

00524
176



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO POTENCIADOR DE LOS ANDROGENOS
EN LA VACUNACION CONTRA CISTICERCOSIS
POR *Taenia crassiceps***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :
ELLY NATTY / SANCHEZ RODRIGUEZ



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D. F.

2003.



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.

H. JURADO ASIGNADO

Presidente: Q.F.B. Saturnino de León Chapa

Vocal: Q.F.B. Abel Gutiérrez Ramos

Secretario: Dr. Jorge Morales Montor

1er. Suplente: Ana Esther Aguilar Cárdenas

2do. Suplente: M. en C. Sonia Mayra Pérez Tapia

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio B106, perteneciente al Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Vo.Bo. DEL ASESOR DEL TEMA


Dr. Jorge Morales Montor

SUSTENTANTE


Elly Natty Sánchez Rodríguez

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcionado.

NOMBRE: Elly Natty Sánchez Rodríguez

FECHA: 30 Mayo 2003

FIRMA: 

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a su grandiosa Facultad de Química, por la formación tanto académica como personal que allí recibí, por enseñarme lo que significa el orgullo de sentirse Universitario.

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas al Dr. Carlos Larralde y al Dr. Jorge Morales, por aceptarme dentro del laboratorio, por su apoyo y asesoría para la realización de este proyecto.

Al laboratorio que dirige el Dr. Marco Cerbón en la Facultad de Química, por las facilidades prestadas para el trabajo experimental de esta tesis y por aceptarme como una integrante más del laboratorio.

Al próximo Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, por sus consejos a nivel académico, pero sobre todo por su valiosa amistad y su ayuda desinteresada. GRACIAS.

A mis compañeros del laboratorio: Mario, Toño, Marco, Galileo, Lili y Cristián, por su ayuda en el trabajo experimental.

DEDICATORIAS

A mi padre Mario Sánchez Escudero, por ser el mejor ejemplo de constancia y superación, por todo su apoyo, ¡este logro es tuyo!

A mi madre Rosa Hilda Rodríguez Betancourt, por enseñarme que en la vida hay muchas cosas por las cuales luchar, por ser mi amiga y por todo el cariño y confianza que me brinda.

A mis hermanos: Edgar, Eybar, Paco y Ale

A César, gracias por creer en mí.

A mis amigos, Mayra, Samuel, Xpax, Jorge, Letti, Elvia, y a los que por falta de espacio no puedo mencionar, gracias por enseñarme lo que significa la amistad sincera, y porque alguna vez me dijeron que "la única forma de fracasar, era darse por vencido".

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	5
A. Importancia de estudio de la cisticercosis y ciclo de vida del Parásito.	5
B. Cisticercosis murina	9
C. Inmunología y Dimorfismo Sexual en la cisticercosis Murina	10
D. Vacunación	13
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	20
A. Modelo Biológico	20
B. Infección experimental	20
C. Tratamientos utilizados	21
1) Experimento 1	21
2) Experimento 2	21
3) Experimento 3	22
D. Preparación de la vacuna	23
E. Tratamiento con andrógenos	23
F. Extracción de RNA total	24
G. Síntesis de oligonucleótidos	26
H. Retrotranscripción (RT)	27
I. Reacción en cadena de la polimerasa	27
J. Electroforesis de los productos de RT-PCR	29

VII. RESULTADOS	
A. Efecto de la vacuna en la carga parasitaria a las 8 semanas de infección utilizando como andrógeno Testosterona (T ₄)	30
B. Efecto de la vacuna en la carga parasitaria a las 4 semanas de infección utilizando como andrógeno DHT	31
C. Resultados globales a 4 semanas de infección	35
D. Perfil de respuesta inmunológico	36
1. IL-1 β	36
2. Respuesta tipo Th-1	38
2.1. IL-2	38
2.2. TNF- α	38
3. Respuesta tipo Th-2	41
3.1 IL-4	41
3.2 IL-6	41
3.3 IL-10	41
VIII. DISCUSIÓN	45
IX. CONCLUSIONES	51
X. PERSPECTIVAS	52
XI. REFERENCIAS	53
APÉNDICE I. Estandarización de la técnica de PCR	58
APÉNDICE II. Sexual Dimorphism of the immune response in Parasitic diseases: prevalence, mechanisms and significance	62

RESUMEN

En América Latina, Asia y África la cisticercosis por *Taenia solium*, es altamente predominante en cerdos y en humanos y por ende constituye un serio problema de salud pública, ello indica la importancia de encontrar una efectiva forma de evitar la transmisión de la enfermedad. La cisticercosis murina constituye una estrategia experimental ideal que ha permitido evaluar las interacciones inmuno-endocrinas entre el cisticerco de *Taenia crassiceps* y su hospedero murino, en donde se ha observado un dimorfismo sexual en la infección: las hembras presentan una mayor susceptibilidad y mayores cargas parasitarias que los machos durante la infección aguda, mientras que durante la infección crónica las cargas parasitarias en machos y en hembras se igualan, a la vez el macho sufre un proceso de feminización. Estas y otras observaciones han llevado a la conclusión de que los andrógenos ejercen un efecto protector a la infección mientras que los estrógenos parecen permitirla.

Dentro del ciclo de vida del parásito el cerdo es el hospedero intermediario para la transmisión de la enfermedad, por tanto se puede reducir el paso de la cisticercosis hacia el humano a través de la vacunación del cerdo. Debido a las diferencias ya mencionadas entre hembras y machos en la infección, aunado a que las vacunas utilizadas en contra de la cisticercosis no han comprobado un efecto 100% protector y a que no existen estudios que evalúen la respuesta inmunológica en la vacunación para ambos sexos, es que se decidió investigar la forma de regular la respuesta inmunológica en la vacunación a través del uso de hormonas sexuales como los andrógenos, los resultados observados son: 1) El tratamiento con Dihidrotestosterona provee un efecto protector a la infección, medido como perfil de respuesta inmunológico.

2) Los antígenos recombinantes utilizados en fagos filamentosos no proveen una protección efectiva cuando se utilizan en una sola dosis vía subcutánea.

3) En los estudios de vacunación es importante incluir ambos sexos, debido a que existen evidencias cada vez más estudiadas de la relación entre los sistemas inmunológico y endocrinológico.

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es el encargado de proteger y mantener libre de enfermedades al organismo. Para tal fin desencadena una serie de mecanismos de defensa en contra de agentes infecciosos. Durante muchos años se estudió como un sistema aislado, sin embargo recientemente este concepto ha cambiado, debido a que existe evidencia tanto clínica como experimental (a nivel celular y molecular) en donde se observan las interacciones que tiene con otros órganos y sistemas, principalmente el sistema endocrino y el sistema nervioso, lo que constituye una piedra angular en el mantenimiento de la homeostasis (Neveu y Le Moal, 1990; Spangelo y Gorospe, 1995; Ferenick et al., 1998).

Las evidencias a nivel celular y molecular de que los sistemas inmune y neuroendocrino se relacionan por medio de una comunicación bidireccional se deben entre otras a:

- A) Las células del sistema inmune, endocrino y nervioso expresan receptores para citocinas, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos.
- B) Los productos de estas células se encuentran en tejido linfoide, nervioso y endocrino.
- C) Los mediadores del sistema endocrino y nervioso pueden afectar al sistema inmune, así mismo, los mediadores del sistema inmune pueden afectar al sistema endocrino y nervioso. (Besedovsky y Del Rey, 1992; 1996)

Las evidencias a nivel clínico se observan sobre todo en:

- A) La incidencia en enfermedades de tipo autoinmune es mayor en hembras que en machos y esta diferencia se ha atribuido a los niveles de esteroides sexuales (Grossman et al., 1991)
- B) En infecciones parasitarias sobre todo en el modelo murino, se ha visto como la incidencia y la severidad de la infección son diferentes entre machos y hembras. Como ejemplos podemos mencionar las infecciones causadas por *Toxoplasma gondii* (en donde las hembras desarrollan inflamación cerebral más severa que los machos), *Plasmodium chabaudi* (los machos son más susceptibles a la infección que las hembras), *Leishmania spp.* (los machos son más resistentes a la infección), *Schistosoma haematobium* (las hembras presentan una mayor respuesta inmune a la infección que los machos) y *Taenia crassiceps* (las hembras son más susceptibles a la infección que los machos) (Larraalde et al., 1995; Craig et al., 2001; Verthelyi , 2001).

Estas diferencias se deben a muchos factores; tales como: vía de infección, respuesta inmunológica del hospedero, factores genéticos, diferencia en la exposición a los distintos estados infectivos del parásito, estado hormonal del hospedero al momento de la infección; además, en humanos están implicados factores socioeconómicos (Zuk , 1996; Craig et al., 2001).

En el modelo murino de cisticercosis existe una susceptibilidad asociada al sexo que junto con factores genéticos e inmunitarios hace a las hembras más susceptibles a la infección. Durante la infección aguda (4 semanas) las hembras presentan cargas parasitarias cuatro veces mayores que los machos,

sin embargo conforme aumenta el tiempo de infección (infecciones crónicas, más de 4 semanas) las cargas parasitarias en los machos se igualan a las de las hembras, debido a una modulación endocrina en donde se ha comprobado que la IL-6 juega un papel predominante al inducir la actividad de la enzima P-450 aromatasas responsable de la conversión de Testosterona a Estradiol, al mismo tiempo que disminuye la expresión de la enzima 5 α -reductasa encargada de la conversión de Testosterona (T $_4$) a Dihidrotestosterona (DHT) en el metabolismo de los esteroides sexuales masculinos (Morales-Montor et al., 1998; 2001; 2002).

