR: DR. JOSE LUIS MOLINARI SORIANO**

**MEXICO, D. F.**

**2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio del Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular, bajo el asesoramiento y dirección del Dr. José Luis Molinari Soriano. El comité tutorial estuvo formado por los doctores: José Luis Molinari Soriano, Ruy Pérez Montfort y Alejandro Zentella Dehesa.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México) 26372-M. Una beca para estudios de posgrado fue otorgada por Consejo Nacional para la Investigación Científica y Tecnológica (CONICIT)-Venezuela y beca de la Dirección General de Estudios de Posgrados de la UNAM.

# ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
TITULO DEL TRABAJO	i
TUTOR	iii
COMITÉ TUTORAL.	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I.-INTRODUCCIÓN	3
I.1.CISTICERCOSIS POR <i>TAENIA SOLIUM</i>	3
I.1.1.MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA	3
I.1.2.EPIDEMIOLOGÍA	6
I.1.3.PATOGÉNIA, MANIFESTACIONES CLÍNICAS	7
I.2.RESPUESTA TH1/TH2	8
I.3.MOLÉCULAS DE HELMINTOS PARÁSITOS QUE REGULAN LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR	11
I.4.FACTOR DE METACÉSTODOS	14
II.HIPÓTESIS	16
III.OBJETIVOS	17
III.1.OBJETIVO GENERAL	17
III.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
IV.METODOLOGÍA	18
IV.1.OBTENCIÓN DE FACTOR DE METACÉSTODO (FM) A PARTIR DE METACÉSTODOS DE <i>TAENIA SOLIUM</i>	18
IV.2.DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS	19
IV.3. DETERMINACIÓN DE RIBOSA	19
IV.4.DIGESTIÓN DEL FACTOR DE METACÉSTODOS CON RIBONUCLEASA A (FMD)	20
IV.5.CROMATOGRAFÍA DEL FM EN COLUMNAS DE BIO-GEL P	21

<b>IV.6. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS MURINOS</b>	<b>22</b>
<b>IV.7. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA</b>	<b>22</b>
<b>IV.8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA</b>	<b>23</b>
<b>IV.9. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO</b>	<b>24</b>
<b>IV.9.1. REACTIVOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES</b>	<b>24</b>
<b>IV.9.2. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE LINFOCITOS T</b>	<b>25</b>
<b>IV.9.3. DETERMINACIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES</b>	<b>25</b>
<b>IV.10. TRATAMIENTO DE RATONES CON FACTOR DE METACÉSTODO DIGERIDO O F2</b>	<b>27</b>
<b>IV.10.1. DETERMINACIÓN DE CD69 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES TRATADOS CON FMD</b>	<b>28</b>
<b>IV.11. EFECTO DEL FMD EN RATONES DISMINUÍDOS DE LINFOCITOS CD4</b>	<b>28</b>
<b>IV.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>29</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>V.1. CROMATOGRAFÍA DEL FM CRUDO Y DEL FM DIGERIDO</b>	<b>31</b>
<b>V.1.1. CROMATOGRAFÍA EN BIO-GEL P-6</b>	<b>31</b>
<b>V.1.2. CROMATOGRAFÍA POR BIO-GEL P-2</b>	<b>31</b>
<b>V.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DEL FMD Y F2</b>	<b>32</b>
<b>V.2.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA</b>	<b>32</b>
<b>V.2.2. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS T MURINOS</b>	<b>38</b>
<b>V.2. 3. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES</b>	<b>38</b>
<b>V 3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA <i>EX VIVO</i> DEL FMD Y F2</b>	<b>46</b>
<b>V.3.1. EXPRESIÓN DE CD25 Y CITOCINAS EN LINFOCITOS DE RATONES TRATADOS CON EL FMD Y F 2</b>	<b>46</b>
<b>V.3.2. EXPRESIÓN DE CD69 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS RATONES TRATADOS CON EL FMD</b>	<b>52</b>

<b>V.3.3. TRATAMIENTO CON EL FMD EN RATONES DISMINUÍDOS DE CÉLULAS T CD4</b>	<b>52</b>
<b>V.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FMD EN LINFOCITOS HUMANOS.</b>	<b>55</b>
<b>V.4.1. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS T HUMANOS</b>	<b>55</b>
<b>V.4.2. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES EN LINFOCITOS HUMANOS</b>	<b>61</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>62</b>
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	<b>69</b>
<b>IX. INDICE DE FIGURAS</b>	<b>79</b>
<b>X. ANEXOS</b>	<b>80</b>

## RESUMEN

Un factor obtenido a partir de metacéstodos de *Taenia solium* y digerido con ribonucleasas (FMd), induce proliferación de linfocitos humanos y murinos *in vitro*. Este efecto fue evaluado a través de la activación y proliferación celular, inducida con Concanavalina A (Con-A) en células esplénicas de ratón normal o en células esplénicas de ratón tratado con FMd o F2. Se llevaron a cabo análisis de citometría de flujo para determinar la expresión de receptores CD4/CD25 y la concentración intracelular de citocinas. Los resultados mostraron que linfocitos T aislados de bazo de ratones, previamente tratados con el factor y estimulados con Con-A exhibieron un aumento de blastos T CD4/CD25 mayor al de los testigos cultivados con Con-A ( $P < 0.05$ ), siendo esta respuesta dosis dependiente. Los linfocitos de ratones normales cultivados con  $1\mu\text{g}$  de FMd, mostraron los porcentajes más altos en la expresión de receptores CD4/CD25 y en las concentraciones intracelulares de  $\text{IFN-}\gamma$ . Los efectos inmuno-estimulantes también se observaron en linfocitos de sangre periférica humana. Finalmente, el FMd indujo una recuperación significativa de células T CD4+ en ratones disminuídos de estas células. Estos resultados sugieren que el factor estimula de manera inespecífica a linfocitos T los que podrían tener un papel modulador importante en inducir la respuesta inmune de tipo Th1.

## ABSTRACT

A metacestode factor (MF) isolated from live metacestodes of *Taenia solium* suppresses humoral and cellular responses, and inhibits the inflammatory reaction around metacestodes implanted subcutaneously in mice. When this MF is digested with RNase (dMF), it loses the suppressive capacity, but acquires T cell stimulant ability. By filtering MF through a Bio-gel P6 column, two components were separated. The first (F1) was suppressive; while the second (F2) stimulated T cells to proliferate. In the current experiments, stimulation assays were carried out with F2 or dMF stimulated with Con-A ex vivo. Flow cytometry analyses were performed to estimate cell proliferation, intracellular cytokine production, and restoration of CD4+ cells. Spleen lymphocytes from mice previously increase of cell proliferation and IFN-gamma production by CD4+ ( $p < 0.05$ ) and CD8+ cells. These effects were concentration-dependent and inversely correlated with the amount of dMF or F2. Similar results were observed in normal mouse spleen T cells incubated with F2 or dMF and Con-A in vitro. Finally, dMF induced a significant restoration of CD4+ cells in mice depleted of these cells.



## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. CISTICERCOSIS POR *TAENIA SOLIUM***

La cisticercosis es una enfermedad causada por el metacéstodo de *Taenia solium* en humanos y cerdos. La infección ocurre cuando el hospedero ingiere alimentos contaminados con huevos de *T. solium*. Con la ayuda de los jugos gástricos, se libera la oncosfera de los huevos, se activa, migra y se establece en algún tejido del cuerpo del hospedero donde se desarrolla en metacéstodo (Molinari y cols., 1998). La cisticercosis es una enfermedad pleomórfica en la cual el diagnóstico, tratamiento, y prognosis varían con relación a la localización, número, y estado de las lesiones (Salgado y cols., 1991). Esta enfermedad es de gran importancia en Salud Pública debido a la morbilidad crónica, disminución de la productividad de las personas afectadas, el alto costo del diagnóstico y tratamiento, y por el impacto económico debido a la pérdida de carne confiscada en rastros (Pawlowski, 1990).

#### **I.1.1. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA**

*Taenia solium* tiene un ciclo de vida complejo en dos hospederos (Centers for Disease Control and Prevention, 2001). Los humanos son los únicos hospedadores definitivos, también pueden ser hospederos "intermediarios" al igual que los cerdos. El adulto de *Taenia solium*, tiene una longitud de 2 a 7 m, aunque en algunos casos logra alcanzar longitudes mayores (12 m). Es hermafrodita y se aloja en el intestino delgado del hombre, donde se adhiere a las paredes mediante sus

ganchos y ventosas. Su extremo anterior (escólex) es cuadrangular, aproximadamente de 1 mm de diámetro, posee 4 ventosas grandes en forma de copa (de 0.5 mm de diámetro), y un rostelo notable y redondeado, armado con una doble corona de ganchos grandes y pequeños, en número de 22 a 32. La región cervical es corta y de sólo la mitad de grueso del escólex. Las proglótides inmaduras son más anchas que largas, las maduras son casi cuadradas, y las grávidas son más largas que anchas. El útero se origina en la cara anterior del ootipo y se dirige hacia el borde anterior de la proglótide, como un órgano ciego en forma de clava. Cuando se encuentra lleno de huevos se forman extensiones laterales que se ramifican una o dos veces. El número característico de estas ramificaciones laterales principales es de 7 a 13, generalmente 9, colocadas a ambos lados del tronco uterino principal. Las proglótides grávidas terminales se separan frecuentemente del estróbilo y se expulsan con las heces. Cada proglótide grávida contiene entre 50,000 a 60,000 huevos fértiles (Faust y cols., 1982). Los huevos escapan del útero a través de la hendidura longitudinal ventral, antes o después que las proglótides maduras se liberen. Los huevos son esféricos, miden de 31 a 43 micras de diámetro, son de color ante pálido y no se pueden distinguir microscópicamente de los huevos de *Taenia saginata*. La cáscara es gruesa y está formada por muchos prismas truncados unidos entre sí, estando además provista de una membrana delgada hialina de origen embrionario (embrióforos). Dentro de la cáscara hay un embrión completamente desarrollado u oncósfera, que contiene tres pares de ganchos. Los huevos, al abandonar el útero de la proglótide grávida, ser depositados en el suelo, pueden permanecer viables por varias semanas. Al ser ingeridos por cerdos o

el hombre, son descascarados en el estómago y luego en duodeno los jugos biliares y pancreáticos disuelven una capa lipídica de la superficie de la cubierta del embrión. De esta manera, la envoltura es permeable al agua y nutrientes que estimulan y activan al embrión. Este se libera de su envoltura con ayuda de sus ganchos y escapa a la luz intestinal, donde se fija al epitelio y con sus ganchos y enzimas rompe los tejidos (Miyazato y cols., 1977; Moczon, 1996), penetrando en ellos hasta alcanzar un vaso sanguíneo. Los embriones que han tenido éxito en alcanzar la corriente sanguínea, son llevados a algunos tejidos donde los embriones se desarrollan hasta alcanzar la fase de metacéstodo. Los sitios donde se les encuentra con frecuencia son: el cerebro, músculo estriado y cavidades oculares.

Los metacéstodos (cisticercos), son vesículas ovoidales, de color blanco lechoso, con una pequeña cabeza invaginada en un polo dentro de la vesícula. Los cisticercos presentan una pared vesicular y el escólex. La pared vesicular es una estructura membranosa compuestas de tres capas: una externa o capa cuticular, una capa celular o intermedia con estructura pseudoepitelial y una capa interna o capa reticular. El escólex invaginado tiene una cabeza o rostelo armado con ventosa y ganchos y un cuerpo rudimentario o estróbilo que forma el canal espiral (García y Del Bruto, 2000).

La apariencia macroscópica de los metacéstodos varia de acuerdo a su localización en el Sistema Nervioso Central. Los metacéstodos en el parénquima del cerebro son pequeños y tienden a alojarse en la corteza cerebral o en el ganglio basal. Estos quistes no miden más de 10 mm debido a la presión del parénquima cerebral no permite el desarrollo del quiste. La localización más común es en la fisura de Silvio y en las

cisternas basales. Los metacéstodos en las cisternas del líquido cefalorraquídeo pueden medir de 5 cm o más, probablemente debido a que su desarrollo no es detenido por la presión del parénquima cerebral. También se localizan en los ventrículos, mas frecuentemente en el cuarto ventrículo. Los metacéstodos espinales pueden estar la región intramedular o localizados en el espacio subaracnoideo. Los metacéstodos miden aproximadamente 5 mm de largo por 8 a 10 mm de ancho. (Villagran y Olvera, 1988.; Sotelo, 1988).

El hombre se infecta fácilmente con el metacéstodo al ingerirlo en carne de cerdo cruda o mal cocida. En el estómago, el metacéstodo es activado por el jugo intestinal y evagina activamente fijándose rápidamente al epitelio intestinal. En 5 a 12 semanas se desarrolla hasta alcanzar la fase adulta. Un paciente puede albergar más de un espécimen, aunque generalmente sólo se encuentra uno solo, de ahí el nombre de solitaria o *solium*. Los gusanos pueden vivir 25 años o más, y resisten repetidos intentos de desalojarlos (Faust y cols, 1982)

### **I.1.2.EPIDEMIOLOGÍA**

La infección por *T solium* es cosmopolita, endémica en muchos de los países en desarrollo, Latinoamérica, África y Asia; y está incrementando en países industrializados debido a la inmigración (Evans y cols., 1997; Ben y cols., 1999; CDC, 2001). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), mas de 2 millones de personas alojan el céstodo adulto y muchos mas, están infectados con isticercos. La cisticercosis en humanos y cerdos puede ser potencialmente erradicada, si se interviene principalmente en la vigilancia de los cerdos como focos de transmisión y en el tratamiento

en masa de las poblaciones humanas (CDC, 1992). En la taeniosis como la cisticercosis existe un subregistro de los casos ya que pocas instituciones que prestan servicios de salud cuentan con la infraestructura que les permita realizar un diagnóstico preciso, por lo que es probable que las cifra de casos sea mayor ( Acevedo, 1982). Se ha propuesto declarar la taeniosis/neurocisticercosis como una enfermedad de notificación obligatoria a nivel internacional, lo que permitiría una cuantificación precisa de la incidencia y la prevalencia de la taeniosis y la neurocisticercosis a nivel regional (Román y cols., 2000).

### **I.1.3.PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

La carne de cerdo cisticercosa, insuficientemente cocida es la fuente de transmisión para que la población humana adquiera la infección con el adulto (taeniosis). Los primates, y menos frecuentemente los borregos, perros y gatos, albergan también cisticercos de *Taenia solium*. Las infecciones humanas con huevos de *Taenia solium* conducen a la cisticercosis, los casos de cisticercosis llegan a decenas de miles. La ingestión de huevos en alimentos o agua contaminada, los dedos sucios que se introducen en la boca los pacientes que tienen al adulto en su intestino, o hipotéticamente a la autoinfección interna, en la que los huevos son llevados por retroperistaltismo hacia el duodeno o el estómago, eclosionan y después de su migración hacia los tejidos somáticos o viscerales, son los mecanismos de infección de la cisticercosis (CDC, 1992). Las características clínicas y patológicas de la neurocisticercosis varían y dependen de la respuesta inflamatoria alrededor del cisticerco, su

número, tamaño y localización. La presencia de cisticercos vivos en el sistema nervioso central usualmente no causa síntomas (Evans y cols., 1997). La inflamación alrededor de los cisticercos degenerados puede tener severas consecuencias, incluyendo encefalitis focal, edema y vasculitis. El síntoma más frecuente es la epilepsia. No obstante, la neurocisticercosis puede causar una amplia variedad de síndromes clínicos, que van desde la meningitis crónica, parálisis del nervio craneal hasta el infarto espinal. (Sotelo, 1988; Evans y cols., 1997)

### **I.2. RESPUESTA TH1/TH2.**

La inmunidad protectora contra muchas infecciones virales, bacterianas y parasitarias, parece implicar una intervención temprana del sistema inmune del hospedador. Este proceso frecuentemente permite la producción de dos grupos de citocinas efectoras mutuamente excluyentes. Los estudios en mamíferos sugieren que las células T CD4<sup>+</sup> son la principal fuente de ambos grupos de citocinas, (Romagnani, 1994). Los linfocitos T cooperadores (Th) pueden ser clasificados en distintas poblaciones de células efectoras basados en el perfil de citocinas que producen. El subgrupo Th1 de células T CD4 secretan citocinas tales como IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF $\beta$ . Las células del subgrupo Th2 producen citocinas del tipo IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Mosmann y cols., 1986, Mosmann y Sad, 1996). Este patrón de citocinas le confiere a las células T CD4 una actividad biológica diferente, las células Th1 son responsables de la inmunidad mediada por células y las Th2 de la inmunidad humoral. La principal citocina efectora de Th1 es el IFN- $\gamma$ , el

cual tiene dos funciones principales, activar macrófagos aumentando su acción microbicida y, estimular la producción de anticuerpos IgG, los cuales se unen con una alta afinidad a los receptores Fc $\gamma$  y proteínas del complemento y son los principales anticuerpos implicados en la opsonización y fagocitosis de microorganismos. La respuesta Th1 dominante está frecuentemente asociada con la inflamación y con el daño al tejido, ya que las dos citocinas del subgrupo Th1, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  reclutan y activan leucocitos inflamatorios. Algunas células Th1 adquieren capacidad citolítica, y las citocinas producidas por las Th1, IL-2 e IFN- $\gamma$ , promueven la diferenciación de los linfocitos T CD8 en células citotóxicas activadas (Abbas y cols., 1996). Las principales citocinas del subgrupo Th2 son IL-4 e IL-5. La interleucina 4 es la principal citocina en inducir el cambio de isotipo a IgE en las células B. La IL-5 es la citocina que estimula y activa a los eosinófilos maduros. La producción de estas dos citocinas por el mismo subgrupo celular aumenta la presencia de IgE y eosinófilos activados en las reacciones inmunes dominadas por Th2, tales como en alergias e infecciones helmínticas (Croft y Swain, 1995, Abbas y cols, 1996). La diferenciación selectiva de uno u otro subgrupo se establece durante la activación de los linfocitos que puede ser influenciada por una variedad de factores tales como, el tipo de células presentadoras de antígeno (APC) usadas para la activación de las células T, la dosis del antígeno, la estructura del antígeno o su afinidad por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y el receptor de la célula T (TCR), el fondo genético, materiales derivados de patógeno y citocinas presentes (Hsieh y cols., 1995; Murray, 1998; Murphy y cols., 1999; Rogers y cols., 1999).

Los linfocitos T CD4 tienen una participación importante en el desarrollo de la inmunidad en animales infectados con parásitos. Se ha reportado que la inducción de la disminución de células T CD4 con anticuerpos monoclonales en ovejas, mostraron una disminución parcial de la inmunidad inducida al ser inmunizadas con antígenos liberados en el intestino, y luego infectadas con *Haemonchus contortus* (Karanu y cols, 1997). Estudios de infecciones con helmintos, tanto *in vitro* como en el modelo animal han mostrado que IL-4 es principalmente responsable de la inducción de una respuesta de IgE y que IFN- $\gamma$  efectivamente bloquea el efecto de IL-4. La inducción de IgE por antígenos de filarias es dependiente de la concentración del antígeno, con altas concentraciones de antígeno se suprime la producción de IgE y ésta puede ser revertida por anticuerpos anti-IFN- $\gamma$ . Los autores explican este evento a que un grupo de células tipo Th2 que producen IL-4 e IL-5 tienen gran avidéz por los antígenos del parásito y de allí que a bajas dosis se activan preferencialmente que a altas concentraciones, otras células T CD4, con baja avidéz para los antígenos del parásito y que predominantemente son productoras de IFN- $\gamma$  sean activadas (King y cols., 1991). Las células T CD8+ también pueden variar en su patrón de citocinas que producen. Muchas de las células T CD8+ citotóxicas tienen un espectro de citocinas que recuerda a las células Th1. Las células T CD8+ que tienen un patrón de citocinas parecido al subgrupo Th2, pueden tener funciones regulatorias o supresoras. La diferenciación de las CD8+ es también influenciada por el subgrupo de células T CD4+. (Janeway y cols., 1997) IFN- $\gamma$  e IL-12 inducen la diferenciación de las CD8 vírgenes en subpoblaciones tipo



Tc1, que secretan un patrón de citocinas parecido al Th1; mientras que IL-4 promueve el desarrollo de las T CD8+ en subpoblaciones Tc2. (Sad y cols., 1995). La activación preferencial de Th1 o Th2 ha sido implicada en la resistencia a varias infecciones parasitarias por protozoarios y helmintos (Sher y Coffman, 1992). La regulación de la respuesta inmune por el parásito es a través de la secreción de moléculas implicadas en potenciar o disminuir la proliferación de los linfocitos T y B. De tal manera que, el parásito tiene la capacidad de regular la reactividad linfocitaria y determinar el tipo de respuesta inmune del hospedador (Mosmann y cols., 1986).

### **I.2.MOLÉCULAS DE HELMINTOS PARÁSITOS QUE REGULAN LA RESPUESTA INMUNE DEL HOSPEDADOR.**

Los parásitos excretan o secretan una variedad de moléculas dentro del hospedador mamífero. Estas moléculas propias de parásitos ayudan a regular la respuesta inmune celular y contribuyen a su persistencia dentro del hospedador (Lightowlers y Rickard, 1988). *Aun cuando se ha mostrado que protozoarios y helmintos activan diferentes mecanismo de la respuesta inmune innata, estos organismos frecuentemente son capaces de sobrevivir y replicarse en sus hospedadores ya que están bien adaptados a resistir las defensas del hospedador. En esta sección se señalan algunas de las moléculas, sustancias y factores producidos por los parásitos (helmintos) mas estudiados que modulan la respuesta inmunológica del hospedador.*

La regulación de la respuesta inmune del hospedador es un *mecanismo común en las infecciones por parásitos. Los productos de*

secreción-excreción (E/S) de nemátodos, tremátodos y céstodos contribuyen a las estrategias de evasión inmune de los parásitos a través de mecanismos que incluyen el cambio de células y de ligandos sobre la superficie, alteración de la función de linfocitos, macrófagos, granulocitos, modulación del complemento y otras respuestas inflamatorias del hospedador (Lightowers y Rickard, 1988). La inoculación de productos de excreción-secreción de *Nippostrongylus braziliensis* y *Toxocara canis* en ratones genera poblaciones de células supresoras, conduciendo a una reducción en la proliferación de las células T (Allen y cols., 1998). El papel patogénico de los glicoconjugados de la superficie de parásitos fue inicialmente sugerida en los estudios con oligosacáridos inmunoreactivos de antígenos de huevos de *Schistosoma mansoni* (Velupillai y cols., 1994). La lacto-N-fucopentaosa III (LNFP-III) que contiene trisacáridos de Lewis<sup>x</sup> y la lacto-N-tetraosa (LNT), inducen proliferación de células no T, células B220<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup> (células B), e inducen en éstas la producción de grandes cantidades de IL-10 y prostaglandina E<sub>2</sub>, dos moléculas conocidas por regular las células Th1, y que pueden inducir un desbalance de la respuesta Th1/Th2 favoreciendo la activación de las células Th2. Este efecto puede ayudar al desarrollo de las infecciones crónicas por la inducción de una respuesta humoral dañina predominante y una supresión de la respuesta tipo Th1 microbicida (Pearce, y cols., 1991) También se han descrito productos liberados por la esquistosomula (PLE) de *S. mansoni* que activan de manera inespecífica las células T durante la infección temprana (Auriault y cols., 1984). El tratamiento de ratones con la toxina F7 obtenida a partir del líquido del quiste hidatídico (HF) de *Echinococcus granulosus*, provoca

una disminución de los linfocitos de sangre periférica. Además, los linfocitos presentaron una disminución de antígenos CD3, CD4 y CD8 de la membrana; y un aumento en la expresión de CD25 en linfocitos CD8 esplénicos y CD4 de timo (Janssen y cols., 1997).

Algunos productos de secreción-excreción de helmintos juegan un papel importante en la digestión de nutrientes y de migración en el tejido del hospedador (Chappell y cols., 1986; Mc Kerrow, 1989; Smith y cols., 1994; Hill y Sakanari, 1997). La mayoría de estos productos son proteasas del tipo peptidasa, que son secretadas por muchos parásitos en distintos estadios en sus hospedadores mamíferos (Song y Chappell, 1993; Rhoads y Fettere, 1997).

Los metacéstodos de *Taenia solium* liberan una gran variedad de productos de excreción-secreción, tales como proteasas (Molinari y cols., 2000) y sustancias de bajo peso molecular que modulan la respuesta del hospedador (Tato y cols., 1995;1996; Arachavaleta y cols., 1998). La paramiosina liberada a través del tegumento de *Taenia solium* y de *S. mansoni* inhibe el complemento, uniéndose a C1q en solución; lo cual sugiere un papel modulador de la respuesta del hospedador a través de la inhibición directa y no agotamiento por consumo del C1q (Laclette y cols., 1992).

Los productos de excreción-secreción del metacéstodo de *Taenia crassiceps* regulan la respuesta inmune del hospedador. Los productos de E/S obtenidos de metacéstodos de infecciones tempranas o agudas inhiben la proliferación de los linfocitos T CD4 y su producción de citocinas. Sin embargo, los productos obtenidos a partir de metacéstodos de la fase crónica inducen un aumento de la respuesta proliferativa así como de la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  en linfocitos T

(Villa & Kuhn, 1996; Spolski y cols., 2000).,

Algunos autores han reportado el aislamiento de factores de bajo peso molecular de *S. mansoni* (Dessaint y cols., 1977), *Onchocerca gibsoni* (Yin Foo y cols., 1983) y *Taenia taeniaeformis* (Burger y cols., 1986); los cuales desempeñan un papel en la inmunosupresión.

### **I.4.FACTOR DE METACÉSTODOS**

Para completar su ciclo de vida, los metacéodos deben sobrevivir por tiempos prolongados en los tejidos de los hospedadores. Esto es ilustrado por el prolongado período asintomático (4-5 años) que precede al comienzo de las manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis (Dixon y Lipscomb, 1961). Asociado a esto, se ha observado que el número de células T CD4+ disminuye en cerdos cisticercosos naturalmente infectados (Tato y cols., 1987; Molinari y cols., 1987). Otra observación sugestiva de una inmunosupresión, es la discreta o nula reacción inflamatoria encontrada en la cisticercosis humana como porcina ( Rabiela y cols., 1982; Escobar, 1983; Riadura, 1987; Villagran y Olvera, 1988; Aluja y Vargas, 1988; Molinari y cols., 1993). Adicionalmente los metacéodos tienen mecanismos elaborados para evadir la respuesta inmune e inflamatoria del hospedador. Se han descrito productos secretados por los metacéodos de *T. solium*, uno de las cuales se ha denominado factor de metacéodo (FM). Este producto suprime la proliferación de linfocitos humanos y murinos *in vitro* (Molinari y cols., 1990; Tato y cols., 1995) y también disminuye la respuesta celular y humoral hacia antígenos de metacéodos e inhibe la

reacción inflamatoria alrededor de los metacéstodos de *Taenia solium* implantados subcutáneamente en ratones (Tato y cols., 1996; Molinari y cols., 1998). Por otro lado, se ha encontrado que el factor de metacéstodos suprime la inmunidad hacia inmunógenos de *Salmonella typhimurium* en ratón (Molinari y cols., 1989). Herrera y cols. (1994), reportaron que el factor de metacéstodo de *Taenia solium* transforma morfológicamente los fibroblastos en cultivo primario, sugiriendo que el parásito produce una inestabilidad genética en las células del hospedador, la cual lleva a la inmunosupresión y transformación maligna de las células.

Este factor es soluble, de bajo peso molecular (<1,450 daltons), termoestable (Molinari y cols., 1989; Tato y cols., 1995; 1996). La capacidad del FM para inhibir las funciones de los linfocitos T, se suprime con la digestión con ribonucleasas (Tato y cols., 1995). El FM digerido con ribonucleasas (FMd) induce en linfocitos T humanos y murinos estimulados con Con-A, una mayor capacidad de incorporar timidina tritiada en relación con linfocitos testigos estimulados solo con la lectina (Molinari y cols., 1990, Tato y cols., 1995). El factor digerido con ribonucleasa, induce en el ratón un estado más alto de resistencia contra una infección con *Salmonella typhimurium*, comparada con la susceptibilidad en los ratones testigos (Molinari y cols., 1989). Se sabe que el FMd induce proliferación de los linfocitos T, pero se desconoce cual es su papel sobre la regulación de la respuesta inmune.

## **II. HIPÓTESIS**

Ya que la digestión del factor de metacéstodos con ribonucleasa elimina la actividad supresora del FM y estimula la proliferación de linfocitos, se plantean las siguientes hipótesis: 1) Ya que los linfocitos son inducidos in vitro a proliferar por la acción del del factor de metacéstodo digerido y que en los ratones inoculados con FMd se estimula un aumento significativo de resistencia contra una infección con *Salmonella typhimurium*, cabe esperar que el factor de metacéstodo induzca in vivo una respuesta Th1. 2) El FMd es capaz de inducir una recuperación mas eficiente de células T CD4 en ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-CD4 posterior a la eliminación de toda la población de células CD4 en circulación, que en ratones no tratados.

### **III. OBJETIVOS**

#### **III.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este trabajo fue caracterizar la actividad estimuladora de la subfracción del FM en células humanas y murinas. Mediante el análisis de la expresión de los marcadores de superficie CD25 y la producción de citocinas intracelulares (IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4) en linfocitos tratados con el factor de metacéstono (FMd y F2).

#### **III.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Probar el efecto del factor de metacéstono digerido con ARNasa y F 2 del FM (subfracción estimulante del FM) en linfocitos murinos mediante la incorporación de timidina tritiada.
- Caracterizar la expresión de CD25 en las poblaciones de linfocitos humanos y murinos tratados con la subfracción estimulante *in vitro*.
- Caracterizar el patrón de producción de citocinas intracelulares en linfocitos T CD4+ y CD8+ con la subfracción del FM (F2) *in vitro*.
- Caracterizar la producción de citocinas y la expresión de CD25 en las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en ratones inoculados con diferentes dosis de la subfracción FMd y F2 estimulados con Con-A *ex vivo*.
- Determinar el porcentaje de recuperación de linfocitos T CD4+ en ratones con linfocitos TCD4+ disminuidos con anticuerpos monoclonales y tratados con el FMd *in vivo*.

## **IV.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1. OBTENCIÓN DE FACTOR DE METACÉSTODO (FM) A PARTIR DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium*.**

El factor de metacéstodo (FM) se obtuvo de metacéstodos disecados de carne cisticercosa, siguiendo el método descrito por Tato y cols., (1995), con ligeras modificaciones. Brevemente, se seleccionaron cerdos cisticercosos jóvenes (10-12 meses de edad) que estuvieran masivamente parasitados, mediante un examen visual de la base de la lengua que permite el diagnóstico de cisticercosis y una estimación sobre la carga parasitaria. Se realizó la prueba de viabilidad (Cañedo y cols., 1982) antes de la disección masiva de metacéstodos. Se disecaron 50 metacéstodos en condiciones de esterilidad y se cultivaron en medio de RPMI que contenía 10 µg/ml de tripsina (Sigma) a 37° C durante 4 h. Esta prueba se realizó para conocer el porcentaje de escólices que evaginan, y una evaginación de los metacéstodos mayor del 90%, se consideró apropiado para obtener FM. Para este fin, se disecaron cerca de 30,000 metacéstodos, se mantuvieron en 500 ml de agua desionizada estéril (ADE) durante 6 horas, después de las cuales el material se filtró por un cedazo. El líquido filtrado se centrifugó a 1,500 g por 20 min. El sobrenadante se obtuvo por decantación y se deshidrató por liofilización. El material se resuspendió en 15 ml de agua desionizada estéril y se dializó en membranas miliporo (que permiten el paso de moléculas abajo de 3,500 daltones) por 12 horas. El material fuera de la membrana se centrifugó, se liofilizó y se guardó a -20 °C hasta su uso.



## **IV.2. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.**

### **MÉTODO DE BRADFORD (1976)**

La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad) en placas de microtitulación. Se depositaron 160  $\mu$ L de cada muestra en solución y de los estándares en pozos separados de la placa de microtitulación. Se añadieron 40  $\mu$ L del reactivo de Bradford a cada pozo. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y la lectura se realizó a 595 nm en un espectrofotómetro iEMS Reader MF(Labsystems). Con los valores de densidad óptica de 4 diluciones de albúmina bovina (Sigma) se elaboró una curva para determinar la concentración de proteína de la muestra problema.

## **IV. 3. DETERMINACIÓN DE RIBOSA.**

Para iniciar la caracterización fisicoquímica del FM (Molinari y cols., 1990), el FM se sometió a un espectro de absorbancia. Los resultados mostraron un coeficiente de absorbancia a 260 nm, por lo que se pensó en la presencia de ácidos nucleicos como componentes del FM. La prueba para la detección del ADN resultó negativa. En cambio la determinación de ribosa sugirió la presencia de ARN en el FM, por lo que la determinación de ribosa se utilizó como parámetro para dosificar el FM en su uso *in vivo* e *in vitro*.

La concentración de ribosa se estimó de acuerdo al método de Orcinol (Ashwell 1957). Se pesaron 4 mg del FM y se diluyeron en 2 ml

de ADE. Se adiciona 1 ml ácido tricloroacético al 5%, se deja hervir por 30 minutos. Se le añade la solución de Orcinol/ $\text{FeCl}_3$  y HCl (recién preparada), se deja hervir por 15 minutos. La lectura se realiza a 670 nm en un espectrofotómetro (Milton Roy, SPECTRONIC 1001 PLUS). La concentración de ribosa se calculó a partir de una curva estándar de ribosa de levadura (Sigma).

También se realizaron lecturas de las fracciones, obtenidas a partir de las cromatografías en las columnas de Bio-gel, a 260 nm en un espectrofotómetro. Esta medición se utilizó para construir las curvas de elusión. Se utilizó agua destilada como blanco para calibrar a cero.

#### **IV.4. DIGESTIÓN DEL FACTOR DE METACÉSTODOS CON RIBONUCLEASA A.**

Estudios realizados por Tato y cols. (1995), demostraron que la digestión del FM con ribonucleasas se suprime la actividad inhibitoria sobre los linfocitos, pero aparece una actividad estimuladora. Se realizó la digestión con RNasa A siguiendo el método de Uchida y Egami (1967) con algunas modificaciones (Tato y cols.,l. 1995). La ribonucleasa A (RNasa A) cataliza la digestión de ARN después de los nucleótidos de pirimidina. Se disolvieron 300 mg de peso seco del factor en 8.5 ml de Tris HCl 0.1 M pH 7.5. Se añadió 200  $\mu\text{l}$  del inhibidor de tripsina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 2.5 ml de EDTA al 0.01M y 700  $\mu\text{l}$  2.5 ml de RNasa A. Se incluyó un control sin enzimas y tratado bajo las mismas condiciones. Se incubaron a 37°C por 4 h con agitación constante. Luego se colocó el producto de la digestión en una

membrana de 3,500 Da (Spectrapor 3), y se dializó contra agua estéril toda la noche a 4°C. Se tomó el líquido fuera de la bolsa se liofilizó y almacenó a -70 °C. A este producto de la digestión se le denominó factor de metacésto digerido (FMd).

### **IV.5. CROMATOGRAFÍA DEL FM CRUDO Y FMD EN COLUMNAS DE BIO-GEL P.**

Con el objetivo de purificar mejor el componente en el FM se realizaron cromatografías por filtración utilizando columnas con Bio-Gel P-6 y Bio-Gel P-2 (Bio-Rad). Lotes de 300 mg de peso seco del FM fueron resuspendidos en 3 ml de ADE y se centrifugaron a 1,500 g por 5 min, el sobrenadante se obtuvo por decantación, se filtró por membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  y se depositó sobre una columna de Bio-Gel P-6 (2.5 x 65 cm) cargada y equilibrada con ADE. El material se eluyó con ADE, en fracciones de 3 ml por tubo. Se utilizó lactoalbúmina (Sigma) como marcador de peso molecular. El fraccionamiento se realizó en un sistema de cromatografía ISCO (monitor y unidad óptica, modelos UA6) con una celda UV de 280 nm. Cada fracción se leyó en un espectrofotómetro (Milton Roy, SPECTRONIC 1001 PLUS) a una densidad óptica (DO) de 280 y 260 nm de longitud de onda. De igual manera se procedió para la cromatografía en columna de Bio-Gel P-2 (2.5 x 95 cm) acoplada a un sistema FPLC. Con los valores de absorbancia se construyó una gráfica. Las fracciones de cada pico se mezclaron y se liofilizaron. Los picos que se obtuvieron, se probaron para ver si tenían actividad biológica en células humanas y de ratón.

### **IV.6. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS MURINOS.**

Se utilizaron ratones BALB/c machos, sanos de 4 a 6 semanas de edad y de aproximadamente 18 a 20 g de peso, mantenidos en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México con alimento concentrado (5008 Purina Mills Incorporation) y agua *ad-libitum*. Se extrajeron los bazos de ratones y en condiciones de esterilidad se depositaron en cajas de Petri con medio RPMI. Los bazos se perfundieron con el medio utilizando una jeringa estéril de 3 ml, el material perfundido se depositó. sobre 3 ml de Histopaque®-1077(Sigma) en tubos cónicos estériles de 15 ml, se centrifugo a 500g por 30 min. El anillo formado por los linfocitos se obtuvo con pipeta Pasteur y se lavó dos veces con RPMI y se centrifugaron a 600 g por 5 min, las células se resuspendieron con RPMI 1640 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 100 UI de penicilina/ml y 100 µg de estreptomycin/ml. Se utilizó la tinción de azul tripano (Sigma) para realizar el conteo de células y determinar su viabilidad. La viabilidad celular fue por arriba del 95%, usando el criterio de exclusión con azul tripano.

### **IV.7. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA.**

Se obtuvo sangre periférica heparinizada de donadores voluntarios. La sangre se diluyó 1/1 con PBS y se centrifugó sobre 3 ml de Histopaque®-1077(Sigma) en tubos cónicos estériles de 15 ml a 500g por 30 min. El anillo formado por los linfocitos se extrajo con

pipeta Pasteur, se lavó dos veces con medio RPMI y se centrifugó a 600 g por 5 min. Se resuspendieron con RPMI 1640 10% de suero fetal bovino (SFB)(GIBCO), 100 UI de penicilina/ml y 100  $\mu$ g de estreptomycin/ml. Se utilizó la tinción de azul tripano (Sigma) para realizar el conteo de células y determinar su viabilidad. La densidad celular se ajustó a  $2 \times 10^6$  células por ml por pozo.

### **IV.8. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA.**

Alícuotas de  $5 \times 10^5$  células (humanas o murinas) se depositaron en pozos por triplicado (Costar, Cambridge, Mass, 96-well plates). Se incluyeron testigos blanco cultivados exclusivamente en RPMI. Para inducir la proliferación en el testigo se añadió Con-A (Sigma) a cada pozo conteniendo RPMI a una concentración de 3  $\mu$ g/ml. La subfracción pico 1 (F1) y pico 2 (F2) se añadió a concentraciones de 1y 10  $\mu$ g/ml en los pozos de cultivos que contenían Con-A. Los cultivos se incubaron en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 72 h. Dieciséis horas antes de la cosecha se agregó a cada pozo 1.0  $\mu$ Ci de timidina [<sup>3</sup>H] (74 Gbq/mmol; ICN, IRVINE, CA.) Las células se cosecharon en filtros de fibra de vidrio (Whatman 934-H), y se lavaron con agua destilada usando un cosechador automático múltiple (Nunc, Denmark). La incorporación de timidina [<sup>3</sup>H] se midió en un contador de centelleo líquido (Packard Tri-carb 300), y los resultados se expresaron como medias  $\pm$  desviación estándar.

#### **IV.9. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Para el análisis por citometría de flujo se utilizaron concentraciones de  $2 \times 10^6$  linfocitos humanos o murinos (obtenidos del mismo lote que se usó para la proliferación) colocados en placas de 12 pozos (Costar). Se incluyeron testigos blanco en RPMI, testigo de proliferación conteniendo RPMI con Con-A ( $3 \mu\text{g/ml}$ ) y dosis del FM de 1 y  $10 \mu\text{g/ml}$  o de F 2 en las mismas dosis conteniendo RPMI 10% SFB y Con-A. Los cultivos se incubaron ( $5\% \text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ , 48 h). Se tomaron alícuotas de  $250 \mu\text{l}$  de cada testigo y experimental, se depositaron en tubos de 6 ml ( $12 \times 75 \text{ mm}$ , estériles, Becton Dickinson) y se tiñeron con anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos, para determinar la activación de los linfocitos T y su producción de citocinas.

##### **IV.9.1. REACTIVOS Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.**

Se utilizaron anticuerpos monoclonales (PharMingen) para la determinación de citocinas intracelulares y de marcadores de activación en los linfocitos de ratón. Anti- IL-2- R-PE; anti- CD25- R-PE (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2); anti-CD4 (L3T4)- FITC; anti- CD8-FITC; anti- IL-4-R-PE; anti-IFN $\gamma$ - R-PE; anti-CD3e-FITC y  $\gamma_2^a$ FITC/ $\gamma_1$ PE para el control isotipo. La permeabilización de las células se llevó a cabo con solución permeabilizante FACS<sup>TM</sup> y solución de lisis FACS<sup>TM</sup> diluidas 1/10 en agua destilada. Se lavaron con PBS al 0.5% suero de albúmina sérica bovina (ASB) y 0.1%  $\text{NaN}_3$ ; y se fijaron con formaldehído al 0.5 %.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales contra receptores humanos, anti CD25-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD4-FITC/CD8-P y anti-

IL-2-PE, anti-IL-4-PE, anti-IFN $\gamma$ -PE (Sigma).

### **IV.9.2. DETERMINACIÓN DE RECEPTORES DE LINFOCITOS T.**

Al final del periodo de incubación se tomaron 300,000 células por tubo y se procedió a la tinción extracelular con anticuerpos de ratón anti-CD4 (L3T4)-FITC  $\gamma_{2a}$ FITC/ $\gamma_1$  PE control de isotipo, anti-CD4-FITC; anti-CD8-FITC anti-CD3e-FITC y anti-CD25-PE contra receptores humanos. Se incubaron por 25 min. a temperatura ambiente en oscuridad, se lavaron con PBS con 0.5 % ASB y 0.1 % NaN<sub>3</sub>, se centrifugaron a 600g por 8 min. Se decantó el sobrenadante y se fijaron con 300  $\mu$ l de formaldehído al 0.5 %. Los tubos se almacenaron en refrigeración por 1 h para su posterior lectura en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

### **IV.9.3. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES.**

Durante la estimulación con Con-A y la subfracción del FM digerido o F2, se adicionaron 20  $\mu$ l Brefeldina A a cada pozo (a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml de suspensión de células) 4 h antes de cumplir las 48 h de incubación. Al final del periodo de incubación se colocaron 400,000 células por tubo y se procedió a la tinción extracelular con anticuerpos de ratón anti-CD4 (L3T4) FITC,  $\gamma_{2a}$ FITC/ $\gamma_1$  PE control de isotipo, anti- CD8-FITC, anti-CD4-FITC; anti-CD3e-FITC; anti-CD8-PE contra receptores humanos. Se mezclaron bien y se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se adicionaron a cada tubo, 1000  $\mu$ l de solución de lisis diluida 1/10 en agua destilada, se mezcló en el vortex, y se incubaron 15 min a 25 °C en oscuridad. Luego se centrifugaron a 600g por 6 min a temperatura ambiente. Para la tinción intracelular de citocinas se añadieron 500  $\mu$ l

de solución permeabilizante diluida 1/10 en agua destilada (BD). Se mezcló suavemente y se incubó por 15 min a 25 °C en oscuridad. Se añadieron 2 ml del PBS con 0.5% ASB y 0.1% NaN<sub>3</sub> y se centrifugó a 600 g por 6 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y se resuspendió el sedimento. Se añadieron los anticuerpos monoclonales de ratón: anti-IL-2- R-PE; anti-IL-4-R-PE; y anti-IFN $\gamma$ -R-PE humanos. Seguido de incubación por 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se agregaron 2 ml de PBS con 0.5% ASB y 0.1% NaN<sub>3</sub> y se centrifugó a 600g por 6 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó, se resuspendió el sedimento y se añadieron 300  $\mu$ l de formaldehído (0.5%). Se almacenaron en refrigeración y al resguardo de la luz hasta su lectura en el FACS.

El análisis citométrico se realizó en FACScalibur (Becton Dickinson). La densidad de receptores y citocinas se determinó usando de programa CellQuest. En todos los experimentos se incluyeron células teñidas para cada fluorocromo como testigos. Los linfocitos fueron seleccionados por sus características de tamaño y granularidad (FSC y SSC) y se analizaron 10,000 eventos por muestra. El porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que contenían las citocinas intracitosplamáticas (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4) o receptores extracelulares CD25 se observan en los cuadrantes correspondientes, como se indican en las figuras. Los resultados son presentados como la media de los porcentajes de células positivas obtenidos de tres experimentos independientes.



#### **IV.10. TRATAMIENTO DE RATONES CON FACTOR DE METACÉSTODO DIGERIDO Y F 2**

Se utilizaron ratones BALB/c machos, sanos de 4 a 6 semanas de edad, de aproximadamente 18 a 20 grs, mantenidos en el Bioterio del Instituto de Fisiología Celular, con alimento concentrado (5008 Purina Mills Incorporation) y agua *ad-libitum*. La subfracción del FMd se utilizó en las siguientes dosis: 1, 2 y 5  $\mu\text{g}$  de proteína/gr de peso corporal, diluidos en 100  $\mu\text{l}$  de solución salina. Los ratones del grupo testigo recibieron 100  $\mu\text{l}$  de solución salina. Las inoculaciones se aplicaron en el abdomen vía subcutánea cada 96 h 4 veces. Se repitió este esquema de inoculación en otro grupo de ratones utilizando F 2 a la dosis de 1  $\mu\text{g}$ /gr de peso corporal. Los ratones se sacrificaron 96 h después de la última dosis. Se extrajeron los bazo y se obtuvieron las células por perfusión con RPMI 1640 las cuales se centrifugaron sobre Histopaque<sup>®</sup>-1077(Sigma) y luego se obtuvieron de la interfase. Se realizó prueba de viabilidad con azul tripano.

Las células de los ratones tratados y de ratones testigos ( $1 \times 10^6$  células/ml) se incubaron por triplicado en RPMI con SFB al 10% (GIBCO), en pozos de cajas Costar. A células testigo se les añadieron 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Con-A y se incubaron ( $37^\circ\text{C}$  , 48 h , 0.5% de  $\text{CO}_2$ ). Las células se cosecharon y se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 y anti-CD25. Después, se tiñeron las citocinas intracelulares como se describió anteriormente.

### **IV.10.1 DETERMINACIÓN DE CD69 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATONES TRATADOS CON EL FMD.**

CD69 es un marcador de activación temprana de las células linfoides.(Santis y cols., 1994). Para medir la expresión de CD69 en los ratones tratados con el FMD, se tomaron 20 $\mu$ l de sangre periférica de la cola. Las células de sangre periférica de los ratones testigos fueron incubadas en presencia de Con-A por 4 h al igual que las células de los ratones tratados con el FMD. Se añadieron los anticuerpos monoclonales anti-CD69 -PE y anti-CD3-FITC, se incubó por 25 min en oscuridad. Se añadieron a cada tubo, 500  $\mu$ l de solución de lisis diluida 1/10 en agua destilada, se mezcló en vortex, y se incubó 15 min a 25 °C en oscuridad. Luego se centrifugó a 600g por 6 min a temperatura ambiente. Se lavó con PBS con 0.5 % ASB y 0.1 % NaN<sub>3</sub> y se centrifugaron a 600 g por 8 min. Se decantó el sobrenadante y se fijó con 300  $\mu$ l de formaldehído al 0.5 %. El análisis se realizó en FACScalibur.

### **IV.11. EFECTO DEL FMD EN RATONES DISMINUÍDOS DE LINFOCITOS CD4+.**

A un grupo de ratones (3) se les administró anticuerpos monoclonales anti-CD4 purificados (PharMingen) en dosis única de 100  $\mu$ g por ratón por vía intraperitoneal. Estos ratones se consideraron el grupo testigo disminuído de células CD4+. A otro tratado de igual forma con anticuerpos purificados anti-CD-4 de ratón, se le administró el factor de metacésto digerido (FMD) cada 96 h, 1  $\mu$ g de FMD por

gr/peso corporal por vía subcutánea. Se incluyó un grupo testigo blanco tratado con solución salina

Todos los grupos fueron evaluados cada 4 o 5 días, a través del análisis por citometría de flujo de sangre periférica. La sangre periférica de los ratones se obtuvo de la punta de la cola asépticamente previamente cortada con tijera, se tomaron 10  $\mu$ l de sangre de cada ratón y se mezclaron con heparina sódica. La tinción se realizó inmediatamente con anticuerpos monoclonales anti-ratón: anti-CD4 FITC y anti-CD8 PE (PharMingen), se incubó por 25 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se adicionaron 500  $\mu$ l de solución de lisis diluida 1/10 en agua destilada, se mezcló en vortex y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó con PBS y se centrifugó a 500g por 8 minutos, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió con 300  $\mu$ l de formaldehído al 0.5 %.

El análisis se realizó en el citometro de flujo FACScalibur. La densidad de receptores se determinó usando el Programa de CellQuest. En todos los experimentos se incluyeron células teñidas para cada fluorocromo como testigos. Los linfocitos fueron seleccionados sobre sus características de tamaño y granularidad, se analizaron 10,000 eventos por muestra. El porcentaje de células que expresaron los receptores de superficie (CD4, CD8) fue obtenido en los cuadrantes correspondientes (cuadrante superior izquierdo, CD8+; cuadrante inferior derecho, CD4+. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

### **IV.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los datos fueron analizados aplicando la prueba *t* de Student.

## **V. RESULTADOS**

### **V.1. CROMATOGRAFÍA DEL FM CRUDO Y DEL FM DIGERIDO.**

#### **V.1.1. CROMATOGRAFÍA EN BIO-GEL P-6**

El Bio-Gel P-6 está compuesto de partículas porosas de poliacrilamida, que permiten la separación de moléculas entre 1,000 y 6,000 daltons. El factor de metacéstono crudo y el sometido a digestión con ribonucleasa A, FM y FMd respectivamente, se separaron en dos picos de elusión (Figuras. 1 y 2). En la gráfica obtenida del cromatograma del FMd se observa una disminución en los valores de DO en el pico 1 (Figura. 2) a 260 nm, longitud de onda, respecto a los valores en la figura 2. La digestión con ribonucleasa indujo una reducción en la cantidad de ribosa/mg peso seco (20.5µg) a niveles no detectables (datos no mostrados).

#### **V.1.2. CROMATOGRAFÍA POR BIO-GEL P-2**

A fin de obtener una mejor separación de los componentes del factor de metacéstono, se realizaron cromatografías en columnas de Bio-Gel P-2, lo cual permite separar carbohidratos y pequeños péptidos por debajo de 1,800 daltones. En la figura 3, se observa que el FM crudo se separó en 4 picos: pico 1 (fracciones 29-34), pico 2 (fracciones 45-54), pico 3 (fracciones 56-60) y pico 4 (fracciones 66-70).

El pico 2 del FM (obtenido a partir de la cromatografía por Bio-Gel P-6) y el FM digerido con ribonucleasa A se cromatografiaron en la columna de Bio-Gel P-2 (Figuras 4 y 5). El pico 2 del FM en Bio-Gel P-6, mostró tres picos de elusión de los cuatro que originalmente se

obtuvieron a partir del FM crudo. El pico 1 presentó valores basales en las fracciones 31 a 34 en esta cromatografía; el pico 2 con las fracciones 45 a 55; pico 3 (fracciones 56-61) y pico 4 (fracciones 66-70) (Figura 4).

La cromatografía del factor digerido (FMd) con ribonucleasa A, la cual presentó dos picos de elusión. El pico 1 en esta cromatografía se observó en las fracciones 31-36, presentando valores DO muy bajos; las fracciones correspondientes al pico 2 también tenían valores basales; pico 3 (fracciones 55-62); y no se observó el pico 4 (Figura 5).

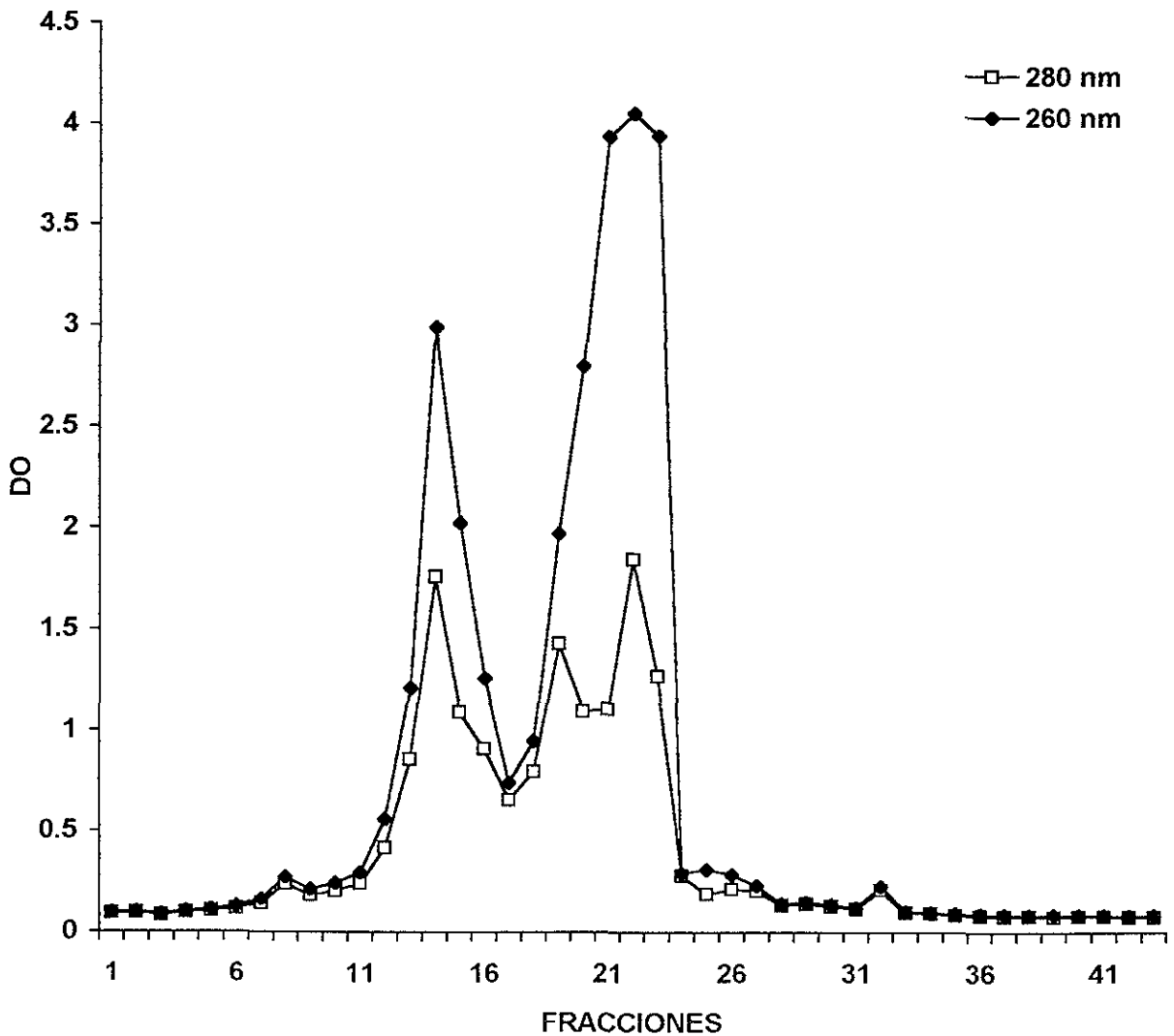
### **SUBFRACCIONES DEL FM:**

En el transcurso del trabajo experimental se obtuvo la fracción estimuladora por diferentes metodologías, digestión con ribonucleasas y por cromatografías en Bio-Gel. Para los ensayos biológicos, se trabajó con el factor digerido con ribonucleasa A (FMd) y el pico 2 del FM en Bio-Gel P-6 (F2). Los picos de elusión obtenidos a partir de la columna de Bio-Gel P-2, fueron también probados en los ensayos biológicos y almacenados para su posterior caracterización por resonancia magnética.