II. ANTECEDENTES

A. Importancia de estudio de la cisticercosis y ciclo de vida del parásito.

La cisticercosis es una enfermedad infecciosa causada por la larva o cisticerco del parásito *Taenia solium*, se considera un problema de salud pública que afecta principalmente a países de Latinoamérica, Asia y África. Estos países se caracterizan por tener condiciones nutricionales y sanitarias deplorables además de ser una enfermedad emergente en países desarrollados debido a la gran movilización de inmigrantes (White, 2000). Su importancia radica en la alta frecuencia de pacientes con neurocisticercosis, que es la forma más grave y frecuente de la enfermedad en la que se pueden producir crisis convulsivas, meningitis, deterioro mental, etc. (Pumarola et al., 1987). En México el número de reportes de teniasis y de cisticercosis acumulados hasta la semana 50 del año 2000 son: teniasis 3,068 casos en 1999 y 1,057 hasta la semana 50 de 2000; y cisticercosis 857 casos en 1999 y 546 hasta la semana 50 del año 2000 (Epidemiología, SSA 2000).

Recientemente, con el uso de pruebas de inmunodiagnóstico, se logró detectar anticuerpos anti-cisticerco por arriba del 12.2%, en un grupo de soldados de población urbana, lo que constituye una prueba de que la cisticercosis continúa siendo un problema de salud pública (García-García et al., 1999).

El ciclo de vida de *Taenia solium* (Fig 1) se puede dividir en dos etapas; la primera, en el hospedero intermediario (cerdos) y la segunda, en el hospedero definitivo (humanos).

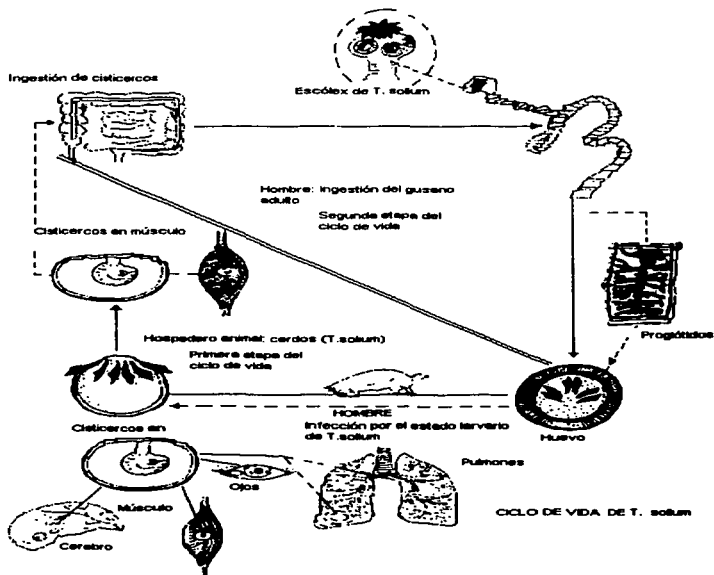


Figura 1. Ciclo de vida de la *Taenia solium*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La primera etapa se inicia con la ingestión de los huevos de *Taenia solium* por el hospedero intermediario (Fig 2). Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen al embrióforo (envoltura protectora) liberando al embrión. El embrión hexacanto activado también llamado oncosfera atraviesa la mucosa intestinal por la acción combinada de sus ganchos que desgarran el tejido, y de secreciones líticas que lo llevan a diferentes órganos hasta convertirse en un cisticerco (Fig 3).



Figura 2. Huevo de *Taenia sp.*

El cisticerco es una vesícula translúcida, ovoide o circular de 5 a 10 mm de diámetro con un escólex invaginado con cuatro ventosas y un círculo de ganchos, que puede permanecer en los tejidos del hospedero intermedio durante varios años rodeado por una cápsula de tejido conectivo. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del hospedero (Ambrosio J. et al., 1994). El tegumento y la pared vesicular son el sitio de contacto del parásito con el hospedero y desempeña un papel central en el establecimiento de la relación hospedero-parásito. (Flisser et al., 1997; 1998).

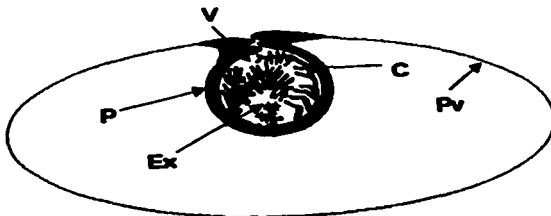


Figura 3. Esquema del cisticerco de *T. solium* , C: canal espiral, Ex: escólex, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular, V: espacio vestibular

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

La segunda etapa del ciclo de vida ocurre cuando el ser humano consume carne de cerdo infectada e ingiere al menos un cisticerco viable. La masticación, las sales biliares y las proteasas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la evaginación del escólex, éste se fija en la pared del yeyuno por medio de sus ventosas y ganchos rostelares.

La *Taenia* adulta mide entre 1.5 y 5 m de longitud, su cuerpo está formado por el escólex, el cuello y el estróbilo. El estróbilo es una cadena de segmentos o proglótidos que se desarrollan a partir del cuello, los proglótidos poseen cientos de testículos y un ovario trilobulado, por tal motivo se piensa que se autofecunda y puede producir hasta 50,000 huevos infectantes por día. La contaminación de aguas y alimentos con los huevos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene personal. Finalmente el ciclo de vida se cierra cuando el hospedero intermediario ingiere los huevos que contaminan alimentos y agua (Sarti, 1997; Flisser et al., 1998).

B. Cisticercosis murina

Como una alternativa experimental para el estudio de la cisticercosis se ha adoptado el modelo murino utilizando el parásito *Taenia crassiceps* cuya forma adulta se aloja comúnmente en el intestino de zorros y caninos y cuyo hospedero intermediario son los roedores. Los cisticercos se reproducen asexualmente por gemación, esta característica facilita su estudio ya que pueden mantenerse en el laboratorio mediante la inoculación intraperitoneal de los metacéstodos de *Taenia crassiceps* en el roedor (Larraide et al., 1995).

Algunas características por las cuales se utiliza este modelo son:

- 1) El ciclo de vida de *T. solium* y *T. crassiceps* es muy parecido.
- 2) Morfológicamente y anatómicamente son iguales.
- 3) Existen semejanzas antigénicas entre los cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps* que incluso pueden utilizarse en el inmunodiagnóstico y en la vacunación (Toledo A. et al., 2001).
- 4) Los cisticercos de *T. crassiceps* pueden perpetuarse con facilidad a través de inoculaciones sucesivas en ratones sin causar daño severo aparente a las estructuras vecinas en donde se aloja.
- 5) Constituye un excelente modelo que permite el estudio de la relación hospedero-parásito, a partir del cual, se han observado algunos aspectos de las interacciones inmunoendocrinas que se establecen en la infección por *T. crassiceps* en el ratón. (Morales-Montor et al., 2001).

C. Inmunología y Dimorfismo Sexual en la Cisticercosis murina

En 1986 Mosman y colaboradores comenzaron una revolución conceptual al dividir las células T cooperadoras (Th) en dos subpoblaciones: respuesta tipo Th1 o respuesta de tipo celular (caracterizada por la producción de IFN- γ e IL-2) comúnmente relacionada con la eliminación de parásitos intracelulares y respuesta de tipo Th2 o respuesta de tipo humoral (caracterizada por la producción de IL-4 e IL-10) relacionada con la eliminación de parásitos extracelulares (Abbas et al., 1996; Allen y Maizels, 1997). Así surgió un dogma

controversial, estos tipos de respuestas pueden ser claros en algunas infecciones parasitarias, sobre todo en los estudios realizados con *Leishmania major*, (un parásito intracelular que puede infectar macrófagos), en donde la respuesta de tipo Th1 es protectora para el hospedero y a su vez la respuesta de tipo Th2 es permisiva (Cox y Liew, 1992; Allen y Maizels, 1997). No en todas las infecciones parasitarias se refleja el resultado de esta caracterización, tal es el caso de la infección causada por *T. crassiceps*, (parásito extracelular) en donde la respuesta de tipo Th2 se ve favorecida, postulándose como una respuesta permisiva para el establecimiento del parásito.

Existen estudios que muestran resultados de la generación de una respuesta de tipo Th1 en la fase temprana de la infección, pero que eventualmente cambia a una respuesta de tipo Th2 conforme se incrementan las cargas parasitarias y el tiempo de infección en los ratones. Lo que sugiere que en la cisticercosis murina la respuesta de tipo Th1 es importante para evitar el establecimiento del parásito (Villa y Khun, 1995; Terrazas et al., 1998; Toenjes et al., 1998; Rodríguez-Sosa et al., 2002).

Como ya se mencionó en el modelo murino de cisticercosis, existen factores gonadales que favorecen la susceptibilidad de las hembras de la cepa de ratón BALB/c AnN durante la infección aguda por *T. crassiceps*, esta diferencia de susceptibilidad desaparece en la infección crónica, en esta última los niveles de 17β -estradiol (E_2) se incrementan hasta 200 veces su valor normal y los de T_4 y DHT disminuyen hasta un 90%, conjuntamente el peso de vesículas seminales y testículos disminuye, finalmente el macho pierde la

respuesta de eyaculación, la conducta de intromisión y la conducta de monta. (Larraide et al., 1995; Morales-Montor et al., 1996).

Esto que se puede considerar como una "feminización del macho" se ha propuesto como una novedosa y complicada estrategia de evasión de la respuesta inmune por parte del parásito, que se logra mediante la activación de la enzima P-450 aromataasa. Se ha estudiado a la IL-6 como la responsable de esta activación, ya que su concentración se incrementa de manera notable en los machos infectados crónicamente, su papel en la feminización del macho para permitir el establecimiento del parásito se comprobó en ratones Knock-out en IL-6^{-/-}, en los que el proceso de feminización no se lleva a cabo y cuando se reconstituye con IL-6 se produce la feminización del macho (Morales-Montor, 2001).

Cabe mencionar que los efectos de la T₄, DHT y E₂ se han evaluado en animales gonadectomizados, encontrándose que el tratamiento con T₄ y DHT disminuye las cargas parasitarias en un 50-70%, mientras que el tratamiento con E₂ las incrementa, a su vez se observó un aumento en la producción de IL-2 e IFN- γ en los animales tratados con T₄ y DHT; lo que ha sugerido un posible papel protector de los andrógenos a través de la estimulación de la inmunidad celular (Morales-Montor et al., 2002).

D. Vacunación

Dentro del ciclo de vida del parásito el cerdo es el hospedero intermediario para la transmisión de la cisticercosis, este hecho hace factible interferir con el paso de la enfermedad hacia el humano a través de la vacunación del cerdo. El desarrollo de una vacuna efectiva es uno de los principales propósitos de un gran número de investigadores. En muchos estudios se han utilizado antígenos obtenidos a partir de la oncosfera, los cisticercos o del gusano adulto. Recientemente algunos autores han recopilado información acerca de los diferentes grados de protección que se reportan con cada vacuna, con resultados que incluyen la inmunización en el modelo murino hasta la inmunización de cerdos (Flisser y Lightowels, 2001; Sciutto et al., 2002). Actualmente el uso de proteínas recombinantes han sido utilizadas con mayor éxito, este tipo de vacunas resuelve el problema de tener mezclas desconocidas en los extractos antigénicos, que pudieran causar reacciones adversas e incluso facilitar la infección (Manoutcharian et al., 1998; Flisser y Lightowels, 2001).

Los mejores resultados de la vacunación en cisticercosis, se han reportado con la inmunización basada en antígenos recombinantes, denominados: KETc1, KETc7, GK1, KETc12, que fueron obtenidos a partir de la separación de fracciones antigénicas de extractos solubles de cisticercos de *T. crassiceps* en geles de acrilamida, esas fracciones fueron utilizadas para evaluar su capacidad protectora en la cisticercosis porcina y murina, en donde

se encontró un alto grado de protección de los cerdos con 3 de las fracciones probadas (56, 66 y 74 KDa). Por otra parte se construyó una biblioteca de cDNA en el fago λ ZAP usando RNAm aislado de los cisticercos de *Taenia crassiceps*, se obtuvieron 13 clonas recombinantes seleccionadas por medio de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales en contra de las fracciones antigénicas de 56,66 y 74 KDa. Se seleccionaron 3 clonas (KETc1, KETc7 y KETc12) que fueron fuertemente reconocidas por sueros de cerdos infectados con *Taenia solium*. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos y usando un método de determinación de epitopos (que se basa en predicciones teóricas), se sintetizó el fragmento peptídico llamado GK1 (Valdez et al., 1994; Manoutcharian et al., 1996; 1998; 1999; Toledo et al., 1999; 2001; Sciutto et al., 2002). Una forma de expresar estos antígenos recombinantes de manera masiva es mediante la técnica de phage display, ésta permite reducir los costos de producción y teóricamente aumentar la efectividad de la vacuna debido a que ofrece la posibilidad de expresar grandes cantidades de proteínas en la superficie fagos filamentosos, comúnmente el fago M13 (Manoutcharian et al., 1999). Esta técnica tiene ventajas sobre otras herramientas de investigación ya que el fago por sí mismo es un excelente inmunógeno. El fago M13 tiene forma de filamento flexible, con un diámetro aproximado de 6.5 nm y una longitud de 900 nm, su cubierta es de 1.5-2 nm de grueso y su peso de $1.2-1.4 \times 10^7$ Da, su genoma es ADN circular de cadena sencilla que codifica para 10 diferentes proteínas, las proteínas del fago que se utilizan comúnmente son la proteína III y

la proteína VIII, de la última pueden encontrarse hasta 2700 copias (Barbas et al.,2001; William, G.T. , 2002).

Es importante mencionar que los epitopes seleccionados para el desarrollo de la vacuna expresada en fagos filamentosos están distribuidos entre los diferentes estadios del parásito y representan blancos accesibles al ataque inmunológico, lo que es de especial interés si se evalúa su localización en la oncosfera, considerando que es una fase del céstodo altamente susceptible al ataque inmunológico y que por lo tanto ofrece la posibilidad de protección en contra de la cisticercosis porcina (Lightowlers, 1999).

III. JUSTIFICACIÓN

La vacunación es una de las mejores formas de prevención de enfermedades infecciosas y actualmente existen diferentes métodos (como la tecnología de DNA recombinante) que permiten obtener vacunas más seguras que las obtenidas por métodos tradicionales, los cuales están basados en bacterias o virus atenuados o inactivados. Sin embargo la mayoría de las veces es necesario disminuir el número de refuerzos para obtener un efecto 100% protector, así como también, es necesario aumentar la inmunogenicidad de dichas vacunas, lo que ha generado un gran número de investigaciones dirigidas a la obtención de adyuvantes (O'Hagan, 1998). Dentro de los adyuvantes recientemente reportados se encuentran entre otros: toxinas bacterianas como la de la bacteria del cólera, inmunomoduladores endógenos como IL-2 e IL-12, lipopéptidos, micropartículas poliméricas y hormonas (Mc Cluskie y Weeratna, 2001).

En las enfermedades infecciosas, el uso de hormonas se ha utilizado con gran éxito debido a las interacciones immuno-endocrinas que se establecen en la relación hospedero-parásito, ejemplo de ello es el uso de Dehidroepiandrosterona (DHEA), una hormona esteroide precursora de andrógenos y estrógenos con actividad inmunomoduladora. En la vacunación de ratones viejos en contra de la influenza, el tratamiento con DHEA incrementó la respuesta humoral de los ratones tratados y por tanto también aumentó la resistencia a la infección por el virus de la influenza (Danenberg et al., 1995). En la inmunización con hepatitis B recombinante en ratones viejos la adición de

DHEA en la inmunización aumentó la generación de anticuerpos (Araneo et al., 1993). En el modelo murino de la encefalomiелitis equina venezolana, una enfermedad viral con gran prevalencia en Sur América, el tratamiento con DHEA aumentó la eficiencia en la vacunación de ratones con el virus TC-83 (Negrete et al., 2001)

Para el caso de la cisticercosis se han generado numerosas investigaciones enfocadas a la búsqueda de una vacuna efectiva que pueda ser aplicada en cerdos y con ello interferir con el paso de la infección hacia el humano (Larralde, 1995). La vacuna que utiliza antígenos recombinantes es la que ha reportado un mayor grado de protección (Sciutto et al., 2002) y su producción en grandes cantidades pretende llevarse a cabo mediante la técnica de phage display (Mountcharian et al., 1999; Sciutto et al., 2002). Sin embargo a pesar de reportar grandes ventajas con respecto a otras, tales como las vacunas obtenidas a partir de extractos del cisticerco de *Taenia solium*, extractos de la oncosfera del cisticerco de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* o extractos de huevos de *Taenia solium*, no se ha observado un efecto 100% protector necesario para que sea una vacuna efectiva (Flisser y Lightowers, 2001).

Atendiendo a estas necesidades y a la diferencia en la susceptibilidad de machos y hembras en el modelo murino de cisticercosis, es que se decidió evaluar si los andrógenos (T₄ y DHT) podían tener un efecto potenciador en la vacunación, evaluando a su vez si se establecía un dimorfismo sexual en la respuesta inmunológica no solo de manera natural en la infección sino también en la respuesta inmunológica que se presenta en la vacunación.

IV. HIPÓTESIS

Si existe una susceptibilidad asociada al sexo en la cisticercosis murina y se ha observado que los andrógenos proporcionan un efecto protector durante infección aguda, disminuyendo las cargas parasitarias, entonces es posible utilizar un andrógeno (Dihidrotestosterona o Testosterona) para potenciar el efecto de una vacuna y con ello investigar la forma en que la respuesta inmune puede estar hormonoregulada.