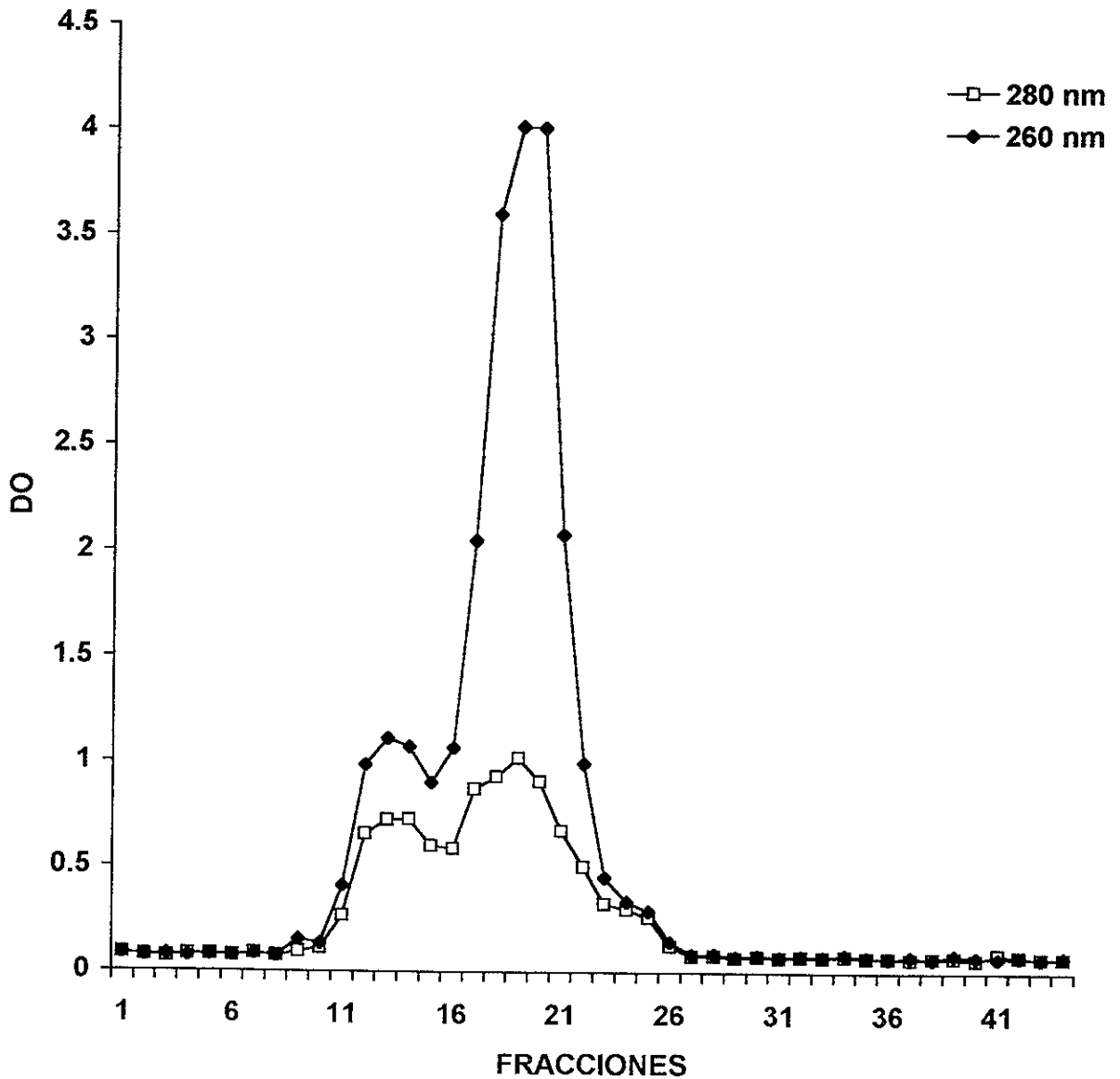
## **V.2. ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DEL FMD Y F2.**

### **V.2.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR POR INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA.**

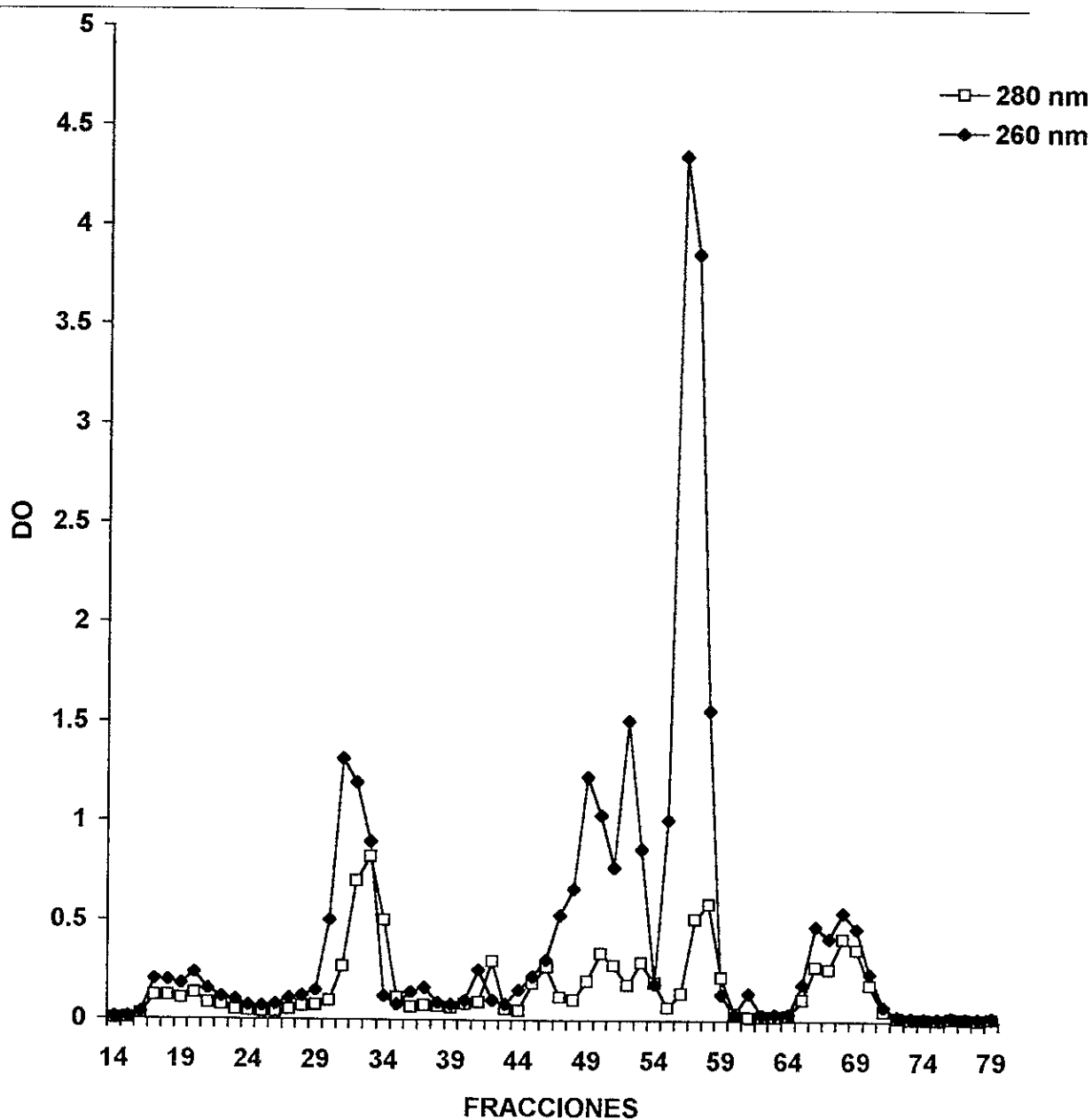
Para investigar el efecto inmunomodulador del factor de metacéstodos, se realizó una prueba de proliferación de linfocitos *in vitro*. Los resultados del tratamiento de las células esplénicas de ratones con las subfracciones F1 y F2 del factor de metacéstodo, obtenidas a partir de la cromatografía en columnas de Bio-



**FIGURA 1-** Cromatografía por ultrafiltración en columna de Bio-Gel P-6 (2.5 x 65 cm) del factor de metacéstodo crudo. Los valores de DO de las fracciones (3ml) se determinaron a 280 y 260 nm en el espectrofotómetro. Pico 1 (fracciones 13-16), Pico 2 (fracciones 19-24). Gráfica representativa de 10 cromatografías independientes.

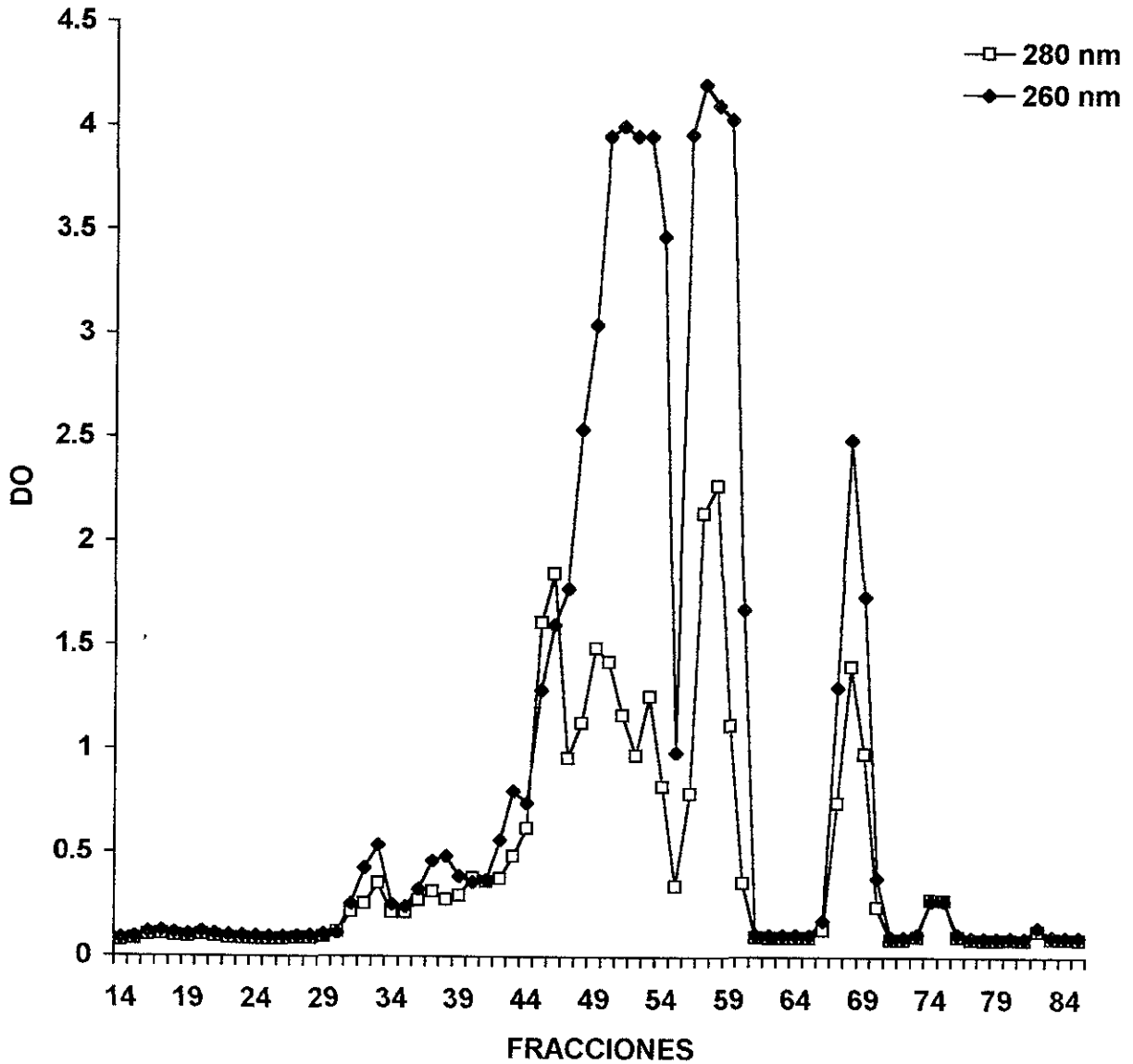


**FIGURA 2.** Cromatografía por ultrafiltración en columna de Bio-Gel P-6 (2.5 x 65 cm) del factor de metacéstodo digerido (FMD).. Los valores de DO de las fracciones (3ml) se determinaron a 280 y 260 nm en el espectrofotómetro. Pico 1 (fracciones 12-15), Pico 2 (fracciones 17-23) Gráfica representativa de 4 cromatografías independientes.

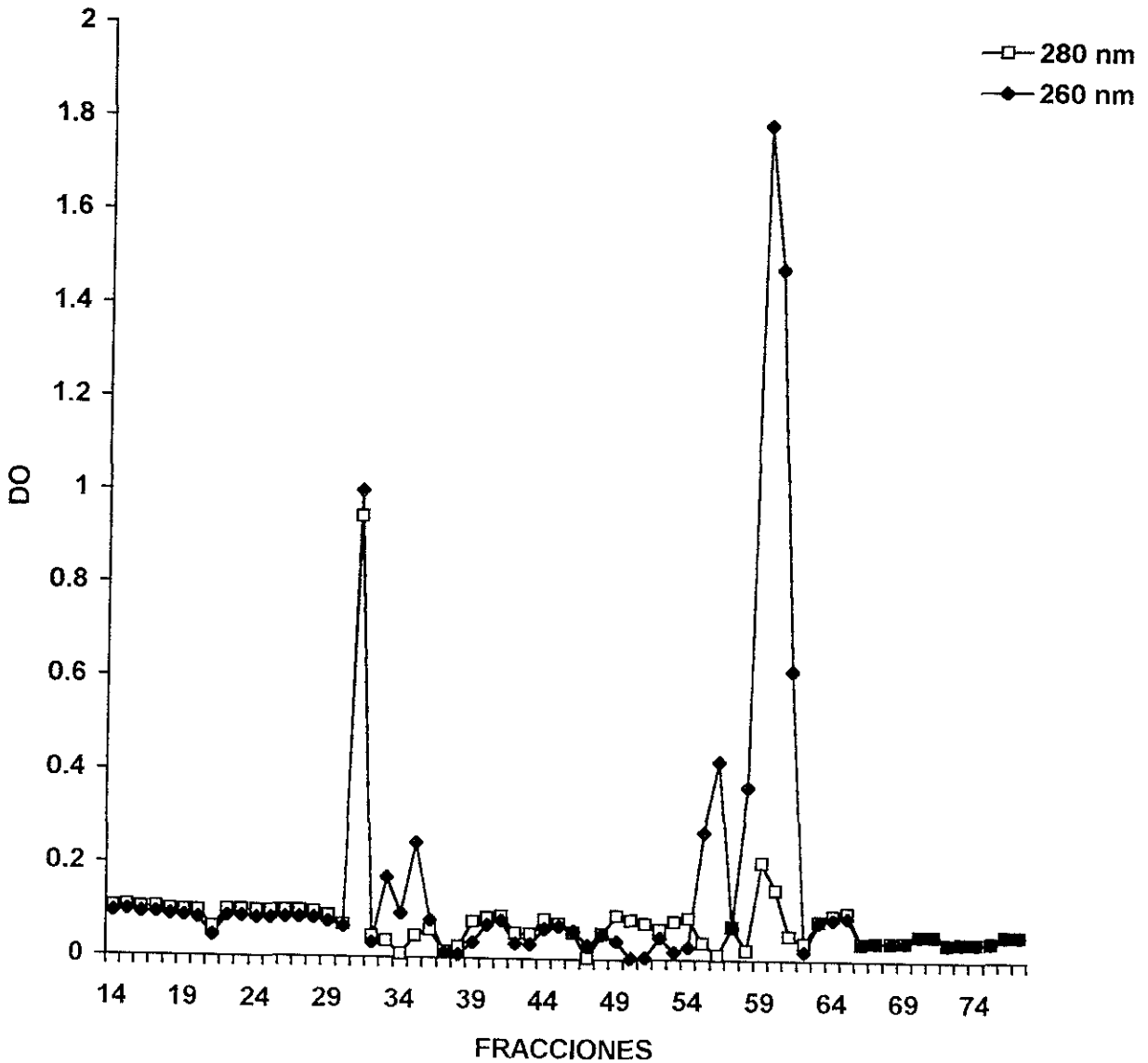


**FIGURA 3.-** Cromatografía por ultrafiltración del FM crudo en columna de Bio-Gel P-2 (2.5 x 95 cm). Los valores de DO de las fracciones (3ml), se determinaron a 280 y 260 nm en el espectrofotómetro. Pico 1 (fracciones 29-34), Pico 2 (fracciones 36-44), Pico 3 (fracciones 45-54), Pico 4 (fracciones 55-61), Pico 5 (fracciones 65-71). Gráfica representativa de 3 cromatografías independientes.





**FIGURA 4.-** Cromatografía por ultrafiltración en columna de Bio-Gel P-2 (2.5 x 95 cm) del Pico 2 del FM obtenido a partir de columna de Bio-Gel P-6 (2.5 x 65 cm). Los valores de DO de las fracciones (3ml), se determinaron a 280 y 260 nm en el espectrofotómetro. Pico 1 (fracciones 31-34), Pico 2 (fracciones 36-44), Pico 3 (fracciones 45-54), Pico 5 (fracciones 67-71). Gráfica representativa de 6 cromatografías independientes.



**FIGURA 5.-** Cromatografía por ultrafiltración en columna de Bio-Gel P-2 (2.5 x 95 cm) del FMd con ribonucleasa A. Los valores de DO de las fracciones (3ml) se determinaron a 280 y 260 nm en el espectrofotómetro. Pico 1 (fracciones 30-34) , Pico 4 (fracciones 30-34), Pico 5 (fracciones 67-71) Gráfica representativa de 3 cromatografías independientes.

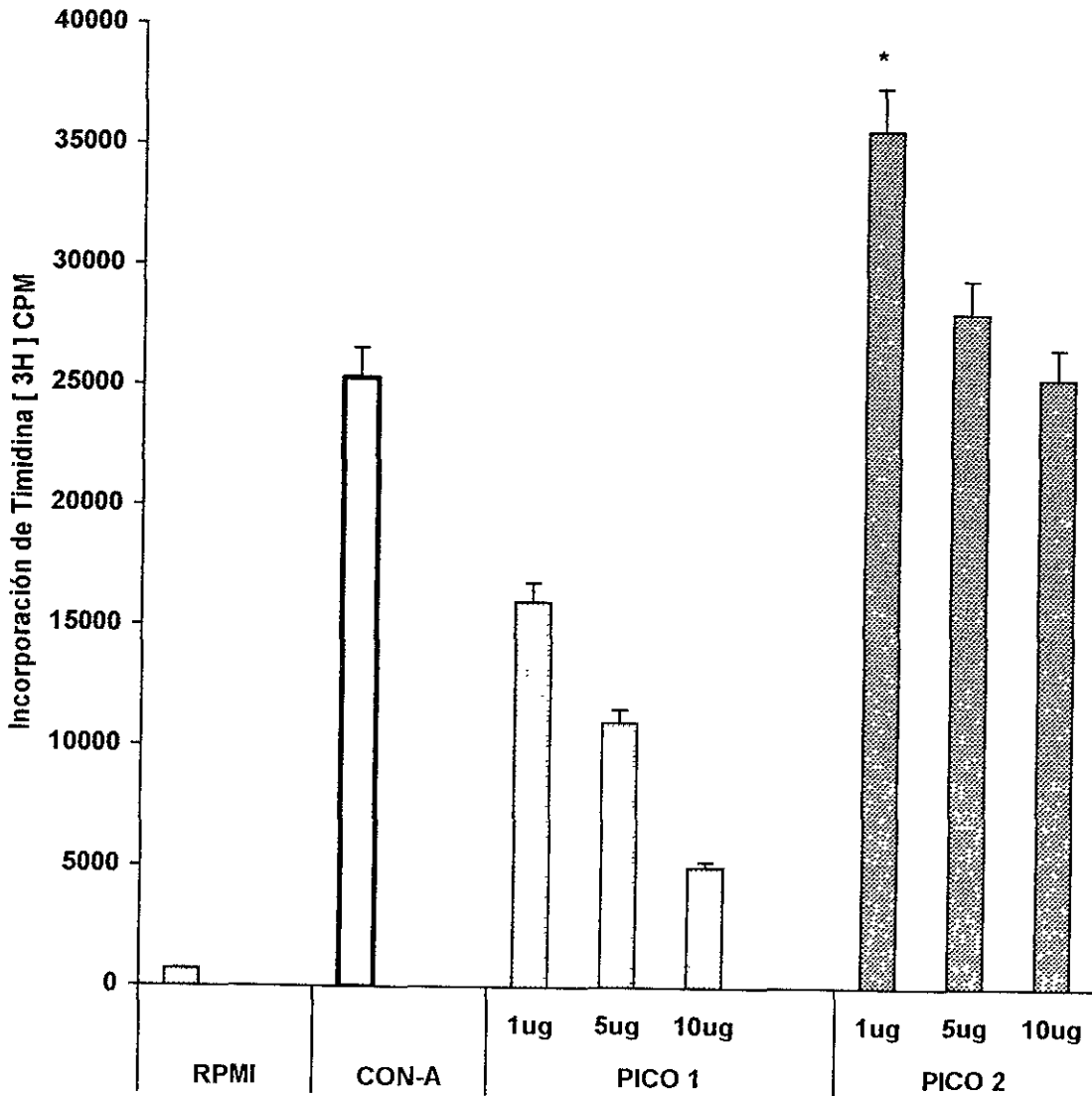
Gel P-6, mostraron que el material de F2 indujo mayor incorporación de timidina tritiada en las células tratadas que los testigos estimulados únicamente con el mitógeno ( $P < 0.05$ ). El material de F1 indujo inhibición de la incorporación de timidina tritiada con relación al testigo estimulado solamente con Con-A (Fig. 6).

### **V.2. 2. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS T MURINOS.**

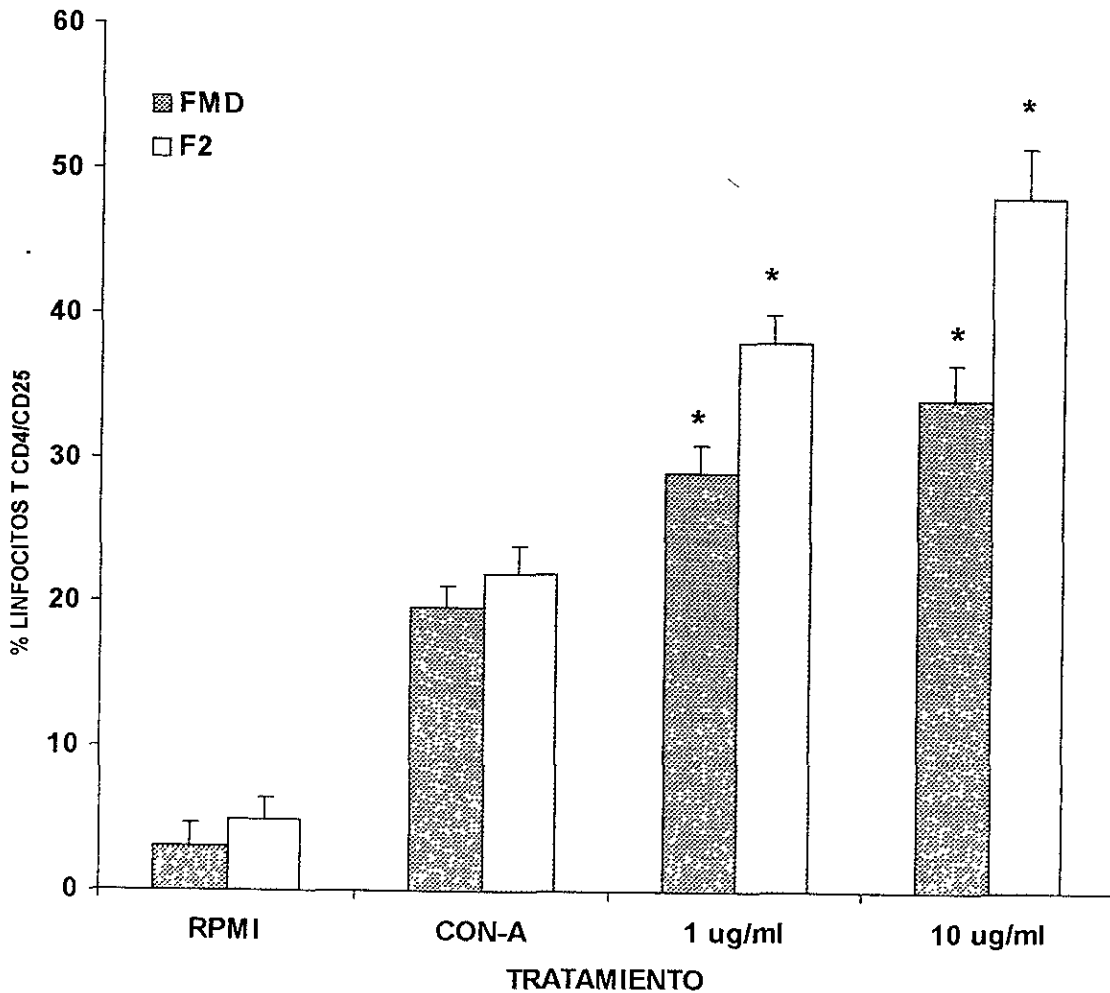
Los análisis de citometría de flujo revelaron un aumento de la expresión de CD25 en células de ratón CD4+ cultivadas *in vitro* con F2 y FM digerido a las dosis de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 7). Se analizaron distintas dosis del factor de metacéstodo digerido y se encontró que las dosis de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$  fueron las más estimulantes para los linfocitos. Dosis por debajo de 1  $\mu\text{g/ml}$  no indujeron aumento de la expresión de CD25, tal como se puede ver en el análisis por citometría de flujo de la figura 8. Las dosis de 0.6 y 0.2  $\mu\text{g/ml}$  presentaron valores de expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (CD25) por debajo de la dosis óptima (1  $\mu\text{g/ml}$ ).