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe un efecto potenciador de los andrógenos en la vacunación contra cisticercosis por *T. crassiceps*, en un modelo murino.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar el efecto de la vacuna contra cisticercosis murina elaborada mediante Phage-Display, midiendo las cargas parasitarias en los animales vacunados y los animales control después de la infección con *Taenia crassiceps*, midiendo además el perfil de la respuesta inmune que se presenta mediante la expresión relativa de interleucinas características (Th1 y Th2)
- 2) Evaluar el efecto de la vacuna tanto en hembras como en machos y hacer una comparación.
- 3) Evaluar el efecto de la vacuna en la infección crónica (8 semanas) y aguda (4 semanas)
- 4) Comprobar si existe un dimorfismo sexual de la respuesta inmune o si las diferencias existentes son causa de un dimorfismo en la infección
- 5) Evaluar el efecto de los andrógenos: Testosterona y Dihidrotestosterona, en la respuesta inmune a la infección por *T. crassiceps*, en condiciones fisiológicas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Modelo Biológico

Para realizar este estudio se utilizaron ratones hembra y macho de la cepa BALB/c AnN, de entre 4 y 6 semanas de edad. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio: temperatura constante de $\pm 21^{\circ}$ C, ciclo de 12 h luz/ 12h oscuridad, recibiendo alimento Harlan Tekland y agua *ad libitum*.

B. Infección experimental

Se utilizó la cepa ORF (de rápido crecimiento) de *T. crassiceps* aislada por Freeman en 1962. Los cisticercos para la infección fueron obtenidos de un ratón hembra infectada 3-6 meses antes.

Se inocularon, vía intraperitoneal, 10 cisticercos (de 2-3 mm de diámetro, sin gemas) suspendidos en aproximadamente 50 μ L de PBS (0.15M NaCl, 0.01M buffer de Fosfato de sodio, pH 7.2) utilizando una aguja de 21G.

C. Tratamientos utilizados

1) Experimento 1

Se utilizaron ratones hembras y ratones macho y se exploraron las diferencias en animales Vacunados (V) y Vacunados y tratados con Testosterona (V+T₄). El tiempo de infección fue de 8 semanas

2) Experimento 2

Se incluyeron los siguientes grupos de animales, utilizando hembras y machos, en un tiempo de infección de cuatro semanas

- No Vacunados (NV)
- Vacunados (V)
- Vacunados más Dihidrotestosterona (V+DHT)

El número de animales utilizados en estos grupos fue de 6.

Para los grupos controles se utilizó:

- Fago M13, vehículo de la vacuna (FM13)
- Dihidrotestosterona (DHT)
- Aceite de Maíz, vehículo de la hormona (Ac.)

El número de animales para estos grupos fue de 4

3) Experimento 3

Se utilizaron los siguientes grupos de animales, tanto en hembras como en machos:

- No Vacunados (NV)
- Vacunados (V)
- Vacunados más pellet de Dihidrotestosterona (V+pDHT)

Número de animales por grupo: 6

Para los grupos controles se utilizó:

- Fago M13, vehículo de la vacuna (FM13)
- Dihidrotestosterona en pellet (pDHT)
- Pellet placebo, vehículo de la hormona (Placebo)

Número de animales por grupo: 4

El tiempo de infección fue de 4 semanas.

Al término del tiempo de infección (4 ó 8 semanas) se realizó el sacrificio de estos grupos de animales y se colectaron los cisticercos localizados en la cavidad peritoneal para efectuar el conteo de los mismos y establecer la carga parasitaria.

En el experimento 2 se obtuvo el bazo de cada animal para efectuar la extracción de RNA total, y con ello realizar la cuantificación de interleucinas por medio de RT-PCR.

D. Preparación de la vacuna

La vacuna obtenida mediante el proceso de phage-display fue elaborada por el grupo de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas dirigido por el Dr. Karen Manoutcharian.

Se utilizó 1µg de proteína (antígeno KETc1, KETc7, GK1 y KETc12) equivalente a una concentración de 10^{11} fagos/100µL de TBS (50mM TRIS-HCl, 150mM NaCl) /ratón.

Se inmunizó vía subcutánea con aguja para tuberculina de 25 G y se retó al animal una semana después.

E. Tratamiento con andrógenos

La cantidad de T₄ o DHT utilizada fue de 5µg. Preparada de la siguiente manera (Experimentos 1 y 2):

A partir de una solución de T₄ o DHT de 1 mg /mL en etanol se diluyó en aceite de maíz y se evaporó el etanol utilizando un Baño María a 50 ° C por un periodo de 2 horas, se inyectó vía subcutánea 30µL de aceite por ratón cada 5 días a lo largo de 4 semanas en el caso de DHT (Experimento 2) y 100µL de aceite por ratón en el caso de T₄ por 8 semanas (Experimento 1)

En el caso del experimento 3, se utilizaron pellets de DHT (tabletas subdermales de liberación prolongada) a una concentración de 5µg con un tiempo de liberación de 30 días, de la compañía Innovative Research of America.

Como control se utilizó solo aceite de maíz (vehículo de la hormona) y para el experimento 3 se utilizaron pellets placebo.

El tratamiento con T₄ se comenzó una semana después de la vacunación y el tratamiento con DHT se comenzó el mismo día de la vacunación.

F. Extracción de RNA total

Se extrajo RNA total a partir de bazo de los diferentes grupos de tratamiento, de acuerdo al siguiente protocolo:

En tubos estériles, se homogenizaron 100 mg de tejido (se agruparon los bazos de cada grupo de tratamiento) por 1 mL de TRIzol¹ (GIBCO BRL) a 4^o C. Enjuagando previamente la cuchilla del politrón con agua tratada con Dietilpircarbonato (DEPC)² y con solución TRIzol.

- 1) Se transfirieron las muestras homogenizadas a tubos eppendorf de 1.5 mL, y se agregaron 200 µL de cloroformo por cada 1 mL de homogenado, se taparon y se agitaron con vortex por 30 segundos.
- 2) Se mantuvieron en hielo por 5 minutos. Se centrifugaron a 12,000 rpm a 4^oC por 15 minutos. Obteniéndose 2 fases: la inferior o fase orgánica compuesta por cloroformo y proteínas y la fase acuosa en donde encontramos el RNA.

¹ El reactivo TRIzol consiste en una solución de fenol e isotiocianato de guanidina que mantiene la integridad del RNA y disgrega los demás componentes celulares.

² El DEPC es un inhibidor de enzimas que degradan al RNA

- 3) La fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf y se agregó una cantidad equivalente de isopropanol, manteniendo esta muestra a 4°C por toda una noche.
- 4) Las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 12,000 rpm a 4°C, el RNA se encontró en una pastilla color blanco-amarillo
- 5) Se removió el sobrenadante y la pastilla se lavó con etanol al 75%, centrifugándose posteriormente a 7,500 rpm por 8 minutos a 4°C.
- 6) Se removió el sobrenadante y se invirtieron los tubos sobre gasa estéril para permitir el secado de la pastilla, evitando secarla por completo para evitar la insolubilidad de la misma.
- 7) La pastilla de RNA se disolvió en 50µL de agua tratada con DEPC
- 8) Se cuantificó el RNA total por medio de diluciones 1:500 para leer la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm. Considerando que el índice entre estas dos absorbancias estuviera entre 1.6-1.9 para verificar la integridad del RNA obtenido y se calculó la concentración tomando en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 40µg/mL de RNA.

G. Síntesis de Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen, las secuencias para los diferentes genes se diseñaron de acuerdo a las ya reportadas en la bibliografía (Tabla 1) (Ulett C. et al., 1999).

Tabla 1. Secuencia sentido y antisentido de los genes para interleucinas y tamaños de los fragmentos.

Gen	Secuencia (5'-3') ^a	Tamaño (bp)
<i>IL-1β</i>	TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT CCCATACTTTAGGAAGACACGGATT	502
<i>IL-2</i>	TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG GAGTCAAATCCAGAACATGCCGCAG	167
<i>IL-4</i>	CGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCT GACTCATTGATGGTGCAGCTTATCG	180
<i>IL-6</i>	ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAG CACTAGGTTTGCCGAGTAGAT	638
<i>IL-10</i>	AACTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA	237
<i>TNF-α</i>	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG	307
<i>β-Actina</i> ^b	GGGTGAGAAGGATTCTATG GGTCTCAAACATGATCTGGG	220

a) Para cada par de oligonucleótidos, la secuencia sentido está arriba de la antisentido

b) β -actina se utiliza como gen constitutivo de control de expresión

H. Retrotranscripción (RT)

Para realizar la retrotranscripción de RNA total de cada muestra se preparó la siguiente mezcla de reacción:

	<u>Concentración final</u>
RNA Total	4µg (en un volumen de 2 µL)
Buffer RT 5x	50mM Tris-HCl pH=8.3
	75mM KCl
	3 mM MgCl ₂
DTT (Ditritioetitol, 100mM)	0.1M
dNTP's (10mM)	0.5 mM de cada uno (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)
M-MLV RT (Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murino Moloney)	400Unidades
Oligo dT	0.05µg

Se incubó en un termociclador marca Applied Biosystems, Gene Amp, PCR Systems 2700, a 37°C por 60 minutos

I. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar los genes de las interleucinas antes descritas. La mezcla de reacción fue la siguiente:

	<u>Concentración final</u>
Buffer PCR 10X	20 mM Tris-HCl pH=8.3, KCl 50mM
MgCl ₂ 20X (50mM)	1.0mM
dNTP's (10mM)	0.2mM
oligo sentido	0.5mM
oligo antisentido	0.5mM
Taq DNA polimerasa	2.5 Unidades
H ₂ O	cbp 40 µL

A 10 μ L de reacción RT se agregó la mezcla de PCR, la reacción se incubó en un termociclador Applied Biosystems, Gene Amp, PCR Systems 2700. Las condiciones de reacción se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de reacción para la PCR

Gen	Desnaturalización			Hibridación			Extensión		
	ciclos	Temp (°C)	Tiempo (min)	ciclos	Temp (°C)	Tiempo (min)	ciclos	Temp (°C)	Tiempo (min)
IL-1 β	1	95	5	30	63	1	1	72	1
IL-2	1	95	5	35	63	1	1	72	1
IL-4	1	95	5	35	63	1	1	72	1
IL-6	1	95	5	30	60	1	1	72	1
IL-10	1	95	5	30	63	1	1	72	1
TNF- α	1	95	5	30	63	1	1	72	1

Para todas las reacciones hubo un ciclo final a 72°C por 1 minuto

Todos los reactivos fueron de Biotecnologías Universitarias.

Las condiciones de reacción de cada interleucina fueron estandarizadas previamente (Ver Apéndice I).

J. Electroforesis de los productos de RT-PCR

Para observar los productos de amplificación se depositaron 30 μL del producto de RT-PCR con amortiguador de carga 1X para DNA en un gel de agarosa al 2% preparado con TBE 1x (Buffer de corrida, Tris Base 0.5M, ácido bórico 0.5M, EDTA 10mM) y teñidos con Bromuro de Etidio ($10\mu\text{g}/\mu\text{L}$), utilizando un marcador de peso molecular de 100 bp marca BIO-RAD. Cada gel se corrió a 80 voltios por 1.5 horas. Se observó una sola banda para cada gen amplificado.

Las fotografías de cada gel fueron escaneadas y a las bandas de amplificación se les realizó densitometría para evaluar la expresión relativa de cada gen con respecto al gen constitutivo de β - Actina.

VII. RESULTADOS

A. Efecto de la vacuna en la carga parasitaria a las 8 semanas de infección utilizando como andrógeno Testosterona (T₄)

En la Tabla 3 se presenta el número de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones de los diferentes grupos de tratamiento después de 8 semanas de infección, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$), sin embargo si existen diferencias apreciables entre machos y hembras, se puede observar como las cargas parasitarias son mayores en las hembras.

Tabla 3. Efecto de la vacunación medido como carga parasitaria.

Tratamiento	Carga	Tratamiento	Carga	
Hembras	parasitaria	Machos	parasitaria	
Vacunados	1	0	158	
	2	448	3	3
	3	405	3	320
	4	540	4	488
	5	550	5	381
Vacunados+T ₄	1	9	79	
	2	685	2	276
	3	520	3	145
	4	526	4	193
		5	27	

Los datos fueron analizados con t-student $p < 0.05$, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos

B. Efecto de la vacunación en carga parasitaria a las 4 semanas de infección utilizando como andrógeno DHT.

En la Tabla 4 se encuentran los resultados individuales de carga parasitaria encontrados después de cuatro semanas de infección para los experimentos 2 y 3, incluyen también los grupos control. La carga parasitaria está medida como la cantidad de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal después de las cuatro semanas de infección. La figura 4 muestra el gráfico obtenido para la carga parasitaria de los diferentes grupos de tratamiento, los datos se representan como la media \pm el error estándar de cada grupo.

Se observan diferencias significativas entre machos y hembras en todos los tratamientos ($p < 0.05$), es importante notar como en los machos el efecto de la vacuna tiende a aumentar la carga parasitaria con respecto a los No Vacunados ($p < 0.05$), y como al tener la vacuna más DHT la carga parasitaria disminuye, no así en las hembras en donde si se observa un efecto de la vacuna en la disminución de la carga parasitaria, también es importante notar que el vehículo de la vacuna (FM13) tiende a aumentar las cargas parasitarias en ambos sexos aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (Fig 4).

Tabla 4. Efecto de la vacuna medido como carga parasitaria.

Tratamiento: <i>Hebras</i>		Carga Parasitaria	Tratamiento: <i>Machos</i>		Carga Parasitaria
NV	1	97	NV	1	16
	2	63		2	19
	3	46		3	7
	4	52		4	18
	5	37		5	16
	6	90		6	11
	7	89		7	7
	8	50		8	63
	9	73		9	0
	10	86		10	23
	11	86		11	10
V	1	80	V	1	28
	2	26		2	35
	3	59		3	91
	4	84		4	39
	5	68		5	48
	6	47		6	16
	7	43		7	24
	8	57		8	31
	9	51		9	22
	10	44		10	32
	11	27		11	13
V+DHT	1	46	V+DHT	1	17
	2	38		2	10
	3	44		3	20
	4	93		4	19
	5	57		5	26
	6	38		6	9
V+pdHT	1	60	V+pdHT	1	35
	2	63		2	4
	3	45		3	52
	4	60		4	33
	5	76		5	57
	6	72			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 4. Efecto de la vacuna medido como carga parasitaria (controles)

		Carga Parasitaria			Carga Parasitaria
FM13	1	19	FM13	1	22
	2	25		2	28
	3	79		3	11
	4	22		4	12
	5	186		5	81
	6	124		6	48
	7	135		7	27
	8	126		8	50
DHT	1	36	DHT	1	15
	2	56		2	33
	3	53		3	8
	4	115		4	27
pDHT	1	93	pDHT	1	29
	2	92		2	24
	3	39		3	38
	4	50		4	7
Ac.	1	66	Ac.	1	16
	2	48		2	11
	3	33		3	21
	4	35		4	10
Placebo	1	40	Placebo	1	31
	2	102		2	29
	3	75		3	19
	4	35		4	36

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

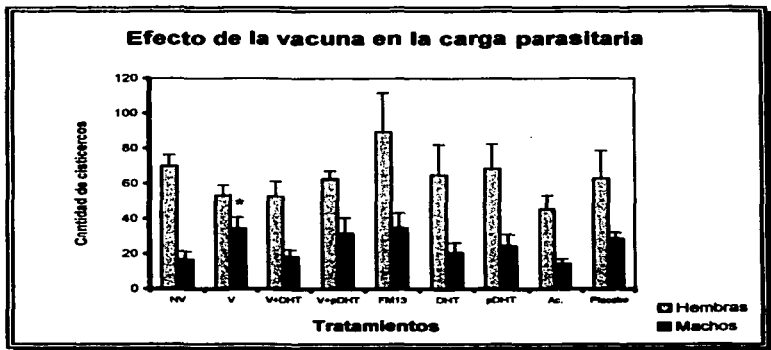


Figura 4. Efecto de la vacuna medido en carga parasitaria a cuatro semanas de infección. Los datos presentan la media \pm error estándar. NV, No vacunados; V, Vacunados; V+DHT, Vacunados + DHT en aceite; V+pDHT, Vacunados + pellet DHT; DHT, Dihidrotestosterona en aceite; pDHT, pellet DHT; Ac, Acite de Maiz; Placebo, pellet placebo.

* $p < 0.05$ al comparar machos Vacunados con respecto a los machos No Vacunados.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

C. Resultados globales a cuatro semanas de infección.

La tabla 5 muestra los resultados de los experimentos 2 y 3 expresados como el porcentaje de animales protegidos, el número de animales que tuvieron una carga parasitaria menor a la media en comparación con los No Vacunados, se puede observar el efecto de los vehículos, tanto de la vacuna como de la hormona así como también el efecto solo de la hormona. El mayor porcentaje de protección lo presentan las hembras vacunadas y tratadas con DHT, es apreciable que el vehículo de la vacuna (Fago M13), tiene influencia sobre la carga parasitaria.

Tabla 5. Efecto de la vacuna en la carga parasitaria expresado como % de protección

Tratamiento	Hembras (%)	Machos (%)
No Vacunados	0	0
Vacunados	81.8	18.2
Vacunados + DHT	83.3	25
Fago M13	62.5	37.5
DHT	37.5	25
Aceite o pellet placebo	75	25

D. Perfil de respuesta inmunológico

Se evaluó la expresión relativa de cada gen de interleucina para caracterizar el tipo de respuesta inmunológico que se presentaba en cada tratamiento a las cuatro semanas de infección, la expresión relativa se obtuvo mediante el cociente de expresión de cada gen con el del gen constitutivo β -actina. El nivel de expresión del gen constitutivo se mantuvo constante en todos los tratamientos (Fig 5-15), los valores en las gráficas obtenidas a partir del análisis densitométrico (Fig 6-16) representan la media \pm desviación estándar de dos experimentos.