### **V.2. 3. PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES**

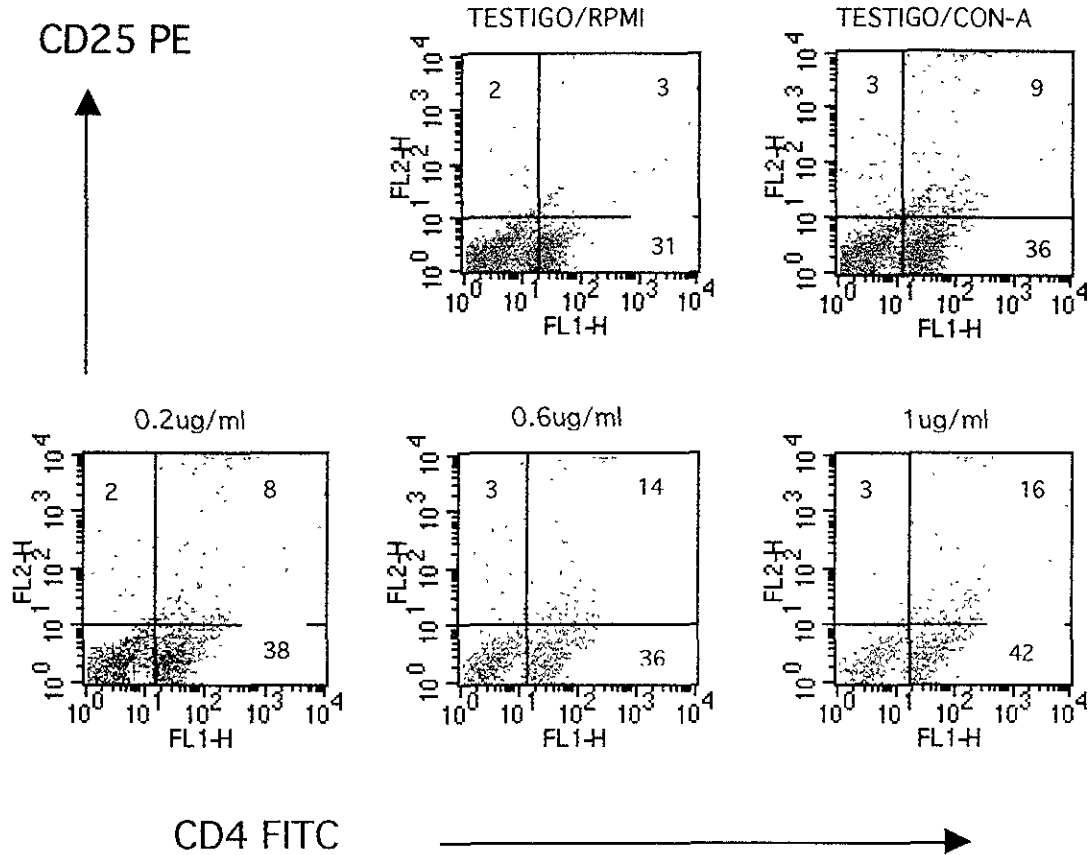
El análisis de la producción de IFN- $\gamma$  en linfocitos murinos mediante citometría de flujo, tratados con diferentes dosis del FMd e incubados en presencia de Con-A por 48 h, mostró un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) con las dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  y 2  $\mu\text{g/ml}$  para los TCD 4 y CD8 con respecto a los valores de Con-A (Fig. 9A). En cuanto a la producción de IL-2 e IL-4, se observó un ligero aumento, aunque no significativo, con las dosis de 1 y 2  $\mu\text{g/ml}$  en ambas subpoblaciones de células T (Fig. 9B y C). Los resultados mostraron un aumento



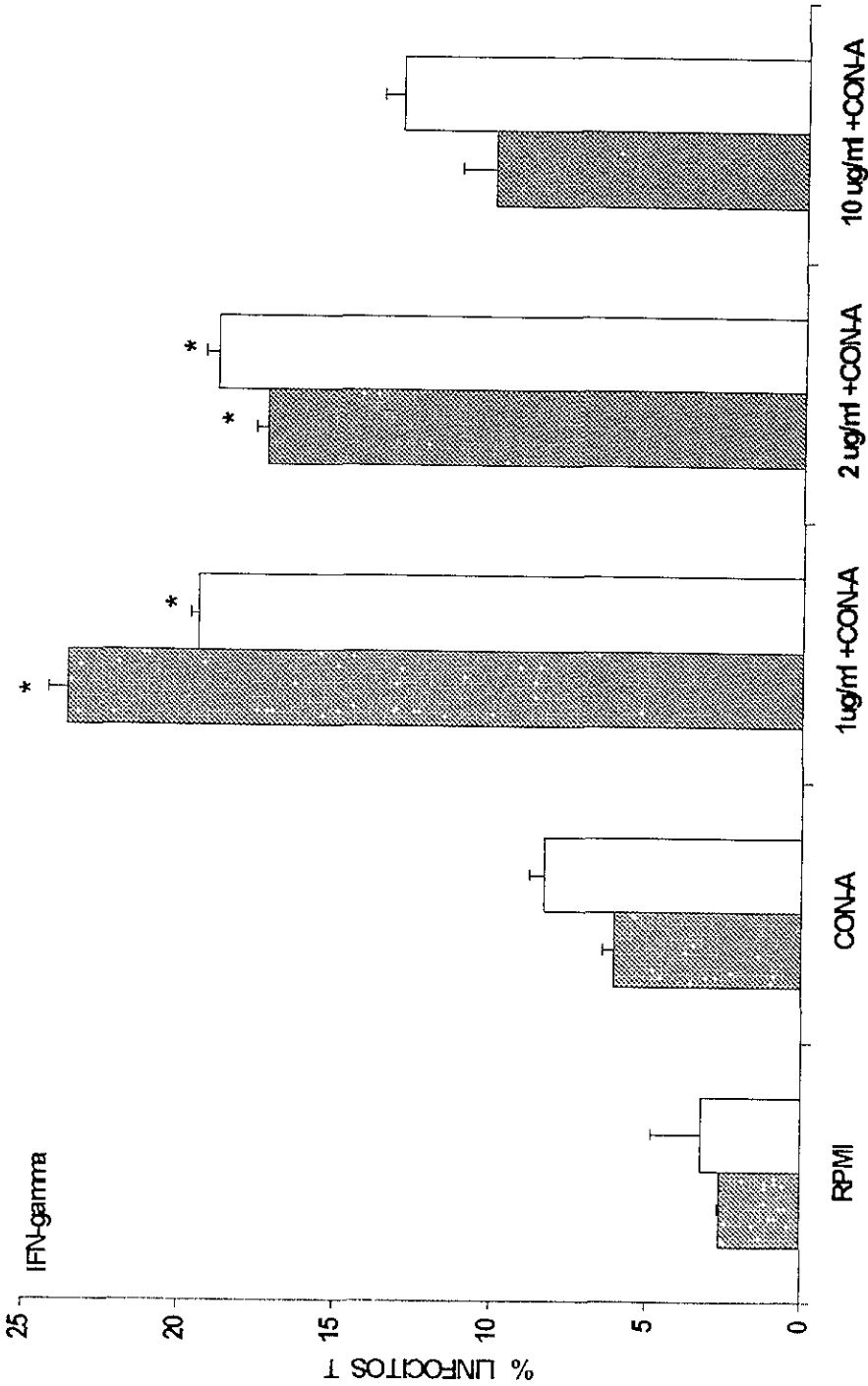
**FIGURA 6.-** Incorporación de timidina tritiada ( 3H) por células esplénicas de ratón estimuladas con CON-A y tratados con diferentes dosis ( $\mu\text{g}/10^6$  células/ml) del Pico 1 y Pico 2 obtenido a partir de la cromatografía del factor de metacésto crudo en columna de Bio-Gel P-6. Se presentan las medias  $\pm$  DE de los resultados de 6 experimentos.  $*(P<0.05)$



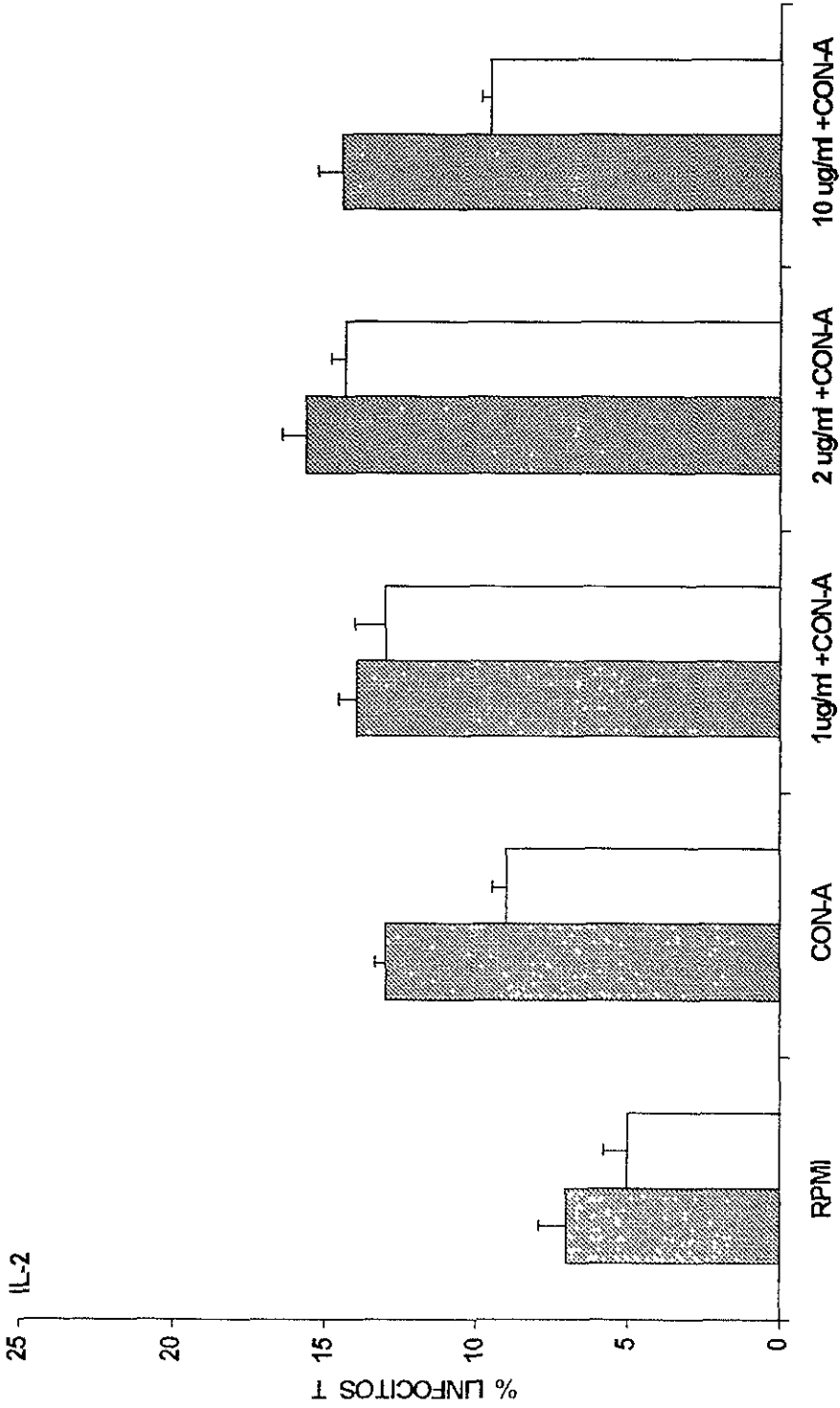
**FIGURA 7.** Expresión de CD25 en células T CD4 de ratones, tratadas *in vitro* con FMD (barras negras); y F2 (barras blancas). Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción (FMD o F2) y CON-A por 48 h. Se presentan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 5 experimentos independientes. \* $P < 0.05$ , (CON-A vs  $10 \mu\text{g/ml}$ ).



**FIGURA 8.** - Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD25 en linfocitos T CD4 estimulados con Con-A y el FMD. Los linfocitos de ratón fueron tratados con Con-A y FMD (0.2µg/ml, 0.6µg/ml, 1µg/ml) por 48 h. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4-FITC (FL1-H) y anti-CD25-FITC (FL2-H). Se incluyen testigos de estimulación solamente con Con-A y células en RPMI. Se muestran los valores en porcentajes de 10,000 eventos calculados para cada cuadrante. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

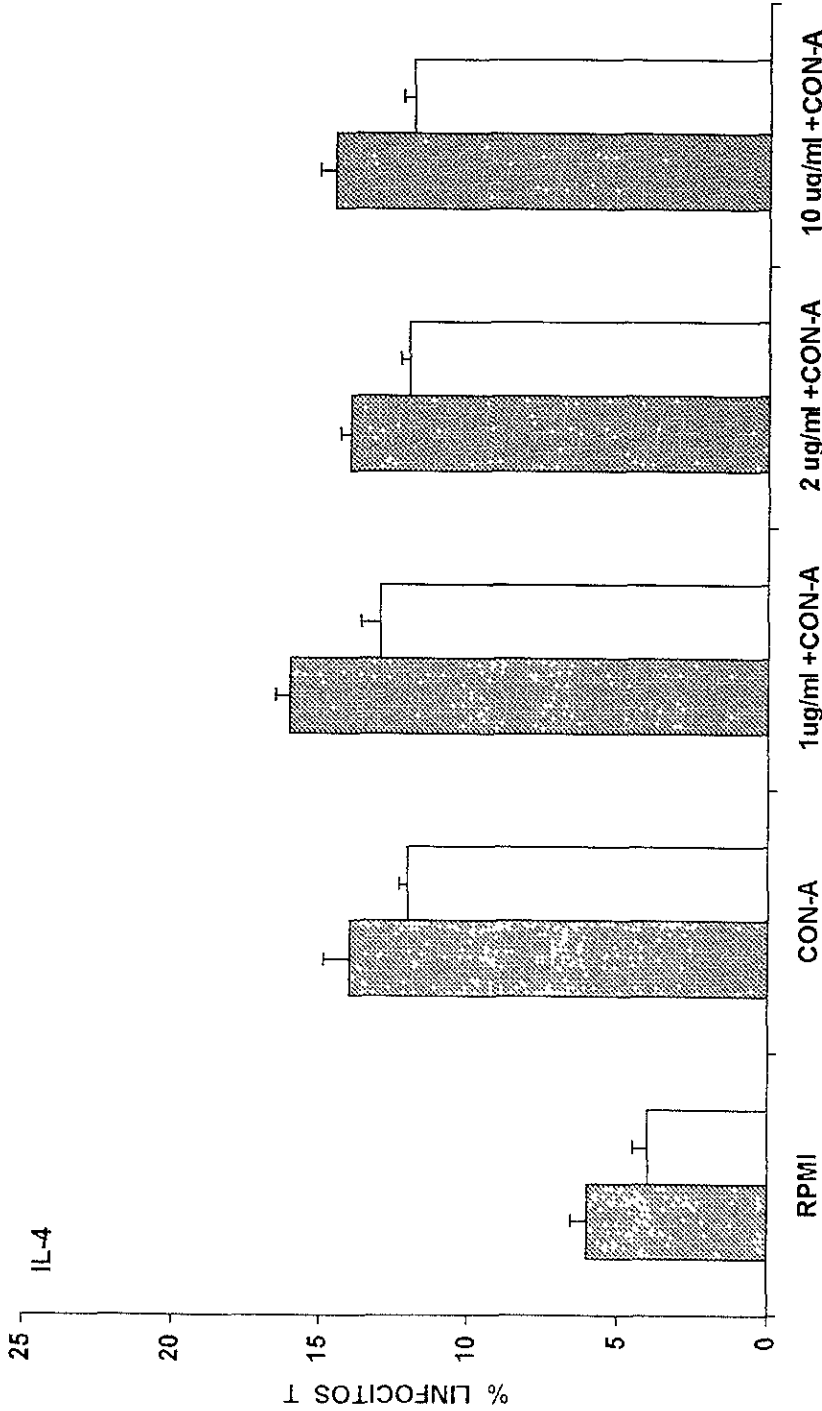


**FIGURA 9A.-** Análisis de la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en células T CD4 (barras grises) y CD8 (barras blancas) de ratones. Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción FMD y CON-A por 48 h. Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 5 experimentos independientes. \*P<0.05.

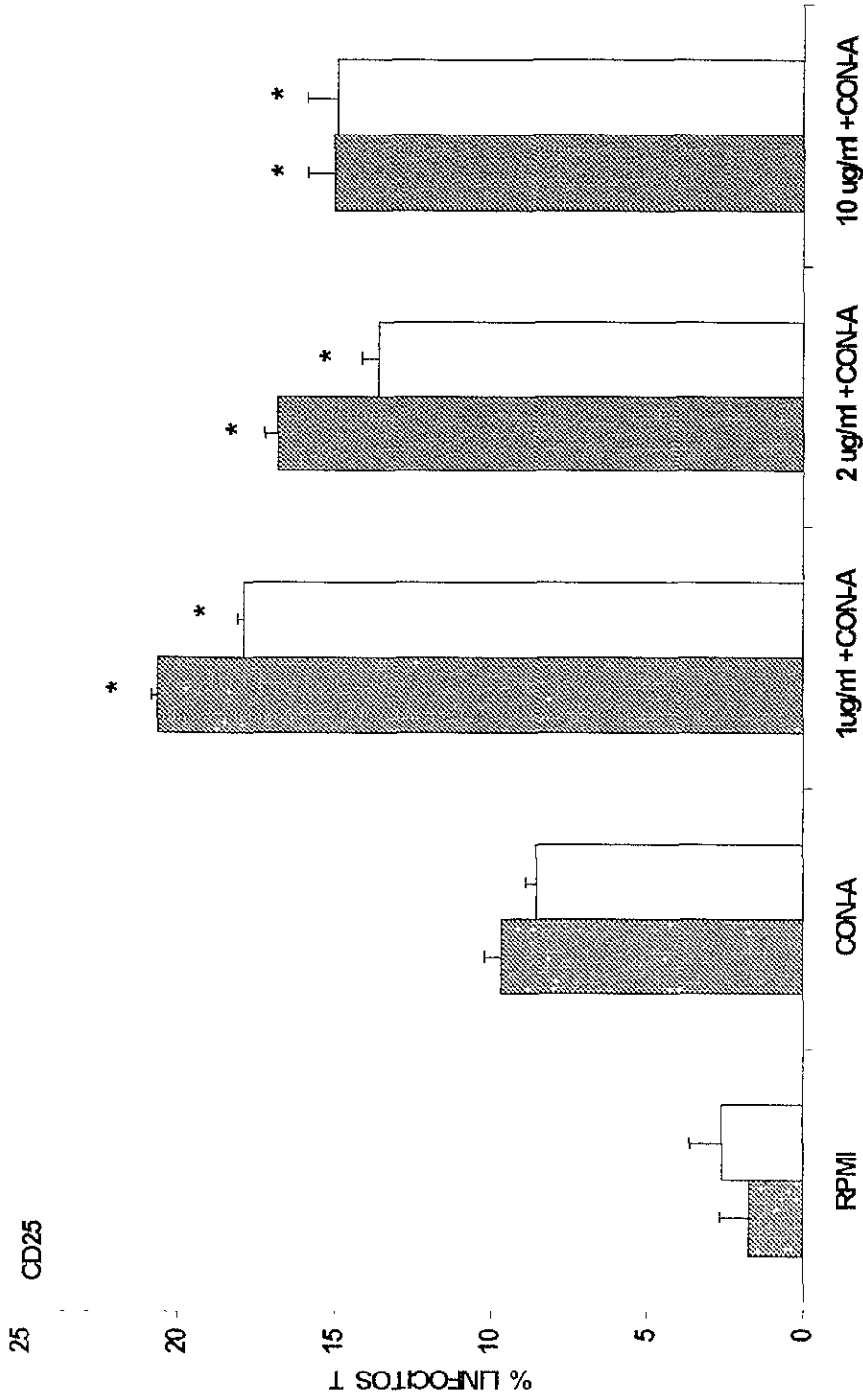


**FIGURA 9B.- Análisis de la producción de IL-2 en células T CD4 (barras grises) y CD8 (barras blancas) de ratones. Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción FMd y CON-A por 48 h. Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 5 experimentos independientes.**





**FIGURA 9C.-** Análisis de la producción de IL-4 intracelular en células T CD4 (barras grises) y CD8 (barras blancas) de ratones. Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción FMD y CON-A por 48 h. Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 5 experimentos independientes. \* $P < 0.05$ .



**FIGURA 9D.-** Expresión de CD25 en células T CD4 (barras grises) y CD8 (barras blancas) de ratones. Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción FMd y CON-A por 48 h. Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 5 experimentos independientes. \*P<0.05.

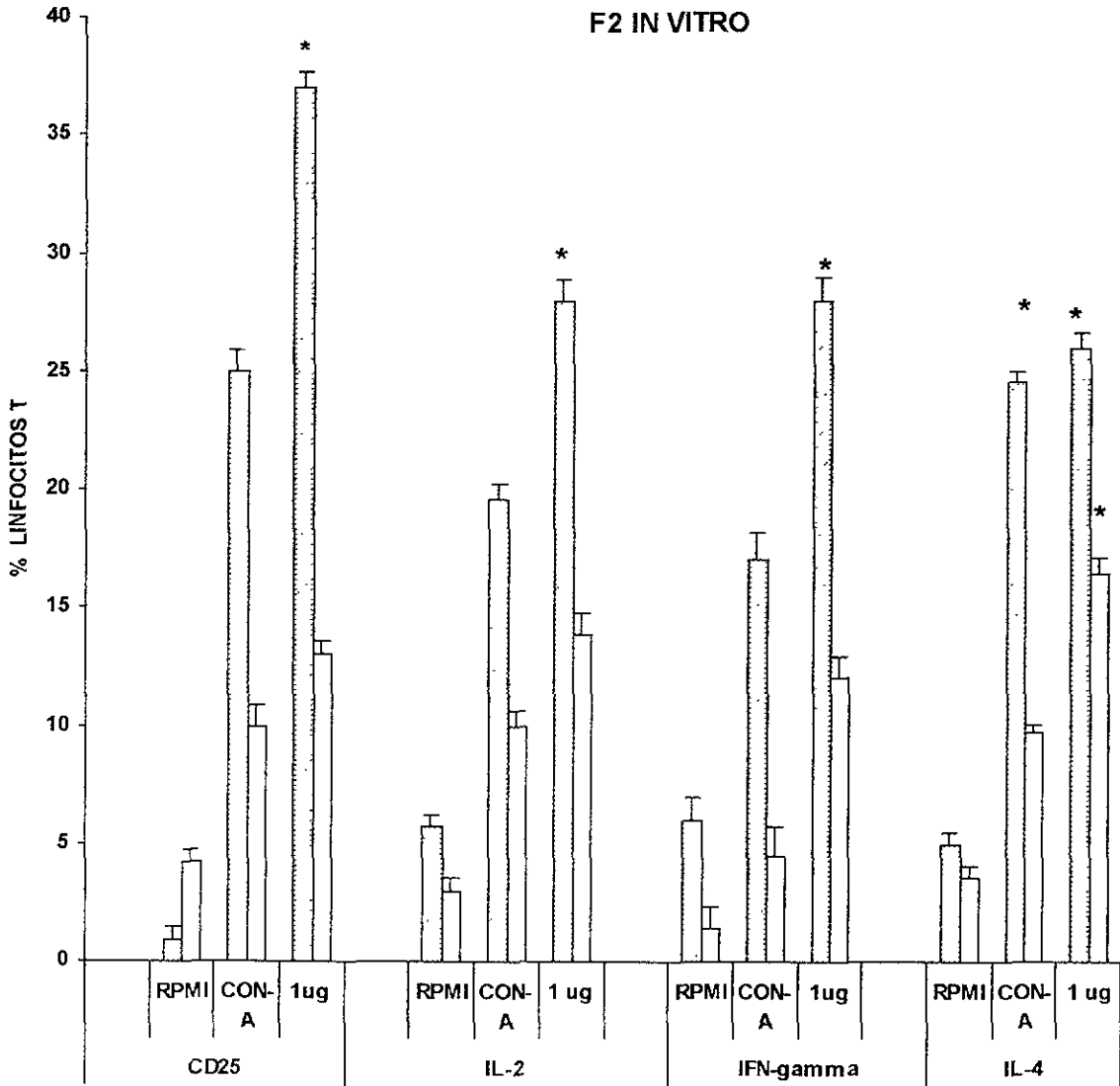
significativo en ambas subpoblaciones de células T en la expresión de CD25 con las tres dosis ( $P < 0.05$ , Fig. 9D).

Los resultados del tratamiento *in vitro* de los linfocitos murinos con la subfracción F2, se muestran en la figura 10. Se utilizaron dos dosis para estos ensayos, 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ . Se observó un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  con la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  tanto para linfocitos T CD4 y CD8 ( $P < 0.05$ ) con respecto a los valores con Con-A. IL-2 aumentó significativamente en las células T CD4 cuando se trataron con la dosis de 1  $\mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.05$ ) IL-4 se observó aumentada significativamente para linfocitos T CD4 y CD8 con la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  ( $P < 0.05$ ). La expresión de CD25 se observó también aumentada significativamente ( $P < 0.05$ ) en células CD4+ con la concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 10).