1. IL-1 β

La figura 5 muestra el gel de agarosa para la expresión de IL-1 β , se observa una banda de expresión alrededor de 500 bp, ello nos indica que no hubo expresión de secuencias inespecíficas. La figura 6 muestra el resultado de la densitometría, la mayoría de las diferencias estadísticamente significativas que se presentan son en los machos, notándose una disminución en la expresión de este gen, no se observan diferencias entre machos y hembras para los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

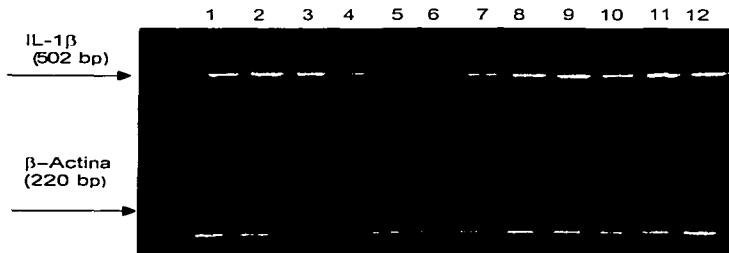


Figura 5. Productos de PCR en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio para el gen de IL-1 β , 1,2. No Vacunados; 3,4. Vacunados; 5,6. Vacunados +DHT; 7,8. Fago M13; 9,10. DHT; 11,12. Aceite. Hembras: 1,3,5,7,9,11; Machos:2,4,6,8,10,12.

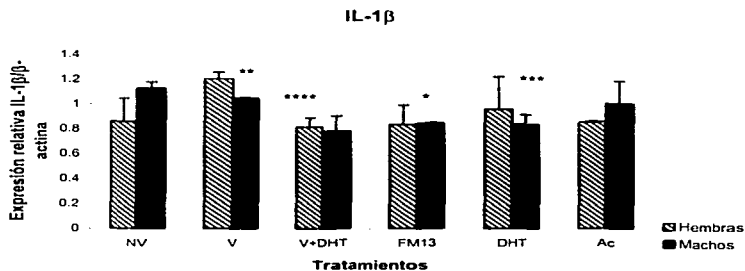


Figura 6. Expresión relativa del gen de IL-1 β . NV. No Vacunados, V. Vacunados, V+DHT. Vacunados + DHT, FM13. Fago M13, DHT Dihidrotestosterona, Ac. Aceite.

*p < 0.05 Machos NV contra Machos FM13

**p < 0.05 Machos V contra Machos FM13

***p < 0.05 Machos DHT contra Machos NV

****p < 0.05 Hembras VDHT contra Hembras V

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

2. Respuesta de tipo Th-1

2.1 IL-2

La figura 7 muestra la fotografía del gel de electroforesis para los productos de RT-PCR de los distintos tratamientos para el gen de IL-2, en éste puede apreciarse como las bandas de expresión son menos intensas que para la mayoría de las interleucinas analizadas, la expresión relativa con respecto al gen constitutivo (Fig 8) indica que la mayor expresión se tuvo en las hembras vacunadas que además fueron tratadas con DHT, sin embargo con respecto a su control (hembras vacunadas) esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Al igual que para IL-1 β no existen diferencias en la expresión relativa entre machos y hembras para los diferentes tratamientos ($p < 0.05$).

2.2 TNF- α

En la figura 9 se encuentra la fotografía del gel de electroforesis para los productos de RT-PCR en el tamaño correspondiente al fragmento esperado (307bp). El tratamiento con DHT aumentó significativamente ($p < 0.05$) la expresión de TNF- α tanto en machos como en hembras con respecto a los No Vacunados y en hembras tratadas con FM13 con respecto a las No Vacunadas (Fig 10).

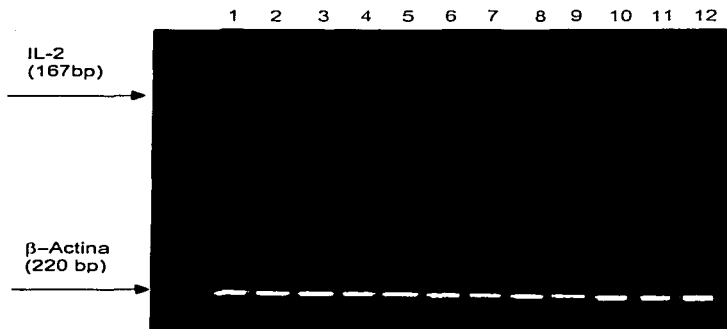


Figura 7. Productos de PCR teñidos con bromuro de etidio para el gen de IL-2. 1,2. No vacunados; 3,4. Vacunados; 5,6. Vacunados +DHT; 7,8. Fago M13; 9,10. DHT; 11,12. Aceite. Hembras: 1,3,5,7,9,11; Machos:2,4,6,8,10,12.

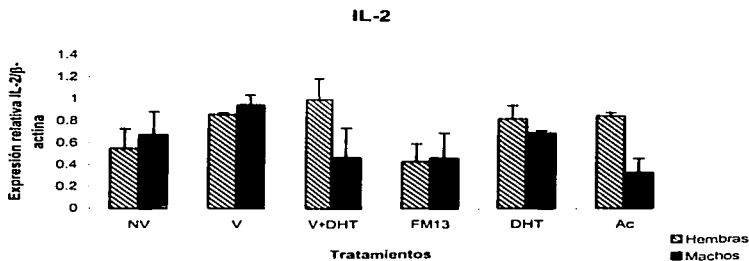


Figura 8. Expresión relativa del gen de IL-2. NV. No Vacunados, V. Vacunados, V+DHT. Vacunados + DHT, FM13. Fago M13, DHT. Dihidrotestosterona, Ac. Aceite.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

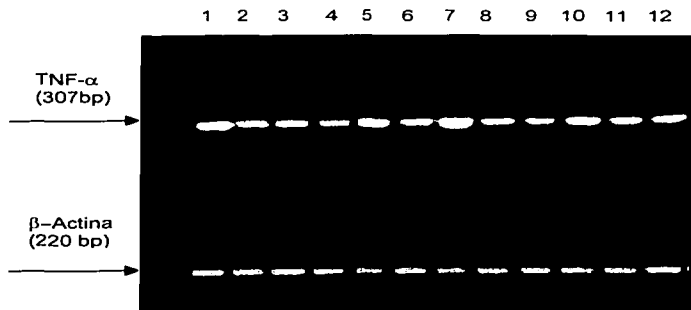


Figura 9. Productos de PCR en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio para el gen de TNF- α , 1,2. No vacunados; 3,4. Vacunados; 5,6. Vacunados +DHT; 7,8. Fago M13; 9,10. DHT; 11,12. Aceite. Hembras: 1,3,5,7,9,11; Machos:2,4,6,8,10,12.

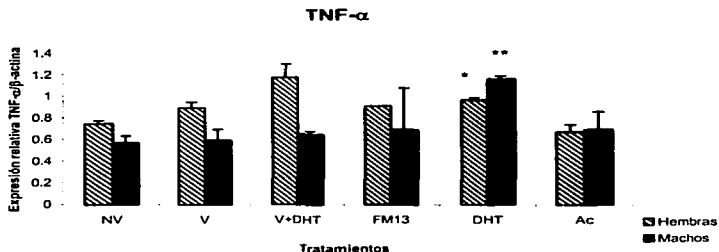


Figura 10. Expresión relativa del gen de TNF- α . NV, No Vacunados, V, Vacunados, V+DHT, Vacunados + DHT, FM13, Fago M13, DHT, Dihidrotestosterona, Ac, Aceite.

* $p < 0.05$ DHT Hembras contra NV Hembras

** $p < 0.05$ DHT Machos contra NV Machos

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3. Respuesta de tipo Th-2

3.1 IL-4

En la figura 11 se observa una sola banda de expresión correspondiente al tamaño del fragmento para el gen de IL-4 (180 bp), en el análisis densitométrico (Fig 12) los machos tratados solo con aceite presentan una disminución en la expresión de este gen con respecto a los machos No Vacunados ($p < 0.05$), esta característica es importante si consideramos que el aceite es el vehículo de la hormona y que por tanto no debería tener efecto alguno sobre la expresión del gen de IL-4.

3.2 IL-6

La figura 13 corresponde a la fotografía para el gel de electroforesis de los productos de RT-PCR para el gen de IL-6, todas las bandas de expresión corresponden al tamaño esperado para el fragmento del gen, al realizar la densitometría (Fig 14) se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) para los machos Vacunados y tratados con DHT no así cuando son tratados únicamente con DHT ya que la expresión se ve disminuida con respecto a los No Vacunados.

3.3 IL-10

Se puede observar una banda de expresión para el gen de IL-10 correspondiente a 237 bp (Fig 15), existe un aumento significativo ($p < 0.05$) en la expresión de este gen para las hembras vacunadas con respecto a las que solo tienen el vehículo (FM13) y una disminución de la expresión relativa del gen cuando además de ser vacunadas se les trató con DHT (Fig 16).

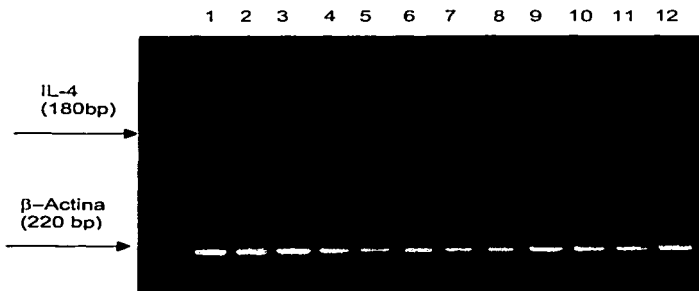


Figura 11. Productos de PCR en gel de agarosa para el gen de IL-4, 1,2. No Vacunados; 3,4. Vacunados; 5,6. Vacunados +DHT; 7,8. Fago M13; 9,10. DHT; 11,12. Aceite. Hembras: 1,3,5,7,9,11; Machos:2,4,6,8,10,12.

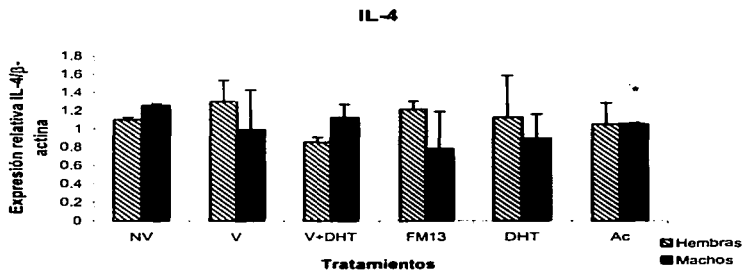


Figura 12. Expresión relativa del gen de IL-4 NV. No Vacunados, V. Vacunados, V+DHT. Vacunados + DHT, FM13. Fago M13, DHT. Dihidrotestosterona, Ac. Aceite.

* $p < 0.05$ Hembras Ac contra Hembras NV

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

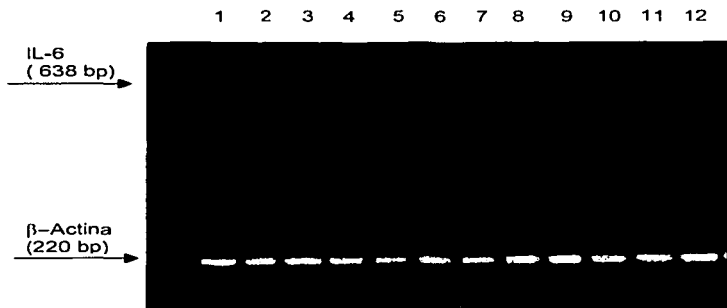


Figura 13. Productos de PCR en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio para el gen de IL-6. 1,2. No vacunados; 3,4. Vacunados; 5,6. Vacunados +DHT; 7,8. Fago M13; 9,10. DHT; 11,12. Aceite. Hembras: 1,3,5,7,9,11; Machos:2,4,6,8,10,12.

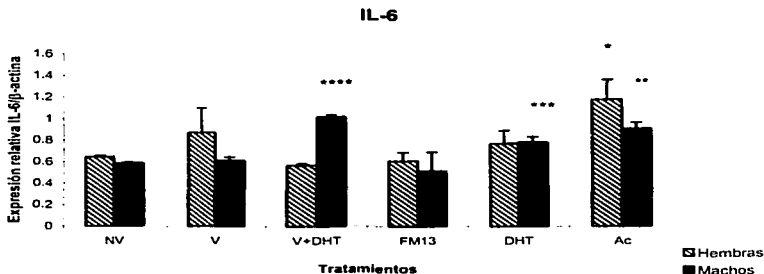


Figura 14. Expresión relativa del gen de IL-6
NV, No Vacunados, V. Vacunados, V+DHT. Vacunados + DHT, FM13. Fago M13, DHT. Dihidrotosterona, Ac. Aceite.

*p < 0.05 Hembras Ac contra Hembras NV

**p < 0.05 Machos Ac contra Machos NV

***p < 0.05 Machos DHT contra Machos NV

****p < 0.05 Machos V+DHT contra Machos V

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

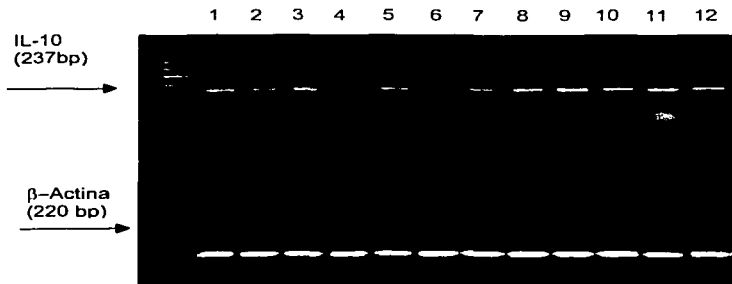


Figura 15. Productos de PCR en gel de agarosa teñidos con bromuro de etidio para el gen de IL-10. 1,2. No vacunados; 3,4. Vacunados; 5,6. Vacunados +DHT; 7,8. Fago M13; 9,10. DHT; 11,12. Aceite. Hembras: 1,3,5,7,9,11; Machos:2,4,6,8,10,12.

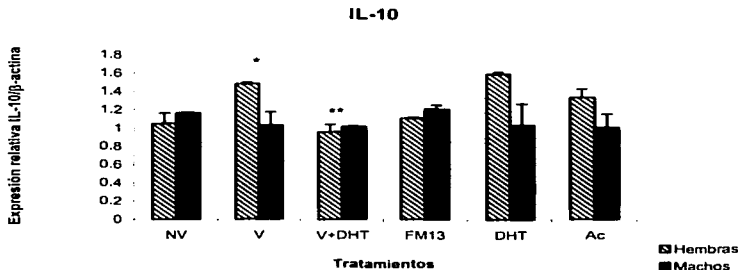


Figura 16. Expresión relativa del gen de IL-10
NV. No Vacunados, V. Vacunados, V+DHT. Vacunados + DHT, FM13. Fago M13,
DHT, Dihidrotestosterona, Ac. Aceite.

* $p < 0.05$ Hembras Vacunadas contra Hembras con FM13

** $p < 0.05$ Hembras Vacunadas+DHT contra Hembras Vacunadas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. DISCUSIÓN

En la cisticercosis murina inducida por *Taenia crassiceps* existe una clara dicotomía con respecto a la susceptibilidad a la infección, varios experimentos han demostrado que las diferencias fisiológicas entre machos y hembras juegan un papel importante para determinar dicha susceptibilidad. El presente trabajo evaluó el papel de los andrógenos en la protección contra la cisticercosis murina y su posible efecto potenciador en la vacunación.

Los resultados a 8 semanas de infección (Tabla 3) utilizando Testosterona, permitieron observar diferencias estadísticamente significativas entre sexos, las hembras presentan una carga parasitaria mayor que los machos tanto para los animales tratados con Testosterona como para los animales que solo fueron vacunados, a pesar de que las diferencias entre tratamientos no fueron estadísticamente significativas se logra apreciar una tendencia que muestra que la carga parasitaria aumenta cuando los ratones fueron tratados con Testosterona, posiblemente debido a que la Testosterona una vez en torrente circulatorio queda expuesta a cambios estructurales, mediados por la acción de varios sistemas enzimáticos, una de estas modificaciones es la aromatización que conduce a la biosíntesis de estrógenos (Griffin et al., 1992), como ya se ha comprobado el aumento en los niveles séricos de 17β - Estradiol van aunados con un aumento en la carga parasitaria que incluso en el macho se considera un proceso de feminización inducido por el parásito que le proporciona

un ambiente favorable (Morales- Montor et al., 1995). Por ello, para los subsecuentes experimentos se decidió cambiar Testosterona por Dihidrotestosterona un andrógeno que no pude metabolizarse a estradiol y cuyo efecto también se ha evaluado en ratones gonadectomizados observándose que la carga parasitaria decreció en un 70% después de la reconstitución con dicha hormona (Morales-Montor, et al., 2002), además también se disminuyó el tiempo de infección, ya que la mayoría de estudios realizados en vacunación se realizan a 4 semanas, lo que permite observar si el cisticerco ha sido capaz de establecerse en su hospedero murino.

Los datos que se presentan de manera individual en la tabla 4 permiten observar las diferencias que pueden establecerse no solo entre sexos sino también de manera individual, ello confiere una mayor credibilidad a los resultados aquí expuestos. De forma evidente se muestra en la figura 4 las diferencias en carga parasitaria que se establecen entre machos y hembras, las hembras nuevamente presentan cargas parasitarias mayores que los machos en todos los tratamientos, ni la vacunación de los ratones ni el tratamiento con Dihidrotestosterona logró disminuir la carga parasitaria de manera importante en ninguno de los sexos, pero de acuerdo a características morfológicas observadas en el momento del recuento de cisticercos obtenidos de la cavidad peritoneal de los ratones, los animales que fueron tratados con Dihidrotestosterona ya sea el andrógeno solo o aunado a la vacunación, presentaron menor número de gemas y se observaron de menor tamaño, sugiriendo que el tratamiento con Dihidrotestosterona provoca un daño en la

integridad del parásito, lo que posiblemente es un indicio de que con un mayor tiempo de tratamiento con el andrógeno se pueda lograr la eliminación del parásito.