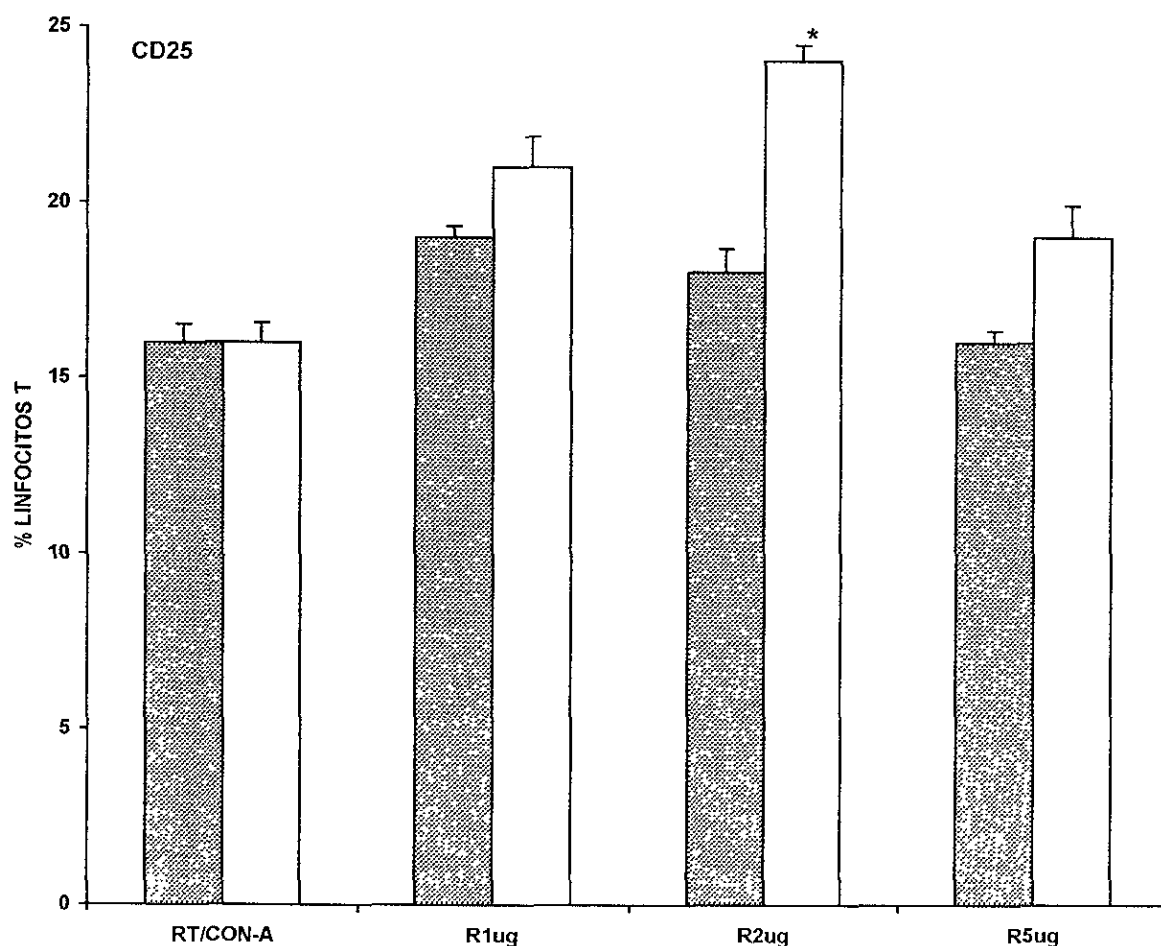
### **V.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA *EX VIVO* DEL FMD Y F2.**

#### **V.3.1. EXPRESIÓN DE CD25 Y CITOCINAS INTRACELULARES EN LINFOCITOS DE RATONES TRATADOS CON EL FMD Y F 2.**

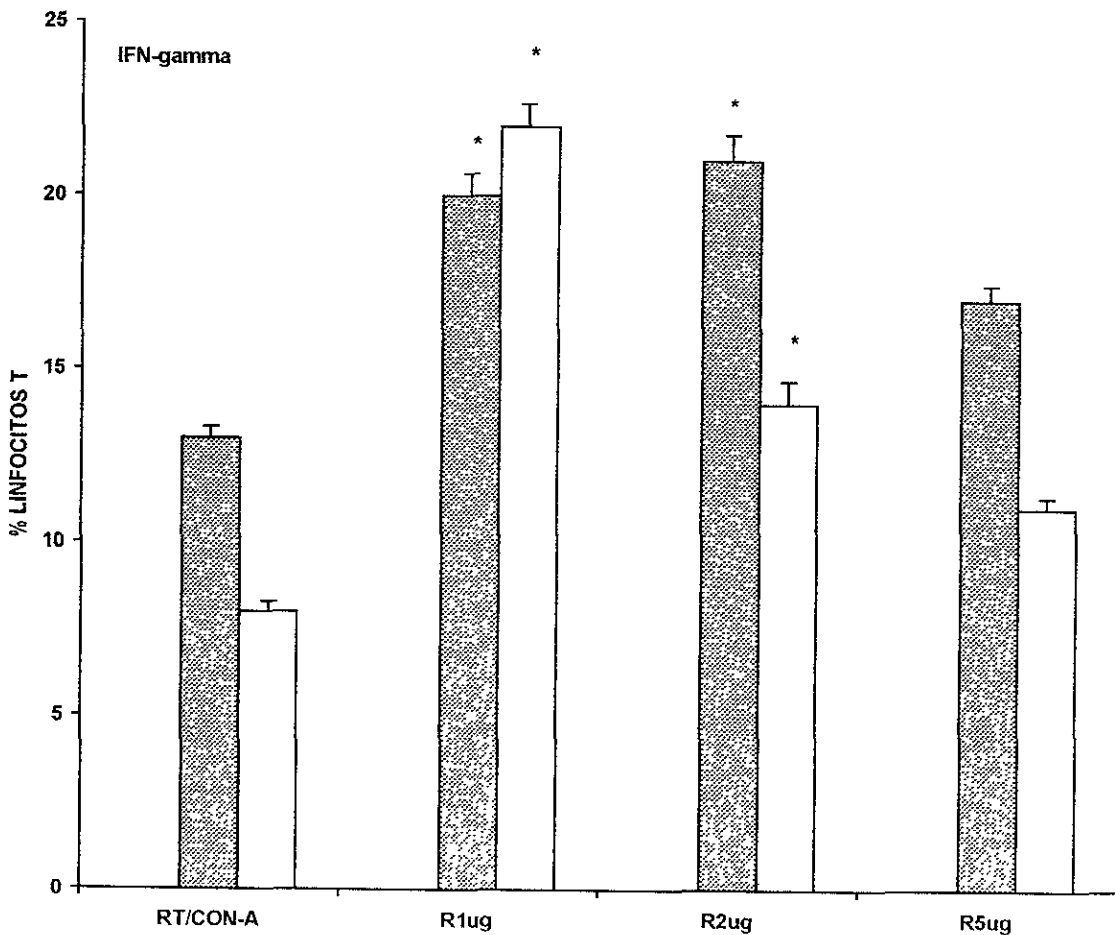
Se estimularon linfocitos esplénicos de ratones tratados con el FM por 48 h con Con-A. Se observó un aumento en la expresión del receptor de IL-2 (CD25) en los linfocitos de ratones tratados con las dosis de 1 y 2  $\mu\text{g}$  de proteína por gr de peso corporal del factor de metacéstodos digerido comparados con las células de ratones testigo (Figura.11A). La concentración de IFN- $\gamma$  intracelular fue mayor en células CD4 y CD8 de ratones tratados con las dosis de 1 y 2  $\mu\text{g/gr}$ , El aumento fue significativo con la dosis 2  $\mu\text{g/gr}$  (Fig. 12B,  $P < 0.05$ ). La interleucina 2 se observó



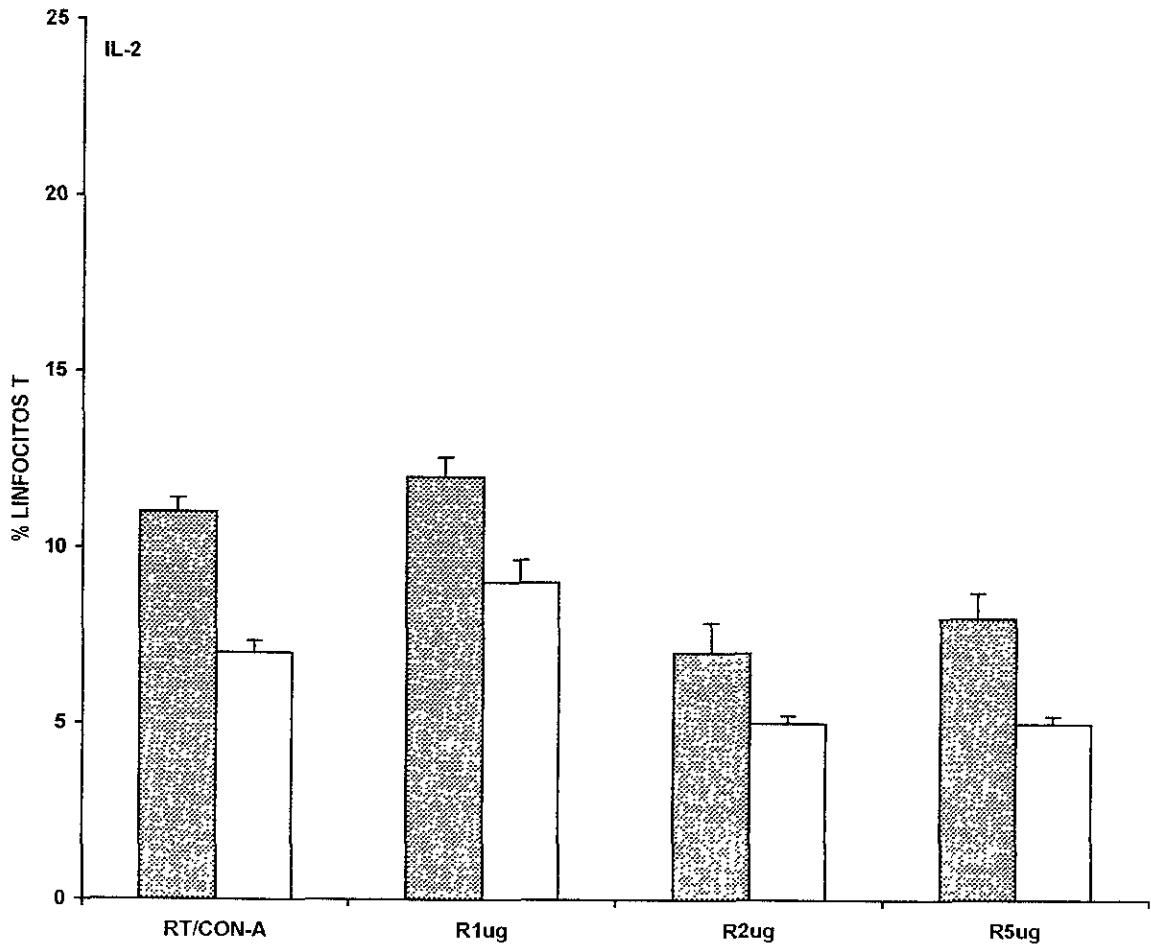
**FIGURA 10.-** Expresión de CD25 y de la producción de citocinas intracelulares en células T de ratones CD4 (barras grises) y CD8 (barras blancas). Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción F2 (1µg/ml) y CON-A por 48 horas. Se representan las medias ± DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 3 experimentos independientes. \*P<0.05.



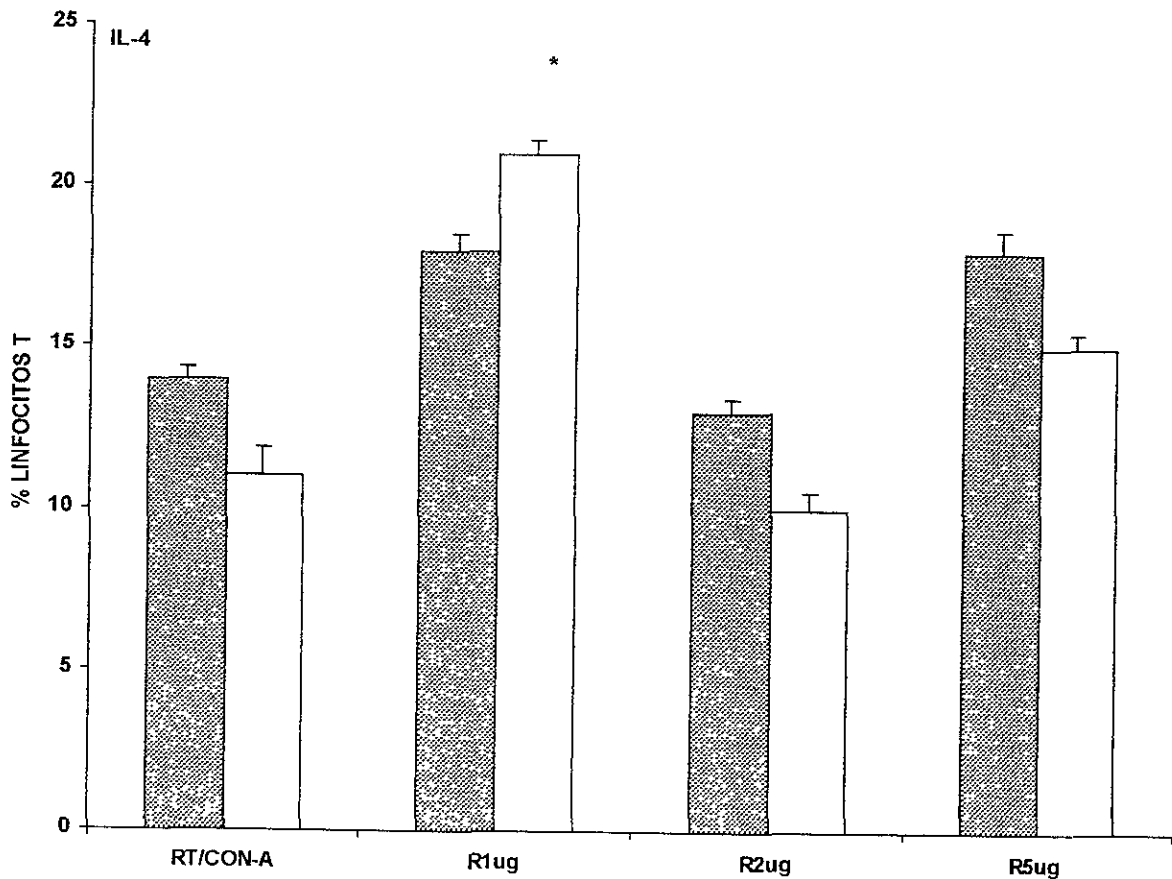
**FIGURA 11A.-** Expresión de CD25 en linfocitos T de ratones tratados con diferentes dosis del FMD ( $\mu\text{g}$  de proteína/gr de peso corporal). Al final del esquema de tratamiento, se obtuvieron los linfocitos esplénicos, se incubaron en presencia de CON-A por 48 h, se incluyó un pozo con RPMI. CD4 (barras negras), CD8 (barras blancas), RT (ratón testigo). Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentaje de 10,000 eventos. Resultados de cuatro experimentos independientes.  $*(P < 0.05)$



**FIGURA 11B.-** Análisis de la producción de IFN- $\gamma$  intracelular en linfocitos T de ratones tratados con diferentes dosis del FMD ( $\mu\text{g}$  de proteína/gr de peso corporal). Al final del esquema de tratamiento, se obtuvieron los linfocitos esplénicos, se incubaron en presencia de CON-A por 48 h, se incluyó un pozo con RPMI. CD4 (barras negras), CD8 (barras blancas), RT (ratón testigo). Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentaje de 10,000 eventos. Resultados de cuatro experimentos independientes. \*( $P < 0.05$ )



**FIGURA 11C.-** Análisis de la producción de IL-2 intracelular en linfocitos T de ratones tratados con diferentes dosis del FMD ( $\mu\text{g}$  de proteína/gr de peso corporal). Al final del esquema de tratamiento, se obtuvieron los linfocitos esplénicos, se incubaron en presencia de CON-A por 48 h, se incluyó un pozo con RPMI. CD4 (barras negras), CD8 (barras blancas), RT (ratón testigo). Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentaje de 10,000 eventos. Resultados de cuatro experimentos independientes.  $*(P<0.05)$



**FIGURA 11.D.-** Análisis de la producción de IL-4 intracelular en linfocitos T de ratones tratados con diferentes dosis del FMD ( $\mu\text{g}$  de proteína/gr de peso corporal). Al final del esquema de tratamiento, se obtuvieron los linfocitos esplénicos, se incubaron en presencia de CON-A por 48 h, se incluyó un pozo con RPMI. CD4 (barras negras), CD8 (barras blancas), RT (ratón testigo). Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentaje de 10,000 eventos. Resultados de cuatro experimentos independientes. \*( $P < 0.05$ )



ligeramente aumentada con la dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{gr}$  en ambas poblaciones (Fig. 11C). En la figura 11D, se observan los valores de producción de IL-4, se obtuvieron valores significativos en los linfocitos TCD8 ( $P<0.05$ ). únicamente con la dosis de 1  $\mu\text{g}/\text{gr}$  de proteína por gr de peso corporal de ratón

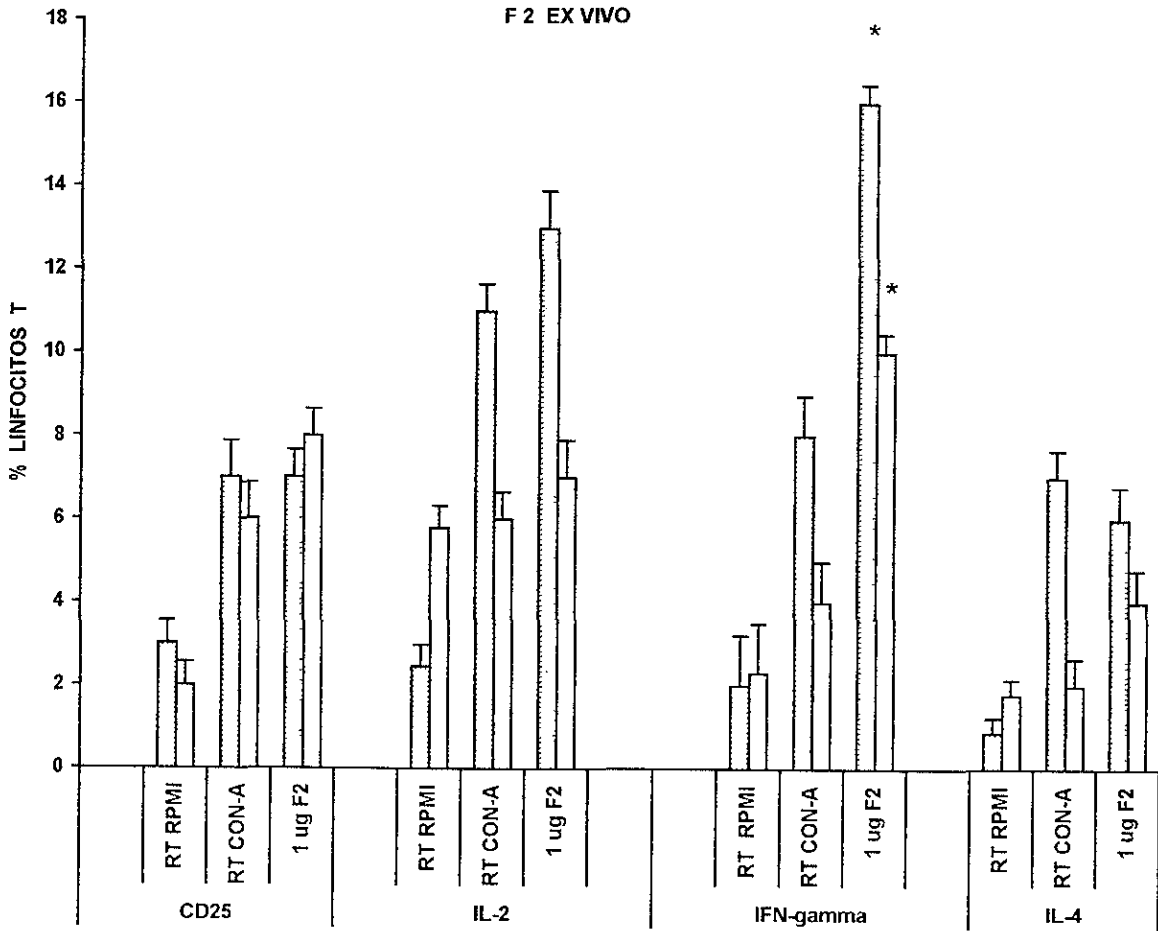
La subfracción F2 indujo aumento en la concentración de IFN- $\gamma$  en las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 de los ratones tratados, este aumento fue significativo ( $P<0.05$ ). Se observó también un discreto aumento en la producción de IL-2 e IL-4, así como en la expresión de CD25 (Fig.12).

### **V.3.2. EXPRESIÓN DE CD69 EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS RATONES TRATADOS CON EL FMd.**

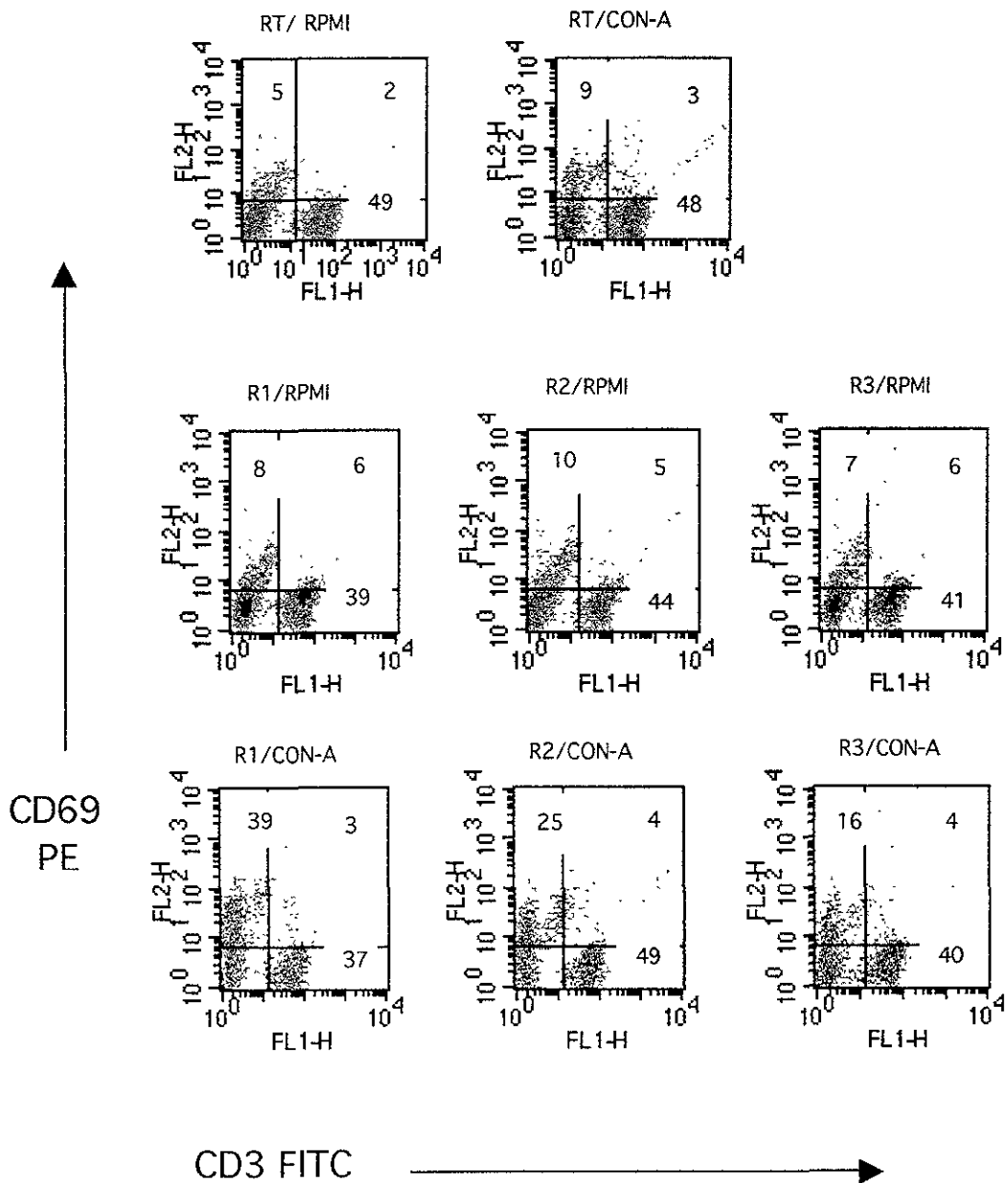
Para medir la expresión de CD69 en células CD3, se tomó sangre periférica de la punta de la cola de los ratones tratados con el FMd. Las células de sangre periférica de los ratones testigos fueron incubadas en presencia de Con-A por 4 h. El análisis por citometría de flujo mostró aumentada la expresión de CD69 en la población de células CD3- de los ratones tratados con 1 $\mu\text{g}/\text{gr}$  del FMd en comparación con los valores de células testigo. La población CD3- CD69+ de los controles estimulados presentaron valores de 9 %. En contraste las células de los ratones tratados con 1  $\mu\text{g}/\text{gr}$  del FMd mostraron un marcado aumento de la expresión de CD69+ ( 39% vs 9%), ver figura 13.

### **V.3.3. EFECTO DEL FMd EN RATONES DISMINUÍDOS DE CÉLULAS T CD4.**

Se investigó como influye el FMd en el reestablecimiento de la



**FIGURA 12.** Expresión de CD25 y de la producción de citocinas intracelulares en linfocitos T de ratones. Los ratones fueron tratados con 1µg de proteína de la subfracción F2/ gramo de peso corporal. Al final del esquema de tratamiento, se obtuvieron los linfocitos esplénicos, se incubaron en presencia de CON-A por 48 h, se incluyó un pozo con RPMI. CD4 (barras grises); CD8 (barras blancas), RT (ratones testigos) . Se presentan las medias ± DE de los valores en porcentaje de 10,000 eventos. Resultados de 3 experimentos independientes. \*P<0.05

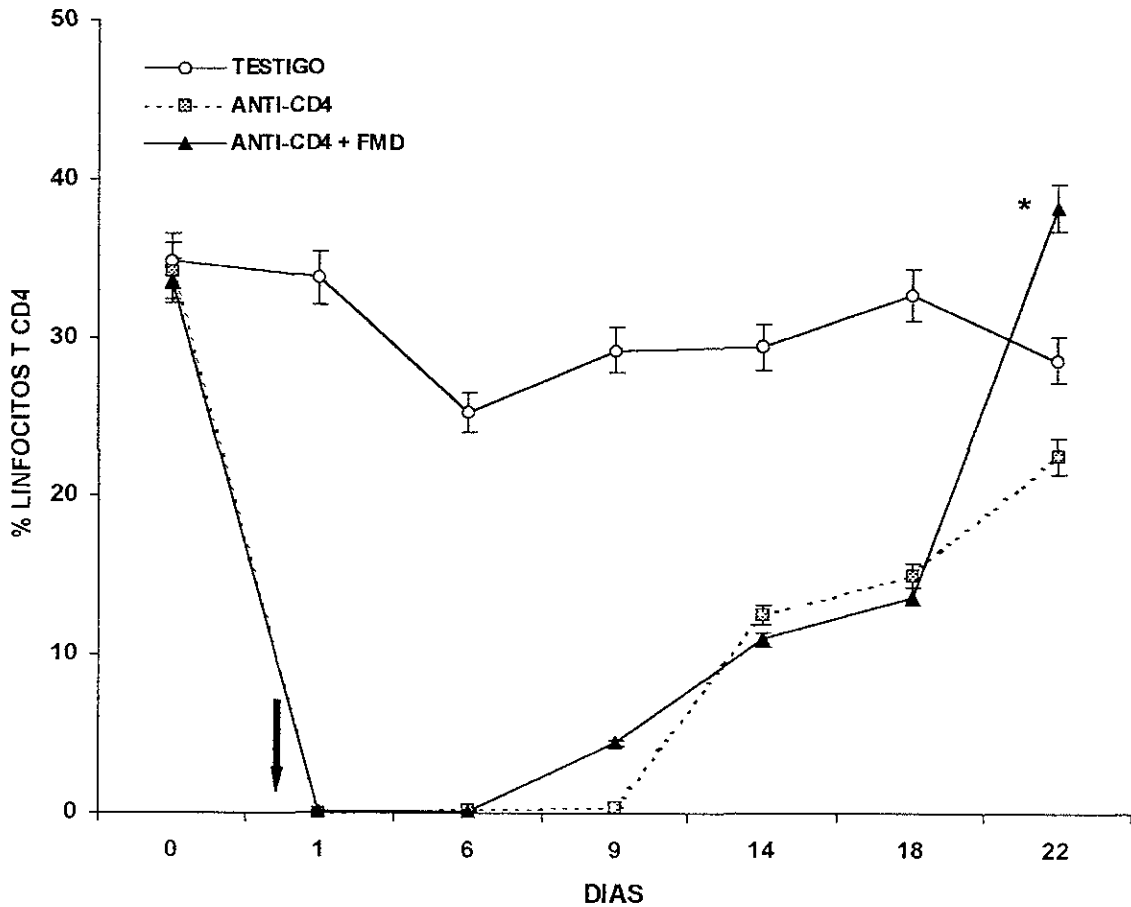


**FIGURA 13.-** Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD69 en células de sangre periférica de ratones tratados *in vivo* con el FMD (1µg/gr de proteína por g. peso corporal). Las células fueron obtenidas a partir de sangre periférica de la cola, se estimularon con CON-A por 4h. Se presentan los valores en porcentajes en los cuadrantes. RT (ratones testigos); R1, R2, R3 (ratones tratados con FMD); FL1 (CD3-FITC); FL2 (CD69-PE). Experimento representativo de dos independientes.

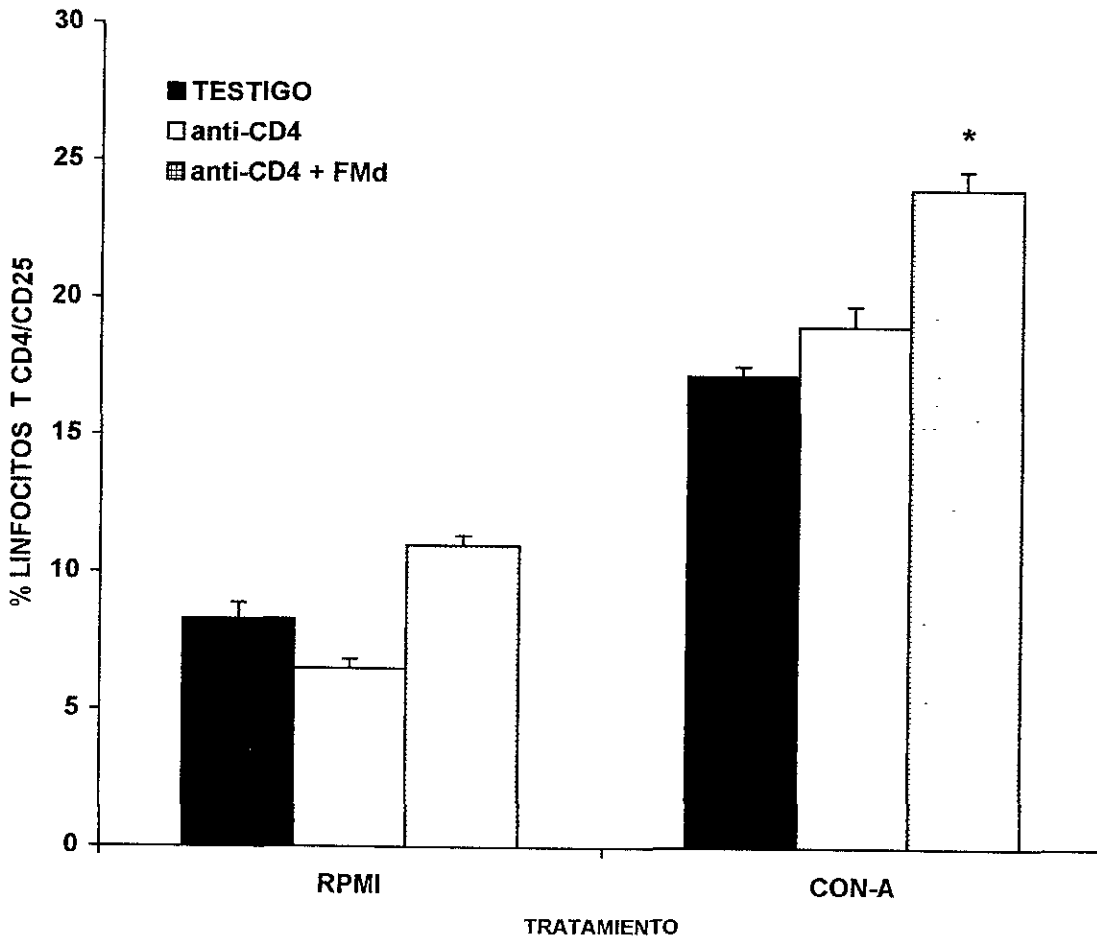
población de células T CD4 ratones sanos tratados previamente con anticuerpos monoclonales anti-CD4. Los ratones tratados con el FMd presentaron un discreto aumento del marcador CD4 para el día 9, con respecto a los ratones testigos disminuidos de CD4, para el día 22, la expresión de CD4 fue significativamente más alta en las células de los ratones tratados con el FMd que en los controles (38.2% vs 22.6 % respectivamente,  $P < 0.05$ ) (Fig. 14) Después del análisis de la cinética de recuperación del marcador CD4, se sacrificaron los ratones y se determinó la expresión de CD25 de sus células esplénicas incubadas con Con-A por 48 h; la expresión de CD25 fue más alta células de los ratones tratados con el factor que sus testigos disminuidos de CD4, ver figura 15 .

### **V.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL FMd EN LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA.**

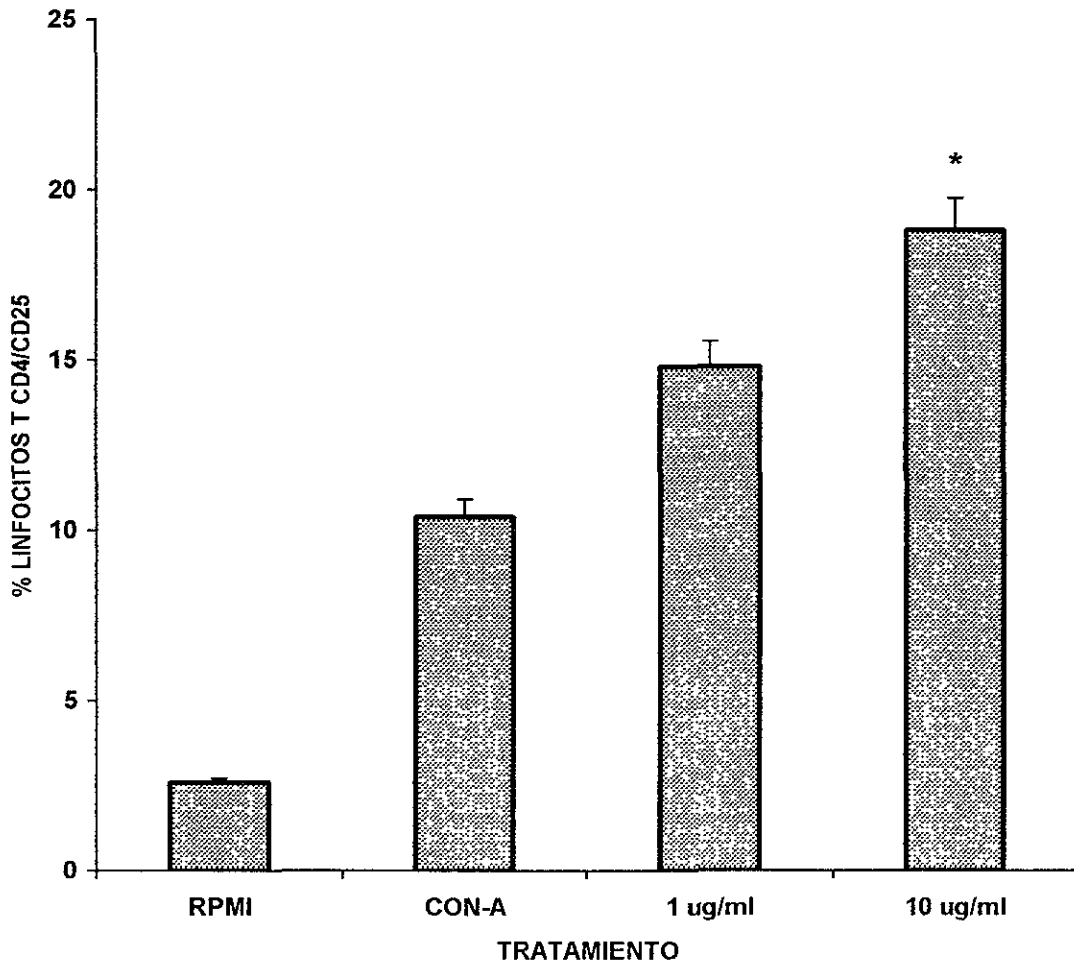
**V.4.1. EXPRESIÓN DE CD25 EN LINFOCITOS T HUMANOS.** Cuando se trataron células humanas con las dosis de 1 y 10  $\mu\text{g/ml}$ , se observó un marcado aumento de la expresión de CD25 en las células T CD4, con efecto dependiente de la dosis ( $P < 0.05$ ) (Fig. 16). Los resultados del análisis por citometría de flujo de un experimento representativo del efecto de dosis dependiente es señalado en la figura 17. Se analizó el efecto del FMd en linfocitos humanos provenientes de un individuo clínicamente sano cuya población de células T CD4 estaba por debajo de los valores normales (valores normales 29-53%). En la figura 18 se observa un aumento de la expresión de CD25 con la dosis de 4  $\mu\text{g/ml}$  del FMd.



**FIGURA 14.-** Cinética de la recuperación de linfocitos T CD4+ en ratones disminuidos con anticuerpos anti-CD4 purificados (Pharmigen). Ratones testigos (círculos abiertos); ratones disminuidos con anti-CD4 (cuadros grises); ratones disminuidos con anti-CD4 y tratados con el FMd (triángulos negros). La flecha indica la dosis única de anticuerpos anti-CD4+ (100 $\mu$ g); Se presentan las medias  $\pm$  DE, N=3. (\*P<0.05)



**FIGURA 15.-** Expresión de CD25, en ratones tratados con anticuerpos anti-CD4 (100 $\mu$ g) y FMd (1 $\mu$ g/gr peso corporal). Al final del esquema de tratamiento, se obtuvieron los linfocitos esplénicos, se incubaron en presencia de CON-A por 48 h, se incluyó un pozo con RPMI. Ratones testigos ( barras negras), ratones disminuídos de CD4+ (barras blancas), ratones disminuídos de CD4+ y tratados con el FMd (barras grises). Se presentan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de tres experimentos independientes. \*  $P < 0.05$  (CON-A: anti-CD4+FMd vs Testigo)



**FIGURA 16.-** Expresión de CD25 en linfocitos humanos tratados *in vitro* con el factor de metacéstodos digerido (FMd) y CON-A por 48 h. Se representa la media  $\pm$  DE de 5 experimentos independientes. (CON-A vs FMd 10.0  $\mu$ g/ml.; \*P<0.05)

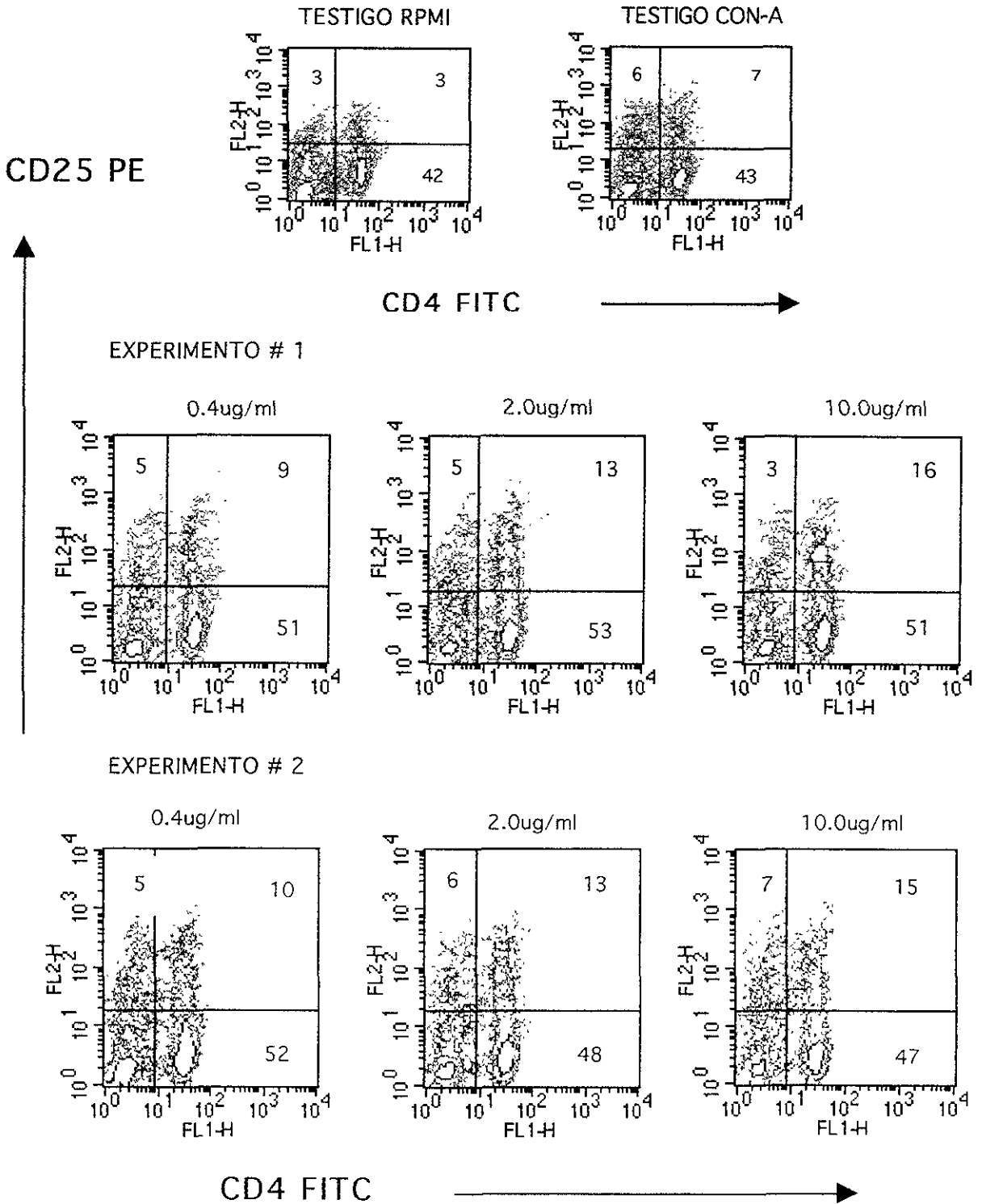
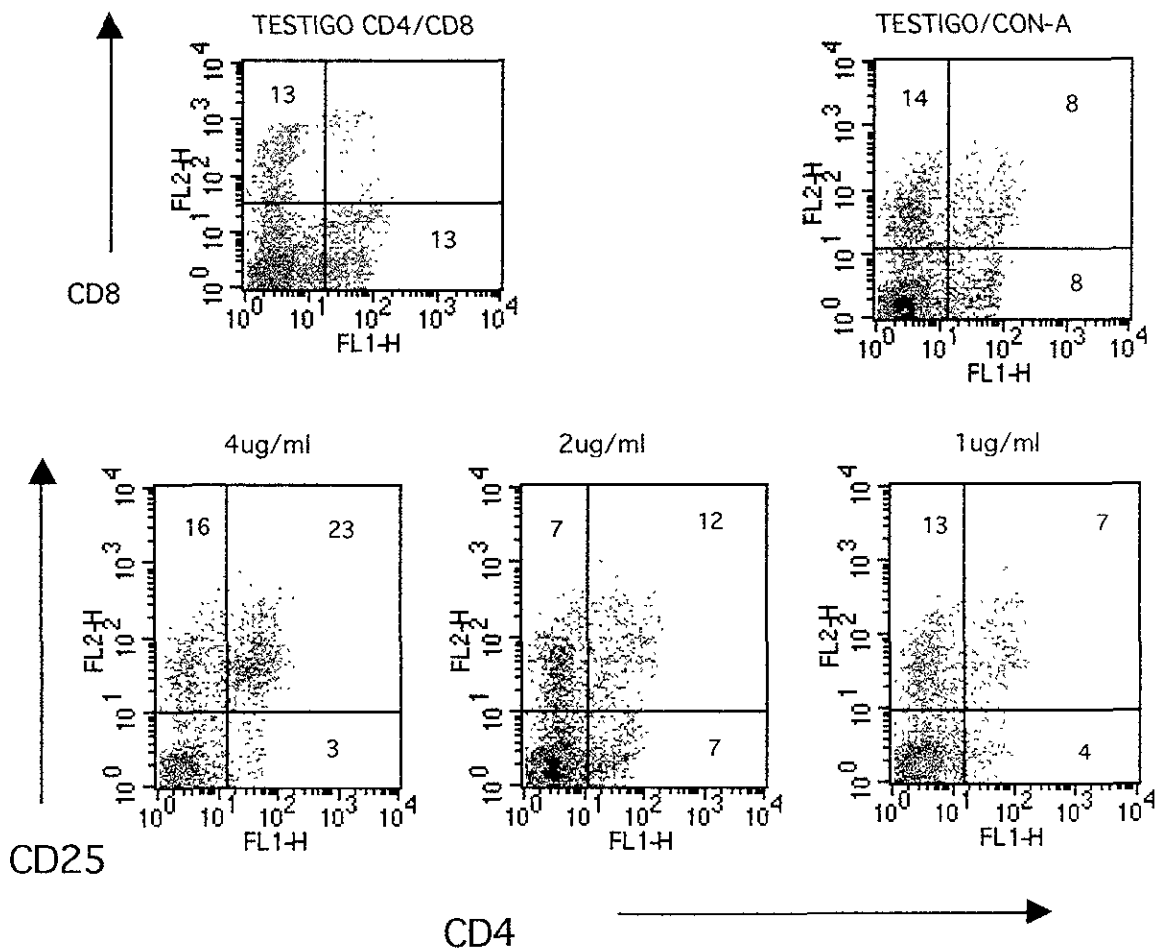


FIGURA 17.-



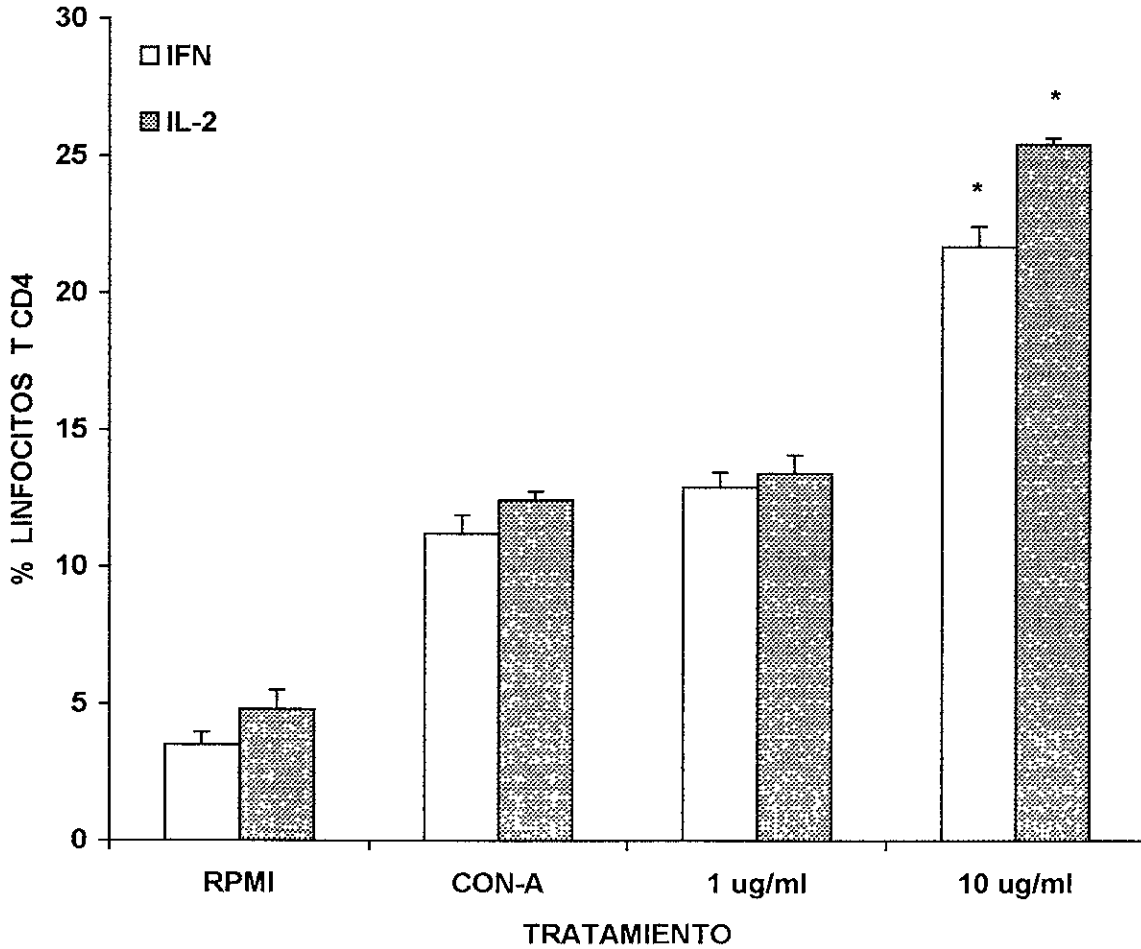
**FIGURA 17.- Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD25 en linfocitos T CD4 humanos estimulados con Con-A y el FMd. Los linfocitos fueron tratados con Con-A y FMd (0.4 $\mu$ g/ml, 2.0  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) por 48 h. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4-FITC (FL1-H) y anti-CD25-PE (FL2-H). Se incluyen testigos de estimulación con Con-A y células en RPMI. Se muestran los valores en porcentajes de 10,000 eventos calculados para cada cuadrante. Resultados representativos de 7 experimentos independientes.**



**FIGURA 18.-** Análisis por citometría de flujo de la expresión de CD25 en linfocitos T CD4 humanos estimulados con Con-A y el FMD. Los linfocitos fueron tratados con Con-A y FMD (0.4 $\mu$ g/ml, 2.0  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml) por 48 h. Las células fueron teñidas con anticuerpos anti-CD4-FITC (FL1-H) y anti-CD25-FITC.(FL2-H) Se incluyen testigos de estimulación solamente con Con-A y células en RPMI. Se muestran los valores en porcentajes de 10,000 eventos calculados para cada cuadrante.

### **V.4.2.PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES EN LINFOCITOS HUMANOS.**

La producción de citocinas intracelulares en linfocitos T humanos tratados con el FMd se observa en la figura 19. Las células tratadas con 10 µg/ml produjeron mayor cantidad de IL-2 (20% vs 12% del control con Con-A;  $P < 0.05$ ). También se indujo un aumento significativo en la producción de IFN- $\gamma$  en las células tratadas con dosis de 10 µg/ml. No se observó aumento en la producción de IL-4 (datos no mostrados).



**FIGURA 19.-** Análisis de la producción de citocinas intracelulares en células T CD4 humanas. Las células fueron estimuladas simultáneamente con la subfracción FMd y CON-A por 48 h *in vitro*. IFN- $\gamma$ , (barras blancas); IL-2, (barras grises). Se representan las medias  $\pm$  DE de los valores en porcentajes de 10,000 eventos. Resultados de 3 experimentos independientes. \*P<0.05.

## VI. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las cromatografías del factor de metacésto crudo sugieren que este factor está compuesto de dos componentes activos. Cuando el factor crudo es digerido con ribonucleasa A (FMd) el patrón de elusión cambia, perdiéndose el pico 1 tanto en las cromatografías en Bio-Gel P-6 como en Bio-Gel-P-2. El uso de la columna de Bio-Gel P-2 para obtener una mejor separación de los componentes del FM, mostró un perfil cromatográfico con mayor cantidad de picos, donde la subfracción estimuladora se ubicó en el pico 4. Este pico (o subfracción F2) presentó valores de DO a 260 nm y 280 nm similares en las cromatografías del FM crudo, digerido y del obtenido a partir de Bio-Gel P-6. Los valores de DO a 260 nm en el pico 4 o F2, muestran que esta molécula de bajo peso molecular contiene, probablemente algún péptido de bajo peso molecular determinado por el método de Bradford. Es interesante resaltar que los valores de densidad óptica obtenidos al analizar la subfracción estimuladora a 260 nm se mantienen después de la digestión con ribonucleasa. La difícil obtención del material no ha permitido concluir el análisis de su composición por resonancia magnética nuclear.

Por otro lado el aumento de la proliferación en los ensayos de incorporación de timidina tritiada con la subfracción F2 del FM; y el aumento de la expresión de CD25 en linfocitos tratados con el FM digerido y con F2 sugieren que la subfracción (F2 y FMd) podrían contener el mismo componente activo. Estos resultados confirman y añaden información a lo reportado por Tato y cols. (1995).

Las células obtenidas de ratones testigos, tratadas con la subfracción (FMd) aumentaron la expresión de CD25 por arriba de los

valores obtenidos con el tratamiento sólo del mitógeno. Estos resultados muestran que las subfracciones del FM estimulan a las células T, solo en presencia del mitógeno. Este efecto va acompañado de un patrón de producción de citocinas intracelulares con un aumento significativo de IFN- $\gamma$  ( $P < 0.05$ ), IL-2, e IL-4.

Por otro lado, el aumento de las células T CD4 en los ratones tratados con anticuerpo monoclonal anti-CD4 y con FMd comparada con la de ratones testigos ( $P < 0.05$ ), indica un alto potencial de tipo farmacológico como inmunoestimulante en entidades patológicas donde la población de linfocitos CD4 está disminuída.

La respuesta inmune celular juega un papel importante en la resistencia a las infecciones con patógenos intracelulares (Hahn y Kaufmann, 1981). La respuesta tipo Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-2) en ratones infectados con microorganismos intracelulares (tales como *Salmonella typhimurium*, *Leishmanias*) induce resistencia a este tipo de infecciones (Yang y cols., 1990, Ramarathinam y cols., 1993, Pie y cols., 1997). El modelo de infección con *Salmonella typhimurium* utilizado para probar el efecto FMd en ratones sanos (Molinari y cols., 1989) mostró un efecto estimulante del FMd, ya que aumentó el porcentaje de sobrevivencia (80%) de los ratones infectados con *S. typhimurium*, tratados con el FMd comparado con el grupo testigo del cual solo sobrevivió el 10%. En experimentos *in vitro*, la infección de esplenocitos murinos con *S. typhimurium* induce una elevada producción de IFN- $\gamma$  en los linfocitos y en las células NK, lo que sugiere un papel importante en la defensa del hospedador contra esta infección. (Ramarathinam y cols., 1993) Nuestros resultados sugieren que la subfracción estimuladora del FMd o F2 induce una diferenciación de los

linfocitos T CD4 al subgrupo Th1, ya que aumenta la producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 en los linfocitos de los ratones tratados con el factor y estimulados con Con-A. Los resultados de este trabajo junto con los hallazgos reportados por Molinari y cols., (1989) apoyan la idea de que el FM activa a los linfocitos hacia el tipo de respuesta Th1. Tanto las células T CD4 y T CD8 son inducidas a producir IFN- $\gamma$  e IL-2 (Fig. 9A y 10), lo que sugiere un efecto sinérgico de ambas poblaciones en la producción de las citocinas (Gazzinelli y cols.,1991). Desconocemos cuales son los eventos moleculares, que inducen esta diferenciación de la respuesta inmune hacia el tipo Th1. Probablemente también estén participando las células NK en la inducción hacia Th1, como parte del efecto del tratamiento con la subfracción estimulatoria del factor de metacéstodos. Estos resultados están en concordancia con lo encontrado por otros autores (Ramarathinam y cols., 1993) quienes señalan que las células T y NK juegan un papel primordial en la respuesta inmune frente a *S. typhimurium*. Es importante destacar que el FM promueve la desviación de la respuesta celular de tal forma, que cuando los ratones son infectados con dosis letales de *S. typhimurium* estos resuelven la infección significativamente aunque menor a los que han sido previamente vacunados contra *S. typhimurium* (Molinari y cols., 1989) Estos hallazgos sugieren la existencia de un mecanismo independiente de la vía de presentación a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) para la estimulación de las células T. Es decir el FM induce un efecto inmunomodulador sobre las células T de forma tan eficaz como si utilizara la vía de presentación de antígeno a través de macrófagos y células dendríticas (Yrlid y cols., 2000). Este efecto inmunomodulador se ha observado en otros compuestos, tales

como el muramyl dipéptido (MDP), un constituyente esencial de las bacterias gram positivas, y su análogo sintético. El MDP, es un pequeño glycopéptido, capaz de activar la inmunidad no específica y de ejercer un efecto inmuno-adyuvante en las enfermedades infecciosas. (Schreck y cols., 1992). El MDP se probó en ratones infectados con *Toxocara canis*, restableciendo y estimulando significativamente la habilidad fagocítica inhibida por el parásito de los leucocitos polimorfonucleares, la actividad metabólica de los macrófagos y la respuesta proliferativa de los linfocitos T (Dvoroznakova y cols., 1999). Como el único modelo hasta ahora probado ha sido la infección por *S. typhimurium*, sería interesante analizar como es la respuesta inmune en otro modelo de infección intracelular en ratones.

Finalmente, el efecto del FM no está restringido a linfocitos murinos, ya que también estimula células humanas. Estos resultados nos sugieren que el poder estimulante de la subfracción del FM podría ser inespecífica entre especies. La caracterización bioquímica del FMd ayudaría en un futuro a entender los mecanismos involucrados en la modulación de la respuesta inmune, así como su utilidad como fármaco estimulante del sistema inmune, ya que se trata de un compuesto de muy bajo peso molecular que estimula las células T. Los péptidos inmuno-estimulantes o inmuno reconstituyentes tienen muchas posibilidades para el uso terapéutico, tal como adyuvantes de vacunas pobremente inmunogénicas, para reforzar las defensas frente a infecciones, para inmunoterapia de síndromes de inmunodeficiencias y de cancer (Werner, 1987).

Molinari y cols. (1995) mostraron que el factor inhibitorio no actúa sobre los monocitos esplénicos *in vitro*, ya que monocitos incubados en



presencia del factor inhibitorio y luego los colocaron con linfocitos y no mostraron inhibición de la proliferación de los linfocitos. Por lo que el mecanismo que se sugiere es directo sobre las poblaciones de linfocitos T. El alto contenido en carbohidratos del FM sugiere también que este puede adherirse a receptores tipo lectinas que tienen dominios de unión a carbohidratos que tengan capacidad de activación de la células como por ejemplo CD69. Este receptor es rápidamente inducible en células NK (Santis, y cols., 1994; Borrego, y cols., 1999). CD69 es rápidamente inducible en células NK después de la activación (Borrego, y cols., 1999).

## VII. CONCLUSIONES

a) El factor de metacéstono ( FMd y F2) tiene la capacidad de inducir la proliferación y producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4, en linfocitos T.

b) El FMd es capaz de reestablecer la población de linfocitos T CD4 en ratones disminuidos de CD4.

c) El efecto estimulante de FMd y F2 sobre linfocitos murinos y humanos sugieren que su actividad biológica es inespecífica entre especies.

d) Los análisis físico químico y de actividad biológica del FMd y F2 sugieren que estas subfracciones contengan el mismo componente activo.

e) Estos resultados indican que este factor de metacéstono tiene un importante potencial farmacológico como un inmuno estimulante.

## VIII. REFERENCIAS

- ACEVEDO HERNÁNDEZ, A. 1982. Economic impact of porcine Cysticercosis. In: Cysticercosis: Present state of knowledge perspectives. A Flisser, K. Willms., J.P. Lacleste., C. Larralde, C. Riadura., F. Beltrán. (Eds), Academic Press, New York, pp. 63-68.
- ABBAS, A. K., MURPHY, K. M., AND SHER, A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**: 787-793.
- ALLEN, J. E. AND MACDONALD, A. S. 1998. Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunology* **5**: 241-247.(falta artículo).
- ALUJA, A., AND VARGAS, G. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* **28**: 65-77.
- ASHWELL, G. 1957. Colorimetric analysis of sugars. In "Methods in Enzymology" (Colowick, S., Kaplan, N. Eds.), pp. 87-90. vol. 3. *Academic Press*, NY.
- AURIAULT, C., DESSAINT, J. P., MAZINGUE, C., LOYENS, A., AND CAPRON, A. 1984. Non-specific potentiation of T- and B- lymphocyte proliferation at the stage of infection by *Schistosoma mansoni*: role of factors secreted by the larvae. *Parasite Immunology* **6**: 119-129.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annales of Biochemistry* **72**: 248-254.
- BERN, C., GARCIA, H. H., EVANS, C., GONZALEZ, A. E., VERASTEGUI, M., TSANG, V. C., AND GILMAN R. H. 1999. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clinical Infectious Diseases* **29**:1203-9.
- BORREGO, F., ROBERTSON, M.J., RITZ, J., PEÑA, J., & SOLANA, R. 1999. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effects is blocked

- by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* **97**: 159-165.
- CAÑEDO, L., LACLETTE, J. P., AND MORALES, E. 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. In "Cysticercosis, Present state of knowledge and perspective" (Flisser A., Willms K., Laclette J. P., Larralde C., Riadura C., Beltran F., Eds), pp. 363-373. *Academic Press*, New York.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1992. Locally Acquired Neurocysticercosis- North Carolina, Massachusetts, and South Carolina, 1989-1991. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)* **41**:1-4
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2001. Division of Parasitic Diseases. Parasitic Disease Information. Cysticercosis <http://www.cdc.gov/dpd/parasites/cysticercosis/default.htm>
- COFFMAN, R. L., MOCCI, S., AND O'GARRA, A. 1999. The stability and Reversibility of Th1 and Th2 Populations. In : "Redirection of Th1 and Th2 response" (Coffman R.L and Romagnani S (Eds)). pp 1-10. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **230**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- CROFT, M. AND SWAIN, S. L. 1995. Recently activated naive CD4 T cells can help resting B cells, and can produce sufficient autocrine IL-4 to drive differentiation to secretion of T helper 2-type cytokines. *The Journal of Immunology*. **154**: 4269-4281.
- DA CUNHA E SILVA, N., L., HASSON-VOLOCH, A., DE SOUZA, W. 1989. Isolation and characterization of a highly purified flagellar membrane fraction from trypanosomatids. *Molecular Biochemical Parasitology* **37**:129-36
- DEPPER, J. M., LEONARD, W. J., DROGULA, C., KRONKE, M., WALMANN, T. A., AND GREENE, W. C. 1985. Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **82**: 4230-4234.

- DIXON, H. B. F., AND LIPSCOMB, F. M. 1961. Cysticercosis: A analysis and follow-up of 450 cases. (Medical Research Council special report series, vol. 299), pp.1-56. Her Majesty's Stationary Service, London.
- DVOROZNAKOVA, E., BOROSKOVA, Z., DUBINSKY, P., TOMASOVICOVA, O., HRIBALOVA, V., MACHNICKA, B.1999. Immunomodulative effect of muramyldipeptide in mice with larval toxocarosis. *Parasitology Research* **85**: 1034-1040.
- ESCOBAR, A. 1983. The pathology of neurocysticercosis. In "Cysticercosis of the Central Nervous System" (E. Palacios, J. Rodríguez, and J. M. Taveras. Eds.) pp. 27-54. Thomas, Springfield. IL.
- EVANS, C., GARCIA, H. H., GILMAN, R. H., FRIEDLAND, J. S.1997. Controversies in the Management of Cysticercosis. *Emerging Infectious Diseases* **3**:403-405
- FAUST, E. C., RUSSELL, P. F., JUNG, R. C. 1982. Helmintos e infecciones helmínticas. En: Parasitología Clínica. Salvat Editores, S.A. Primera Edición, pp 530-536, Barcelona, España.
- GARCIA, H. H. AND DEL BRUTTO, O. H. 2000. Emerging and re-emerging diseases in Latin America. Teania solium cysticercosis. *Infectious Diseases Clinics of North America*. **14**: 97-119.
- GAZZINELLI, R.T., HANKIM, F.T., HIENY, S., SHEARER, G.M., AND SHER, A. 1991. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induce by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Journal of Immunology* **146**: 286-296
- GOMES, N. Y., PREVIATO, J. O., ZINGALES, B., MENDONÇA-PREVIATO L., AND DOSREIS, G. A. 1996. Down-regulation of T Lymphocyte activation *in vitro* and *in vivo* induced by Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. *The journal Immunology* **156**: 628-635.
- HANSEN, D. S., VILLACRES-ERIKSSON, M., AKERBLOM, L., HELLMAN, U., SEGURA, E., CARLOMAGNO, M., MOREIN, B. 1998. An immunoaffinity-purified *Trypanosoma*

- cruzi* antigen suppresses cellular proliferation through a TGF-beta-mediated mechanism. *Scandinavian Journal of Immunology* **47**:509-516
- HERRERA, L. A., SANTIAGO, P., ROJAS, G., SALAZAR, P. M., TATO, P., MOLINARI, J. L., SCHIFFMANN, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. 1994. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutation Research* **305**:223-228
- HSIEH, C. S., MACATONIA, S. E., O'GARRA, A., MURPHY, K. M. 1995 T cell genetic background determines default T helper phenotypes development in vitro. *Journal Experimental Medicine* **181**: 713-721.
- JANSSEN, D., RUEDA, M. C., DE RYCKE P. H., & OSUNA, A. 1997. Immunomodulation by hydatid cyst fluid toxin (*Echinococcus granulosus*). *Parasite Immunology* **19**: 149-160.
- KARANU, F. N., MCGUIRE, T. C., DAVIS, W. C., BESSER, T. E., & JASMER, D. P. 1997. CD4<sup>+</sup> T lymphocytes contribute to protective immunity induced in sheep and goats by *Haemonchus contortus* gut antigens. *Parasite Immunology* **19**: 435-445.
- KING C. L., AND NUTMAN T.B. 1991 Regulation of the immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Parasitology Today* **12**(A): 54-58
- LACLETTE, J. P., SHOEMAKER, C. B., RICHTER, D., ARCOS, L., PANTE, N., COHEN, C., BING, D., AND NICHOLSON-WELLER, A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal Immunology* **148**: 124-128.
- Lightowers, M. W., and Rickard M.D. 1988. Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* **96**, Suppl: S123-66.
- MCNEELY, T. B., AND TURCO, S. J. 1990. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. *The Journal of Immunology* **144**:2745-2750.

- MIYAZATO, T., FURUKAWA, T., INOUE, M., NIWA, A., INOUE, T., AND SHIMODA, K. 1977. Electron Microscopic Observations on the Penetration of Oncospheres of *Hymenolepis diminuta* into the Intestine of the Mouse. *Acta Medica Kinki University*. **2**: 1-18.
- Moczon, T. 1996. A serine proteinase in the penetration glands of the hexacanth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda, Cyclophyllidea). *Parasitology Research* **82**: 67-71.
- MOLINARI, J. L., TATO, P., AND VALLES, Y. 1987. Immunodepression of T lymphocytes in pigs modulated by *Cysticercus cellulosae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **29**: 293-300
- MOLINARI, J.L., TATO, P., AGUILAR, T., AND PALET A. 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. **30**:325-333.
- MOLINARI, J.L., TATO, P., REYNOSO, O.A., AND LEÓN CÁZARES, J.M. 1989. Modulation effects on mice response to a *Salmonella typhimurium* infection by a *Taenia solium*\_cysticerci product of low molecular weight. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **31**: 327-333.
- MOLINARI, J. L., TATO, P., REYNOSO, O. A., AND LEÓN CÁZARES, J. M. 1990. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulates with phytohemagglutinin. *Annales of Tropical Medicine Parasitology* **84**: 205-208.
- MOLINARI, J. L., SOTO, R., TATO, P., RODRÍGUEZ, D., RETANA, A., SEPÚLVEDA, J., AND PALET, A. 1993. Immunization against porcine cisticercosis in an endemic area in Mexico: A field and laboratory study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **49**: 502-512.
- MOLINARI, J. L., TATO, P., RODRÍGUEZ, D., SOLANO, S., RUBIO, M., AND

- SEPÚLVEDA, J. 1998. Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a T solium RNA peptide: A scanning electron microscopy study. *Parasitology Research* **84**: 173-194.
- MOLINARI, J.L., MEJIA, H., WHITE, A. C., GARRIDO, E., BORGONIO, V. M., BAIG, S., AND TATO, P. 2000. *Taenia solium*: A Cysteine Protease Secreted by Metacestodes Depletes Human CD4 Lymphocytes *in vitro*. *Experimental Parasitology* **94**: 133-142.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. C. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* **136**: 2348-2357.
- MOSMANN, T. R., and Sad, S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more *Immunology Today* **17**: 138-146.
- MURPHY K.M., OUYANG W., SZABO S.J., JACOBSON N.G., GULER M.L., GORHAM, J.D., GUBLER U., AND MURPHY T.L. 1999. T Helper Differentiation Proceeds Through Stat 1-Dependent, Stat4-Dependent and Stat4-Independent Phases. In : "Redirection of Th1 and Th2 response" (Coffman R.L and Romagnani S (Eds)). pp 13-23. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 230. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- MURRAY J.S. 1998. How the MHC selects Th1/Th2 immunity. *Immunology Today* **19**: 157-163
- PAWLOWSKI, Z. S. 1990. Perspectives on the control of *Taenia solium*. *Parasitology Today* **6**: 371-773.
- PEARCE, E. J., CASPAR, P., GRZYCH, J., LEWIS, F. A., AND SHER, A. 1991. Downregulation of Th1 Cytokine Production Accompanies Induction of Th2 Responses by a Parasitic Helminth, *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medicine*. **173**: 159-166.



- SANTIS, A.G., LÓPEZ-CABRERA, M., STRAUSS, M., AND SÁNCHEZ-MADRID. 1994. Structure of the gene coding for the human early lymphocyte activation antigen CD69: a C-type lectin receptor evolutionarily related with the gene families of natural killer cell-specific receptors. *European Journal of Immunology* **24**: 1692-1697.
- SAD, S., MARCOTTE, R., MOSMANN, T.R. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* **3**: 271-279
- SALGADO, P., ROJAS, R., AND SOTELO, J. 1991. Cysticercosis. Clinical Classification on Imaging Studies. *Archives International Medicine* **157**: 1991-1997.
- SCOTT, P., PEARCE, E., CHEEVER, A. W., COFFMAN, R. L. AND SHER, A. 1989. Role of Cytokines and CD4+ T-Cell Subsets in the Regulation of Parasite Immunity and Disease. *Immunological Reviews* **112**, 161-182.
- SCHRECK, R., BEVEC, D., DUKOR, P., BAEUERLE, P.A., CHEDID, L., BAHR, G.M. 1992. Selection of a muramyl peptide based on its lack of activation of nuclear factor-kappa B as a potential adjuvant for AIDS vaccines. *Clinical Experimental Immunology* **90**:188-193
- SOTELO, J. 1988. Cysticercosis. *Handbook of Clinical Neurology* **8**: 529-534.
- SPOLSKI, R. S., CORSON, J., THOMAS, P. G., & KUHN, R. E. 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunology* **22**: 297-305.
- TATO, P., VALLES, Y., ROLON, R., MOLINARI, J. L. 1987. Effect of the immunization in immunodepressed pigs, naturally parasitized with *Cysticercus cellulosae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **29**: 67-71.
- TATO, P., CASTOR, A. M., RODRIGUEZ, D., SOTO, R., ARECHAVALETA, F., AND MOLINARI, J. L. 1995. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small

- RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitology Research* **81**: 181-187.
- TATO, P., WHITE, A. C. JR., WILLMS, K., RODRIGUEZ, D., SOLANO, S., SEPÚLVEDA, J., AND MOLINARI, J. L. 1996. Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small RNA-peptide to implanted *Taenia solium* metacestodes. *Parasitology Research* **82**: 590-597.
- VELUPILLAI, P., AND HARN, D. A. 1994. Oligosaccharides-specific induction of interleukin 10 production by B220<sup>+</sup> cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation for regulation of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**: 18-22.
- VILLA, O. F., & KUHN, R. E. 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia solium* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* **112**: 561-570.
- VILLAGRAN, J., AND OLVERA, J. 1988. Human cysticercosis. A clinical and pathological study of 481 autopsy cases. *Patología* **26**: 149-156.
- WERNER, G. H. 1987. Natural and synthetic peptides (other than neuropeptides) endowed with immunomodulating activities. *Immunology Letters* **16**: 363-370.
- WHITE, A. C., TATO, P., AND MOLINARI, J. L. 1992. Host-Parasite Interactions in *Taenia solium* Cysticercosis. *Infectious Agents and Disease* **1**: 185-193.
- YANG, D. M., FAIRWEATHER, N., BUTTON, L. L., MCMASTER, W. R., KAHL, L. P., AND LIEW, F. Y. 1990. Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induce helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *The Journal Immunology* **145**: 2281-2285.
- YRLID, U., SVENSSON, M., JOHANSSON, C., AND WICK, M. J. 2000. Salmonella infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on

antigen presentation and initiating an immune response. *FEMS Immunology Medicine Microbiology* **27**: 313-320.

**IX. INDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1	34
FIGURA 2	35
FIGURA 3	36
FIGURA 4	37
FIGURA 5	38
FIGURA 6	39
FIGURA 7	40
FIGURA 8	41
FIGURA 9A	42
FIGURA 9B	43
FIGURA 9C	44
FIGURA 9D	45
FIGURA 10	47
FIGURA 11A	48
FIGURA 11B	49
FIGURA 11C	50
FIGURA 11D	51
FIGURA 12	53
FIGURA 13	54
FIGURA 14	56
FIGURA 15	57
FIGURA 16	58
FIGURA 17	59
FIGURA 18	60
FIGURA 19	62

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DE LA PLATA

E. Garrido · P. Tato · J.L. Molinari

## A factor isolated from *Taenia solium* metacestodes stimulates T lymphocytes to proliferate and produce gamma interferon

Received: 18 January 2001 / Accepted: 6 June 2001 / Published online: 2 August 2001  
© Springer-Verlag 2001

**Abstract** A metacestode factor (MF) isolated from live metacestodes of *Taenia solium* suppresses humoral and cellular responses, and inhibits the inflammatory reaction around metacestodes implanted subcutaneously in mice. When this MF is digested with RNase (dMF), it loses the suppressive capacity, but acquires T-cell stimulant ability. By filtering MF through a Bio-gel P6 column, two components were separated. The first (F1) was suppressive, while the second (F2) stimulated T cells to proliferate. In these experiments, F2 or dMF was used with mouse spleen cells in stimulation assays in vitro. Spleen cells from mice treated with F2 or dMF were also stimulated with concanavalin A (Con-A) ex vivo. Flow cytometry analyses were performed to estimate cell proliferation, intracellular cytokine production, and restoration of CD4<sup>+</sup> cells. Spleen lymphocytes from mice previously treated with F2 or dMF and then stimulated with Con-A ex vivo exhibited a significant increase in cell proliferation and gamma interferon production by CD4<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ) and CD8<sup>+</sup> cells. These effects were concentration-dependent and inversely correlated with the amount of dMF or F2. Similar results were observed in normal mouse spleen T cells incubated with F2 or dMF and Con-A in vitro. Finally, dMF induced a significant restoration of CD4<sup>+</sup> cells in mice depleted of these cells.

### Introduction

Immunosuppression has been demonstrated clearly in infections with helminths. Some authors have reported

the isolation of factors of low molecular weight from *Schistosoma mansoni* (Dessaint et al. 1977), *Onchocerca gibsoni* (Yin Foo et al. 1983) and *Taenia taeniaeformis* (Burger et al. 1986); a role in immunosuppression has been ascribed to these factors. We have isolated a factor (metacestode factor, MF) from metacestodes of *Taenia solium* that depresses (<sup>3</sup>H) thymidine uptake by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or concanavalin A (Con-A) (Molinari et al. 1990; Tato et al. 1995). MF also impairs the inflammatory reaction surrounding implanted *T. solium* metacestodes in mice; it affects the humoral and cellular responses, and non-specifically inhibits cytokine production (Tato et al. 1996; Arechavaleta et al. 1998; Molinari et al. 1998). Two fractions with components of low molecular weight (MW < 1,350 Da) have been separated from MF (Tato et al. 1995). Fraction 1 (F1) depresses (<sup>3</sup>H) thymidine uptake by human and murine lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or Con-A (Molinari et al. 1990; Tato et al. 1995). The other fraction (F2) increases (<sup>3</sup>H) thymidine uptake by lymphocytes stimulated with Con-A (Molinari et al. 1990; Tato et al. 1995). When MF is subjected to digestion with RNase, the digested MF (dMF) increases the survival of mice after a challenge dose of *Salmonella typhimurium*, and decreases significantly the bacteremia in these mice (Molinari et al. 1989).

This investigation was designed to evaluate the potential of dMF and the isolated F2 in eliciting such processes as lymphocyte proliferation and synthesis of cytokines, triggered by Con-A in vitro and ex vivo, in murine lymphocytes

E. Garrido · J.L. Molinari (✉)  
Department of Molecular Genetics,  
Institute of Cellular Physiology, UNAM,  
Mexico City, Mexico D.F. 04510 A.P. 70-242  
E-mail: jmolinari@iifisio.unam.mx  
Tel.: +52-5-6225653  
Fax: +52-5-6225630

P. Tato  
Department of Microbiology and Parasitology,  
Faculty of Medicine, UNAM, Mexico City, Mexico

### Materials and methods

#### Metacestode factor

MF was obtained following the method described by Tato et al. (1995). Metacestodes of *T. solium* were carefully dissected from meat of cysticercotic pigs obtained from a slaughter house (Toluca, Mexico) or from live cysticercotic pigs brought from villages in an

area in Mexico where porcine cysticercosis is endemic (Molinari et al. 1993, 1997).

Before obtaining MF, 20 metacystodes were tested for viability according to Tato et al. (1995). When viability was found to be above 90%, the rest of the metacystodes from that pig were washed with sterile distilled deionized water (ddw) and incubated in 500 ml of ddw for 6 h at room temperature. After centrifugation at 10,000 rpm for 15 min supernatants were lyophilized, suspended in 5 ml of ddw and dialyzed using a Spectrapor 3 dialysis tube (Spectrum Medical Industry, molecular weight cut-off 3,500 Da) against 100 ml of sterile ddw at 4 °C in autoclaved glassware. After 12 h, the material outside the dialysis tube was lyophilized and stored at 4 °C.

## Animals

Syngeneic BALB/c mice (20 ± 2 g) from our animal facilities were used in all experiments; they were housed according to the *Guide for the care and use of laboratory animals* (1996).

## RNase digestion

Digestion of MF with RNase was carried out according to Uchida and Egami (1967), with modifications (Tato et al. 1995).

Batches of 500 mg dry weight MF were resuspended in 8.5 ml of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 2.5 ml RNase (5 µg/ml), 2.5 ml of 0.01 M EDTA, 200 µl of trypsin inhibitor (100 µg/ml), and 700 µl of 0.001 M *p*-hydroxymercuribenzoate (Sigma). Digestion was conducted at 37 °C for 4 h with continuous stirring. The digested material was dialyzed against ddw overnight in a Spectrapor 3-dialysis tube (cut-off 3,500 kDa) at 4 °C. Material outside of the tube (dMF) was lyophilized and stored at -20 °C.

## Sumulatory fraction F2

To obtain F2, batches of 400 mg of dMF (dry weight) were suspended in ddw, filtered through a Millipore membrane (0.22 µm) and loaded on a Bio-gel P-2 column 200–400 mesh (70 × 0.9 mm, Bio-Rad) previously equilibrated with ddw. The material was eluted with ddw, and monitored at 260 nm with an ISCO UA5 ultraviolet analyzer. Fractions of 2.5 ml were collected. Fractions of peak 2 (F2) were pooled and lyophilized.

## Chemical determinations

Concentrations of dMF and F2 were estimated as protein using the method described by Bradford (1976).

## Proliferation assays

Cell proliferation assays were carried out according to the method of Arechavaleta et al. (1998). Mouse spleen cells obtained under aseptic conditions were resuspended at a concentration of  $5 \times 10^6$  cells/ml in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), penicillin (100 µg/ml), and streptomycin (25 µg/ml), and were plated at  $5 \times 10^5$  per well in 96-well plates (Costar). Con-A (Sigma) at 0.5 µg in 100 µl of RPMI and 20 µl of the same medium (previously filtered by 0.22 µm Millipore membranes) containing 1, 5 or 10 µg of F1 or F2 were added to each well in triplicate. Plates were incubated (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, for 72 h). Controls included cells incubated with just RPMI, or without Con-A, or F1, or F2. At 17 h before harvesting, [<sup>3</sup>H] thymidine (10 µCi/well) (74 GBq/mmol, ICN, Irving, Calif.) was added. Cells were harvested with a multiple automated sample harvester (Nunc, Denmark) and thymidine incorporation was measured using a liquid scintillation counting (Beckman LS 6000TA).

## Inoculation of mice with dMF or F2

A group of three mice was inoculated by the subcutaneous route (s.c.) with 20, 40, or 100 µg of dMF (estimated as protein) dissolved in 100 µl of saline solution. Booster injections were performed three times, at intervals of 96 h. Another group of three mice was inoculated by the s.c. route with 20 µg of F2 dissolved in 100 µl of saline solution. Three boosters were also carried out, every 96 h. Twelve days after the first inoculation, mice were sacrificed and their spleen cells were obtained for proliferation assays and estimation of intracellular cytokines. Mice inoculated with saline solution were used as controls.

## Estimation of CD25 expression and intracellular cytokines

CD25 expression and intracellular cytokine concentrations were estimated according to Picker et al. (1995) with modifications. For estimations in vitro, spleen cells were obtained from normal mice. For estimations ex vivo, spleen cells were obtained from mice inoculated with dMF or F2 and from control mice.

Spleens were dissected under aseptic conditions and infiltrated with complete medium until a cell suspension was obtained. Aliquots of 2 ml containing  $2 \times 10^6$  cells were plated in triplicate in 12-well plates (Costar). Con-A (2 µg/ml) was added to each well. For assays in vitro, dMF or F2 at concentrations of 0.5, 1, and 5 µg were added to  $5 \times 10^5$  cells. Control cells, with or without Con-A in RPMI 1640, were included.

For ex vivo assays, spleen cells ( $5 \times 10^5$ ) from mice inoculated with dMF or F2 were stimulated with Con-A. Cells from control mice were incubated with RPMI 1640 medium. Cells in all experiments were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 48 h. After 44 h of incubation, Brefeldin A (5 µg/ml, Sigma) was added to each well. Cells ( $4 \times 10^5$ /tube) were transferred to capped polystyrene round-bottom tubes (Falcon), and centrifuged (450 g, for 5 min), washed by centrifugation (450 g, for 5 min), and suspended in 0.5 ml of PBS.

To identify CD4<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> expression, cells were stained with a two-color direct immunofluorescence reagent using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled (mAb) anti-mouse CD4, and PE-labeled anti-mouse CD25 [interleukin-2 (IL-2) receptor  $\alpha$  chain] according to manufacturer's instructions (Pharmingen). Cells mixed with irrelevant FITC-labeled (mAbs) anti-IgG1/PE-labeled anti-IgG2a were used as controls.

For estimation of intracellular cytokines, cells were treated with a fluorescence-activated cell sorting (FACS) permeabilizing solution (500 µl/test, Becton Dickinson) and stained with phycoerythrin (PE)-labeled (mAb) anti-mouse IL-2, IL-4 and gamma interferon (IFN- $\gamma$ ). Flow cytometry analyses were carried out in a FACSCalibur (Becton Dickinson), 10,000 events were acquired per plot.

## Estimation of restoration of CD4<sup>+</sup> cells

To estimate the restoration of CD4<sup>+</sup> cells, mice ( $n = 4$ ) were inoculated with 100 µg of mAb anti-mouse CD4<sup>+</sup> (Pharmingen) by intraperitoneal (i.p.) route to deplete them of CD4<sup>+</sup> cells. Immediately after, two of them were s.c. inoculated with 0.1 ml of sterile saline solution containing dMF (20 µg as protein). Four boosters of dMF were given at intervals of 96 h. Depleted control mice ( $n = 2$ ) were inoculated only with anti-CD4 mAb. Untreated mice were included as a control.

Samples of peripheral blood (60 µl) were obtained every 4–5 days from the tail vein. Blood cells were stained with FITC-labeled mAb anti-mouse CD4 (leu-3a) and PE-labeled anti-mouse CD8, and analyzed by flow cytometry. At the 22nd day, mice were sacrificed, their spleens were dissected under aseptic conditions and infiltrated with complete medium until a cell suspension was obtained. Spleen cells were stained for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> expression and analyzed by flow cytometry as described above.

## Statistics

Significant differences in CD25 expression and intracellular cytokine concentrations were estimated by the  $\chi^2$  test. Values of  $P < 0.05$  were considered significant. Results of ( $^3\text{H}$ ) thymidine uptake and depletion of CD4<sup>+</sup> cells were expressed as mean  $\pm$  SD.

## Results

## Effects of F1 and F2 on cell proliferation

In consonance with a previous report (Tato et al. 1995), the current lymphocyte proliferation results confirmed the up and down modulation effects induced by *T. solium* factors F1 and F2 on lymphocytes. Batches of MF obtained from live *T. solium* metacystodes were filtered through a Bio-gel P6 column. Fractions from peaks 1 and 2 (factors F1 and F2, Fig. 1A) were tested by cell-proliferation assays. F1 inhibited ( $^3\text{H}$ ) thymidine

uptake in a dose-dependent manner. In contrast, F2 increased ( $^3\text{H}$ ) thymidine uptake by mouse spleen lymphocytes stimulated with Con-A (Fig. 1B). In addition, a batch of dMF with RNase was filtered through a Bio-gel P-6 column. The elution profile showed that the F1 had been eliminated by RNase activity (Fig. 1C).

## Stimulation of proliferation cell and cytokine production in vitro

We explored whether F2 and dMF were T-cell stimulants in vitro. Normal mouse spleen cells were incubated in RPMI 1640 medium with F2 or dMF, with or without Con-A for 48 h (Fig. 2). CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells and intracytoplasmic IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-4 were stained for flow-cytometry analyses. Results showed that the effects induced by dMF and F2 (proliferation of T cells and cytokine synthesis) were concentration-dependent, and inversely correlated with the amount of dMF or F2. Normal mouse spleen cells incubated with F2 or dMF (0.5  $\mu\text{g}$  as protein) and Con-A for 48 h exhibited a higher CD25 expression by CD4<sup>+</sup> and, presumably, CD8<sup>+</sup> cells (pCD8<sup>+</sup> cells, Fig. 2C, F, upper right and left quadrants respectively) than Con-A control stimulated cells (Fig. 2B, E).

F2 induced a higher increase in CD25 expression in CD4<sup>+</sup> and pCD8<sup>+</sup> cells than in Con-A control cells (33% vs 17%,  $P < 0.05$ ; and 22% vs 11%, Fig. 2C, B). Similar results were observed in CD4<sup>+</sup> and pCD8<sup>+</sup> cells after treatment with dMF (17% vs 8%, and 5% vs 2%, Fig. 2F, E).

The results also showed that the intracellular concentration of IFN- $\gamma$  in CD4<sup>+</sup> cells was significantly increased with respect to Con-A control cells when spleen cells were treated in vitro with F2 or dMF and Con-A (Fig. 3A, B,  $P < 0.05$ ). IFN- $\gamma$  was also highly increased in pCD8<sup>+</sup> cells (Fig. 3A, B). IL-2 concentration was higher in CD4<sup>+</sup> and pCD8<sup>+</sup> cells cultured with F2 (27% and 13% respectively) than in Con-A control cells (19% and 9%), while the intracellular concentration of IL-4 was high only in pCD8<sup>+</sup> cells (CD4<sup>+</sup> 25%, CD8<sup>+</sup> 17% versus CD4<sup>+</sup> 23%, CD8<sup>+</sup> 9% of Con-A control cells). Cells cultured with dMF showed lower values for IL-2 and IL-4 than those cultured with F2 (data not shown).

## Stimulation with F2 and dMF in vivo

To address the question of whether F2 and dMF stimulate T cells in vivo, mice were inoculated with F2 or dMF. After treatment, spleen cells from treated and control mice were isolated and stimulated ex vivo with Con-A for 48 h. CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> cells, and intracytoplasmic cytokines were stained and analyzed by flow cytometry.

Results showed that the effects induced by dMF and F2 were concentration-dependent and inversely

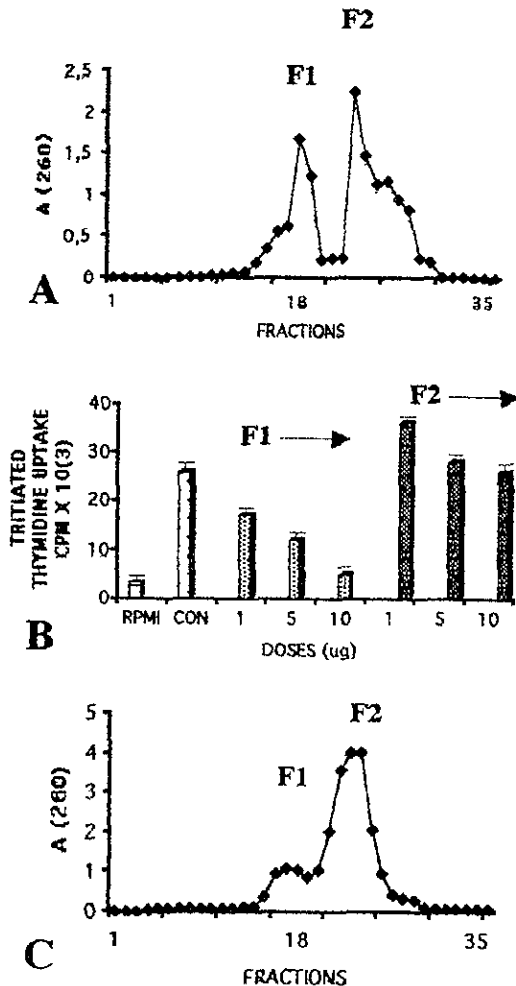
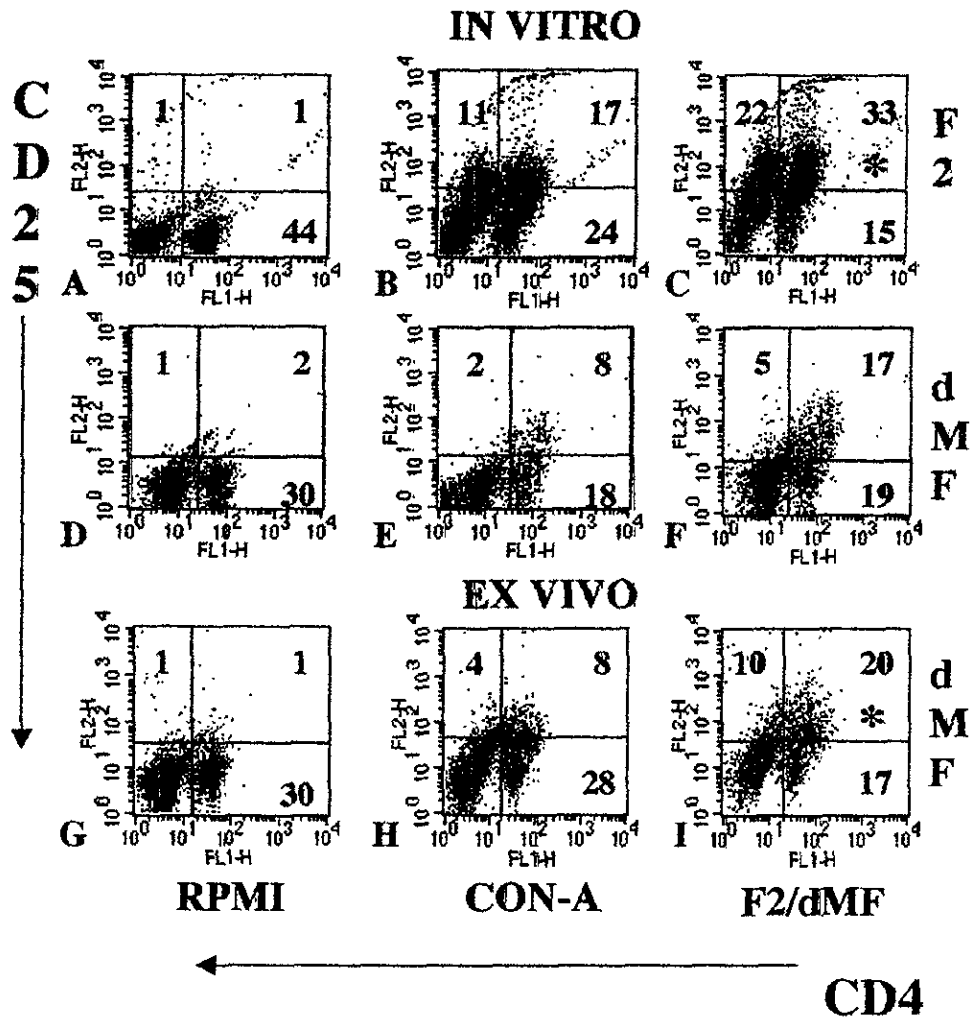


Fig. 1 A Elution profile of co-isolated factors (MF 100 mg) through a Bio-gel P-6 column B Tritiated thymidine uptake (cpm) by lymphocytes cultured with F1 or F2 and concanavalin A (Con-A). Bars represent mean  $\pm$  SD values. C Elution profile of RNase-dMF (400 mg) through a Bio-gel P-6 column

**Fig. 2A-I** Flow cytometry analysis of CD25 expression by CD4<sup>+</sup> cells. **A, D, G** Control cells cultured in RPMI. **B, E, H** Control cells cultured with Con-A. **C** Fluorescence of normal spleen cells ( $2 \times 10^6$ ) cultured with 0.5  $\mu$ g of F2 and 2  $\mu$ g of Con-A. **F** Normal spleen cells ( $2 \times 10^6$ ) cultured with 0.5  $\mu$ g of dMF and 2  $\mu$ g of Con-A. **I** Spleen cells from mice inoculated with dMF (20  $\mu$ g/4 doses), and stimulated with Con-A *ex vivo*. All cultures were performed in RPMI medium for 48 h, then the cells were stained with FITC-labeled mAb anti-mouse CD4 and PE-labeled anti-mouse CD. Results in plots from **A-F** are representative of three independent experiments. Values are expressed as gated percentages of CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>+</sup>. \* $P < 0.05$  versus Con-A control cells



correlated with the amount of dMF or F2. Spleen cells from mice inoculated with dMF (20  $\mu$ g) exhibited a significant CD25<sup>+</sup> expression by CD4<sup>+</sup> (20%) and pCD8<sup>+</sup> cells (10%). Expression of CD25 by CD4<sup>+</sup> and pCD8<sup>+</sup> cells was more than twice the expression in Con-A control cells (Fig. 2I, H,  $P < 0.05$ ). The intracellular concentration of IFN- $\gamma$  was also significantly higher in CD4<sup>+</sup> than in Con-A control cells (Fig. 3D). Doses of 40 and 100  $\mu$ g were lower stimulants than 20  $\mu$ g (data not shown).

Spleen cells from mice inoculated with F2 (20  $\mu$ g) exhibited the highest CD25<sup>+</sup> expression by CD4<sup>+</sup> after stimulation with Con-A *ex vivo* (data not shown). CD4<sup>+</sup> cells also exhibited a significant increase in the intracellular concentration of IFN- $\gamma$  with respect to cells from control mice stimulated with Con-A (Fig. 3C). IL-4, but not IL-2 concentration was high in CD4<sup>+</sup> cells (data not shown) IFN- $\gamma$  was also increased in pCD8<sup>+</sup> cells, reaching more than twice the level in Con-A control cells (Fig. 3C, D).

An additional experiment was developed to determine whether the cell populations (pCD8<sup>+</sup>) in the upper

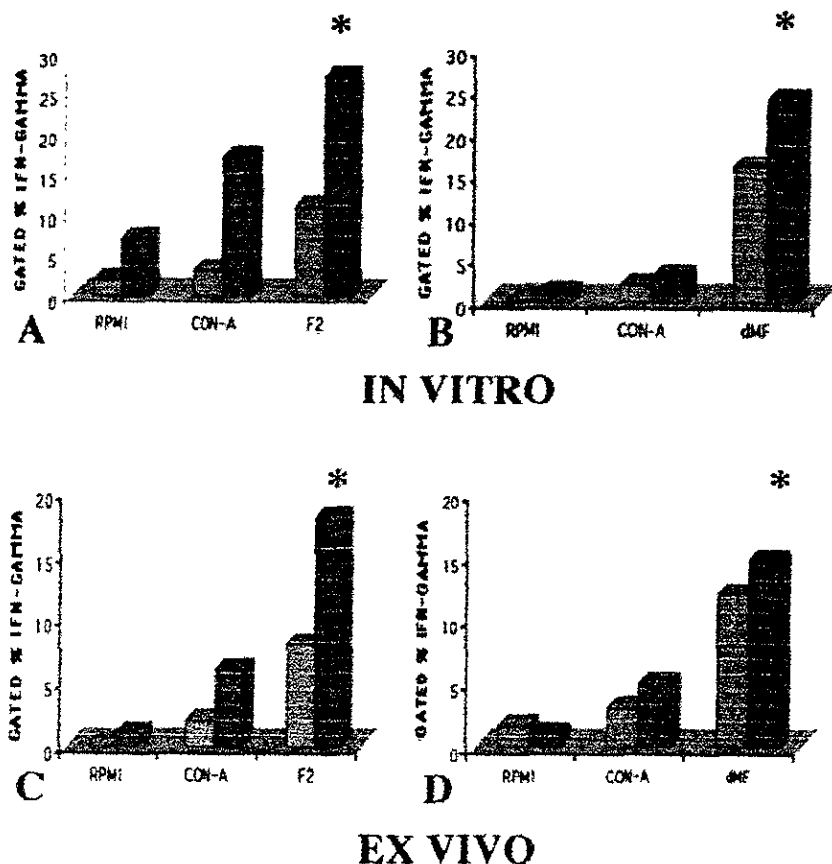
left quadrants of Fig. 2 were CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells. Spleen cells from normal mice were cultured with dMF (0.5  $\mu$ g) and Con-A for 48 h and then stained with FITC-labeled (mAb) anti-mouse CD8, phycoerythrin-labeled anti-CD25, or anti-IFN- $\gamma$  PE antibodies. The results confirmed that CD8<sup>+</sup> cells express CD25 and produce IFN- $\gamma$  in higher percentages than Con-A control cells (Fig. 4C, D).

#### Restoration of CD4<sup>+</sup> cells

Finally, an experiment was carried out to determine whether dMF increases the restoration of CD4<sup>+</sup> cells (unfortunately, we had such small amounts of F2 material that we could not carry out any correlated study of restoration with this material) The restoration of CD4<sup>+</sup> cells was monitored by flow-cytometric analyses. CD4<sup>+</sup> expression was significantly higher in treated mice cells than in control mice cells (38.2% vs 22.6%) at the 22nd day of observation (Fig. 5). Moreover, CD25<sup>+</sup> expression was higher in CD4<sup>+</sup> cells from treated mice



**Fig. 3A-D** Flow cytometry analysis of IFN- $\gamma$  production by CD4 $^{+}$  cells. Each pair of bars represent gated percentages of IFN- $\gamma$  induced either by F2 or dMF (0.5  $\mu$ g/5 $\times$ 10 $^5$  cells) and Con-A in vitro (A, B) or by F2 or dMF in vivo (20  $\mu$ g/4 doses/mouse) and triggered with Con-A ex vivo (C, D). Left bars correspond to CD8 $^{+}$  cells and right bars to CD4 $^{+}$  cells producing IFN- $\gamma$ . Results in plots A and C are representative of three independent experiments. Values for control cells cultured with or without Con-A are included. \* $P < 0.05$  versus Con-A control cells.



(17% vs 12%). However, no differences were observed in the concentration of intracellular cytokines (data not shown).

## Discussion

The results of cell proliferation experiments obtained in the current investigation were consistent with those of suppression or stimulation of ( $^3$ H) thymidine uptake by murine spleen lymphocytes incubated either with F1 or F2 and Con-A, reported in a previous publication (Tato et al. 1995). Here we demonstrated the capacity of dMF and F2 in stimulating T lymphocytes to proliferate and to produce IFN- $\gamma$ . IL-2 and IL-4 were also produced, although to a lesser extent. In general, CD4 $^{+}$  cells proliferated more and produced higher concentrations of IFN- $\gamma$  than CD8 $^{+}$  cells. Both effects were observed with either spleen cells from normal mice cultured with Con-A in vitro, or with spleen cells from mice treated with dMF or F2 and stimulated with Con-A ex vivo. The results obtained by filtering dMF on a Bio-gel P-6 column and those of flow cytometry on lymphocyte stimulation suggest that dMF and F2 is the same substance.

As far as we are aware this is the first report of a parasite substance that increases proliferation and

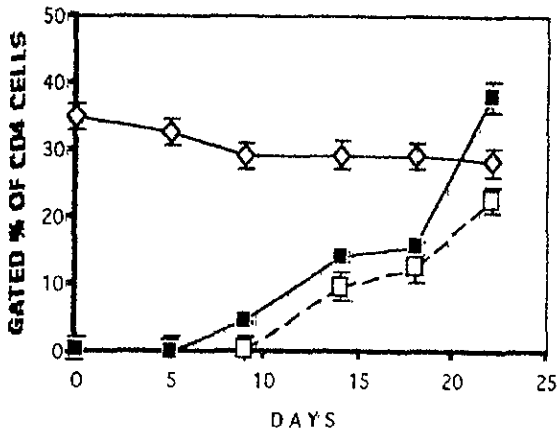
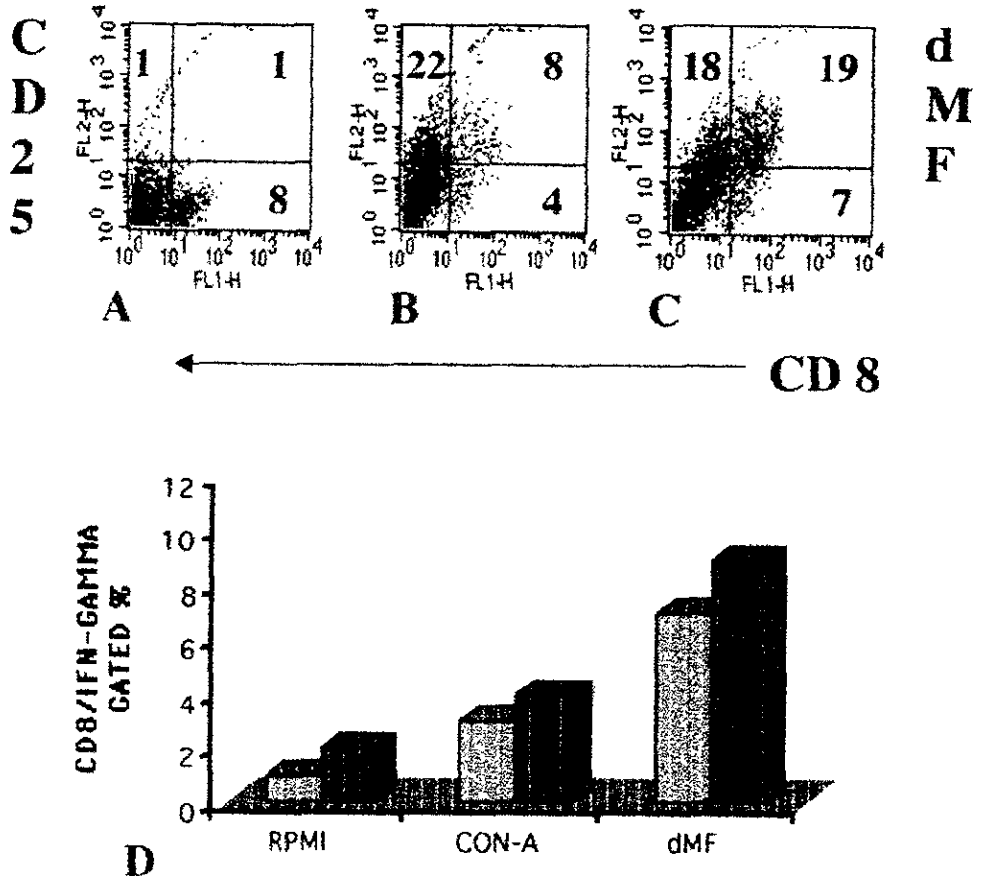
production of IFN- $\gamma$  by CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  cells following Con-A triggering. It also induced a significant restoration of CD4 $^{+}$  cells in mice depleted of these cells.

The importance of INF- $\gamma$  in cell-mediated immunity is widely documented. For example, it has been shown that immunity to *Bordetella pertussis* (Barbic et al. 1997), *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (Yang and Mitsuyama 1997) and *Salmonella typhimurium* (Nauciel and Espinasse-Maes 1992; Ramarathinam et al. 1993; Pic et al. 1997) is dependent on CD4 IFN- $\gamma$  synthesis.

Immunostimulatory products have been reported in bacteria. By comparing mice immunized with either viable or killed *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG), it was found that a high level of IFN- $\gamma$  mRNA was expressed only after immunization with viable BCG. When endogenous IFN- $\gamma$  was neutralized, by administration of anti-IFN- $\gamma$  mAb to immunized mice, the generation of protective T cells was impaired (Yang and Mitsuyama 1997). Cytokine synthesis and cell proliferation occurs sequentially in T cells CD4 $^{+}$  stimulated with the superantigen staphylococcal enterotoxin B (Metha and Maino 1997).

With respect to parasites, it has been pointed out that IFN- $\gamma$  is important in controlling *Toxoplasma gondii* infection (Gazmelli et al. 1991) and contributes, along with CD8 $^{+}$  cells, to human resistance to *Leishmania*

**Fig. 4A-D** Flow cytometry analysis of CD25 expression and IFN- $\gamma$  production by CD8 $^+$  and CD4 $^+$  cells. Spleen cells cultured for 48 h in RPMI medium were stained with mAb FITC anti-CD8 and PE anti-CD25 to quantify CD25 expression by CD8 $^+$  cells. In other experiments, cells were stained with mAb FITC CD8 and mAb PE anti-IFN- $\gamma$  to estimate intracellular concentration of IFN- $\gamma$ . **A** Control cells in RPMI medium. **B** Control cells cultured with Con-A. **C** Cells cultured with dMF (0.5  $\mu$ g/5 $\times$ 10 $^5$  cells) and Con-A. **D** Plots show a representative experiment. Bars represent gated percentages of IFN- $\gamma$  produced by CD8 $^+$  (left bars) and CD4 $^+$  cells (right bars). Values for control cells cultured with or without Con-A are included. Values are the mean  $\pm$  SD of three independent experiments



**Fig. 5** Flow cytometry analysis of CD4 $^+$  restoration in mice depleted of CD4 $^+$  cells. Mice were intraperitoneally inoculated once with 100  $\mu$ g of mAb anti-mouse CD4. Immediately following injection, mice were subcutaneously inoculated with 20  $\mu$ g of dMF. A booster was performed every 4 days for 12 days. Blood (10  $\mu$ l tube) was obtained from the tail vein 40 min after the inoculation of the mAb, and after every 96 h for 18 days. Blood cells were stained with mAb FITC anti-CD4 and PE anti-CD8. After 22 days, isolated spleen cells were stimulated with Con-A *ex vivo* for 48 h and stained for CD4 $^+$  and CD8 $^+$  cells. Values represent mean  $\pm$  SD of gated percentages of CD4 $^+$  cells. *Diamond* spleen control cells, *open square* spleen cells from mice depleted of CD4 $^+$  cells, *black square* spleen cells from mice depleted of CD4 $^+$  cells, inoculated with dMF.

infection (Charles et al. 1999). IFN- $\gamma$  is the most effective cytokine in reducing the level of circulating trypanosomes and increases the survival of mice challenged with the parasite (Miller et al. 1997; Garcia et al. 2000).

The mechanisms by which the *T. solium* F2 or dMF induces T-cell stimulation are still unknown. However, it is clear that this substance has a high pharmacological potential for use in experimental pathological entities where CD4 $^+$  cells are depressed, and those in which IFN- $\gamma$  is down-modulated.

**Acknowledgements** This work was funded by the Program of Support to Projects of Research and Technological Innovations, UNAM Mexico. The authors thank Dr. Armando Gomez-Puyou for critically reading the manuscript.

**References**

Arechavaleta F, Molnar JL, Tato P (1998) A *Taenia solium* cysticercus factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84: 117-122

Baibic J, Leef MF, Burns DL, Shabim RD (1997) Role of gamma interferon in natural clearance of *Bordetella pertussis* infection. *Infect Immun* 65:4904-4908

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

- Burger CJ, Rikihisa Y, Lin YC (1986) *Taenia taeniaeformis* inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin 2 production in rat splenocytes by larval in vitro product. *Exp Parasitol* 62:216-222
- Charles M, Auriault V, Faugere B, Dessein AJ (1999) Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8<sup>+</sup> and gamma interferon producing CD4<sup>+</sup> and interleukin-5- antigen-specific T cells. *Infect Immun* 67:5559-5566
- Committee on Care and Use of Laboratory Animals (1996) Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources. National Research Council. Washington, DC
- Dessaint JP, Camus D, Fisher E, Capron A (1977) Inhibition of lymphocyte proliferation by factor (s) produced by *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* 7:624-629
- Garcia CA, Oliveira EC, Sakurada JK, Santos LM (2000) Protective immunity induced by a *Trypanosoma cruzi* soluble extract antigen in experimental Chagas' disease. Role of interferon gamma. *Immunol Invest* 29:1-12
- Gazzinelli R, Thakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A (1991) Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol* 146:286-292
- Metha BA, Maino VC (1997) Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4<sup>+</sup> lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 208:49-59
- Miller MJ, Wrightsman RA, Stryker GA, Manning JE (1997) Protection of mice against *Trypanosoma cruzi* by immunization with paraflagellar rod proteins requires T cell, but not B cell, function. *J Immunol* 158:5330-5337
- Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Leon-Cazares JM (1989) Modulation effects on mice response to a *Salmonella typhimurium* infection by a *Taenia solium* cysticerci product of low molecular weight. *Rev Latin Am Microbiol* 31:327-333
- Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Leon-Cazares JM (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin. *Ann Trop Med Parasitol* 84:205-208
- Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana, Sepulveda J, Palet A (1993) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico. A field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 49:502-512
- Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S (1997) Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 69:55-63
- Molinari JL, Tato P, Rodriguez D, Solano S, Rubio M, Sepulveda J (1998) Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA peptide: A scanning electron microscopy study. *Parasitol Res* 84:173-180
- Nauciel C, Espinasse-Maes F (1992) Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* 60:450-454
- Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR, Maino VC (1995) Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood* 86:1408-1419
- Pie S, TruffaBachi P, Pla M, Nauciel C (1997) Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. *Infect Immun* 65:4509-4514
- Ramarathinam L, Niesel DW, Klimpel GR (1993) *Salmonella typhimurium* induces IFN-gamma production in murine splenocytes. Role of natural killer cells and macrophages. *J Immunol* 150:3973-3981
- Tato P, Castro AM, Rodriguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL (1995) Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA-peptide from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res* 81:181-187
- Tato P, White AC Jr, Wilms K, Rodriguez D, Solano S, Sepulveda J, Molinari JL (1996) Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small RNA-peptide to implanted metacestodes. *Parasitol Res* 82:590-597
- Uchida T, Egami F (1967) Ribonuclease T1 from Taka-diestase. In: Colowick S, Kaplan N (eds) *Methods in Enzymology*, vol 12. Academic Press, New York, pp 228-229
- Yang J, Mitsuyama M (1997) An essential role for endogenous interferon-gamma in the generation of protective T cells against *Mycobacterium bovis* BCG in mice. *Immunology* 91:529-535
- Yin Foo D, Nowak M, Copeman B, McCabe M (1983) A low molecular weight immunosuppressive factor produced by *Onchocerca gibsoni*. *Vet Immunol Parasitol* 4:445-451