Diversos estudios se han orientado a caracterizar el fenotipo de la respuesta inmune Th1/Th2 con base en el perfil de citocinas en la cisticercosis murina. La técnica de RT-PCR al ser una valiosa herramienta utilizada en biología molecular para el estudio de la expresión de genes nos permitió caracterizar el tipo de respuesta que se desencadena tanto en la infección como en la vacunación y en la vacunación más el tratamiento con Dihidrotestosterona, sin embargo el hecho de encontrar distintos niveles de expresión de las diferentes citocinas no indica necesariamente que las proteínas se estén expresando pues hay que tomar en cuenta que la producción de muchas de ellas está controlada por mecanismos postranscripcionales (Abbas et al., 2000), por lo que es necesario que los datos encontrados para los distintos niveles de expresión para cada gen de citocina sean corroborados con los niveles de proteína en sobrenadantes de linfocitos estimulados (un método para realizarlo es la técnica de ELISA).

Se ha reportado que en las etapas tempranas de la infección, alrededor de la primera semana, el tipo de respuesta inmune predominante es Th1, la cual está asociada con un desarrollo limitado del parásito. A medida que la infección progresa, la respuesta inmune se polariza hacia un fenotipo Th2 con un incremento concomitante de la carga parasitaria (Terrazas et al., 1998). Hasta la fecha no se conocen los mecanismos que modulan el cambio en la subpoblación

predominante, pero la participación de factores tanto del hospedero como del parásito podrían ser responsables de esta polarización.

El perfil predominante de la respuesta inmunológica encontrado para los animales con 4 semanas de infección es de tipo Th2 posiblemente ya nos encontremos dentro del cambio de subpoblación al momento de realizar este análisis, la respuesta generada cuando los animales fueron vacunados también parece ser de tipo Th2, es necesario comprobar si este cambio de subpoblación es debido a que los antígenos que componen la vacuna inducen una respuesta Th2, agregando un grupo control que evalúe la respuesta inmunológica solo a los antígenos recombinantes, Sciutto y colaboradores han reportado niveles de protección hasta de un 80% (Sciutto et al., 2002), por tanto la respuesta inmunológica al fago M13, vehículo de la vacuna, también fue evaluada encontrándonos que al ser un vector altamente inmunogénico, es capaz de inducir una respuesta inmune por sí solo, la cual podría estar en contraposición con la respuesta que despiertan los antígenos recombinantes y que debido a ello no se logre apreciar un efecto protector medido como la disminución de la carga parasitaria.

Para contestar la pregunta principal: ¿las hormonas, en especial los andrógenos (DHT en este caso) son capaces de modular la respuesta inmune a la vacunación?, se evaluó la respuesta inducida cuando se trataba a los animales con Dihidrotestosterona y el andrógeno aunado a la vacunación, el resultado fue alentador al encontrar que DHT induce un aumento en la expresión de TNF- α (Fig 10) -respuesta Th1- en ambos sexos y que además la

expresión de IL-6 (Fig 14), a quien se ha atribuido como responsable de la activación de la enzima P-450 aromatasas y por ende de la feminización del macho crónicamente infectado (Morales-Montor et al. 1998), se ve considerablemente disminuida en los machos, lo que indica que también en animales que no han sido gonadectomizados el tratamiento con andrógenos parece ofrecer un efecto protector, que si bien no se ve reflejado en la disminución de la carga parasitaria ello puede deberse a que el tiempo de infección solo fueron 4 semanas, esto es importante debido a que actualmente se cuentan con análogos de hormonas esteroides que pueden proveer un efecto inmunomodulador sin el efecto biológico, propio de las hormonas esteroides.

El efecto del tratamiento con Dihidrotestosterona y la vacunación tuvo una disminución importante de los niveles de IL-10 (Fig 16) para las hembras, la IL-10 es responsable de la inhibición de la respuesta tipo Th1 (Abbas et al., 2000) y por ello no se observan cambios apreciables en la disminución de la carga parasitaria (Fig 4), aunque al parecer los niveles de IL-10 se ven aumentados con la vacunación este efecto se contrarresta cuando se trata con Dihidrotestosterona, en el balance de la respuesta, hay un mayor aumento de IL-10 debido a la vacuna el cual la Dihidrotestosterona no logra equilibrar pero que sirve para detener la proliferación del parásito.

En la tabla 5 se presentan los datos expresados como porcentaje de protección, notándose que al expresar así los resultados se generan resultados que no reflejan la realidad en cuanto a grado de protección se refiere, por eso es

importante recalcar que en los estudios de vacunación es necesario que los datos se presenten de forma individual pues las características de una vacuna ideal indican que ésta debe tener un 100% de protección (Beverley , 2002).

La evidencia del dimorfismo sexual inmunológico proviene de las diferencias encontradas en la respuesta a la vacunación, si bien no en todo el perfil inmunológico (Th1/Th2) se observa una respuesta dimorfica entre machos y hembras si es notable su participación en la respuesta a la vacunación para las interleucinas que juegan un papel predominante en esta infección: IL-10 cuando se compara el efecto de la vacunación e IL-6 y TNF- α cuando se analizan los grupos Vacunados más Dihidrotestosterona.

Aunque sería arriesgado asegurar que existe un dimorfismo sexual en la respuesta inmunológica, se puede sugerir que la respuesta entre machos y hembras desencadena distintas formas de confrontación con el parásito, de donde queda por comprobar si el efecto solo es debido al efecto directo de las hormonas sobre el parásito o si es debida a la conjunción del efecto de las hormonas sobre el parásito y su efecto sobre el sistema inmunológico.

IX. CONCLUSIONES

- ✦ El tratamiento con Dihidrotestosterona provee un efecto protector a la infección por *Taenia crassiceps*, medido como el perfil de respuesta inmunológico.

- ✦ Los antígenos recombinantes expresados en fagos filamentosos no proveen una protección efectiva cuando se utiliza una sola dosis vía subcutánea

- ✦ En los estudios de vacunación es importante incluir ambos sexos, pues hay una relación cada vez más y mejor estudiada de las interacciones de los sistemas (inmune y endocrino)

- ✦ No se observó un efecto potenciador de los andrógenos en la vacunación, ya que la vacuna no desencadenó una respuesta protectora evidente.

X. PERSPECTIVAS

- Los presentes resultados sugieren que los estudios de vacunación deben llevarse a cabo en ambos sexos, lo cual abre nuevas posibilidades para mejorar los esquemas de vacunación.

- Es necesario evaluar el efecto inmunológico de los vehículos utilizados tanto en los estudios de vacunación como en los estudios endocrinológicos, en este caso es muy importante caracterizar el tipo de respuesta inmune que puede despertar el Fago M13 y dependiendo del perfil inmunológico establecer en que tipo de infecciones puede ser un buen vector de expresión de las proteínas o péptidos que se pretendan expresar en él.

- El uso de análogos de hormonas puede comenzar a estudiarse no solo desde el punto de vista endocrinológico sino también en su posible papel como inmunomoduladores.

XI. REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2001). Cellular and molecular Immunology. 4a. ed., Saunders, USA.
- Abbas, A. K., Murphy, M.K., Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.
- Allen, E. J., Maizels, M.R. (1997). Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?. *Immunol. Today*, 18(8): 387-392.
- Ambrosio, J., Landa, A., M.T. Merchant and Lacleste, J.P. (1994). Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch. Med. Res.* 25: 325-330.
- Araneo, A.B., Woods II, L.M. and Daynes, A.R. (1993). Reversal of the immunosenescent Phenotype by Dehydroepiandrosterone: Hormone Treatment Provides an Adjuvant Effect on the Immunization of Aged Mice with Recombinant Hepatitis B Surface Antigen. *J. Infect. Dis.* 167: 830-840.
- Barbas III., C.F., Burton, D.F., Scott, J.K., Silverman, G.J. (2001). Phage display. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory Press. p1.1-1.20
- Besedovsky, H.O., and Del Rey, A. (1992). Immune-neuroendocrine circuits: integrative role of cytokines. *Front. Neuroendocrinol.* 13(1): 61-94.
- Besedovsky, H.O., and Del Rey, A. (1996). Immune-Neuro-endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Rev.* 17(1): 64-89.
- Beverley, P.C.L. (2002). Immunology of vaccination. *Br. Med. Bull.* 62: 15-28.
- Cox, F.E.G. and Liew, F.Y. (1992). T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunology Today*. 13(11): 445-448.
- Craig, W.R., William, W., and James, A. (2001). Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(3): 476-488.
- Danenberg, H.D., Ben-Yehuda, A., Zakay-Rones, Z., Friedman, G. (1995). Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment reverses the impaired immune response of old mice to influenza vaccination and protects from influenza infection. *Vaccine*. 13(15): 1445-1448.
- Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA. (2000). 50:11.

- Fenerick, M., Novack, M., Rovensky, J. (1998). Relation and interactions between the immune and neuroendocrine systems. *Bratisl Lek Listy*. 99(8-9): 454-464.
- Flisser, A. and Lightowlers, W.M. (2001). Vaccination against *Taenia solium* Cysticercosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 96(3): 353-356.
- Flisser, A., Madrazo, I., Delgado, H. (1997). Parásitos y Ciclo de Vida. En *Cisticercosis Humana y Porcina. Manual Moderno. Capítulo 2*.
- Flisser, A., Malagón, F. (1989). Elementos del binomio Taeniasis/ Cisticercosis Una Síntesis. En *Cisticercosis Humana y Porcina, Su conocimiento e investigación en México*. Limusa, Noriega.
- García-García, M., Torres, M., Correa, D., Flisser, A., Sosa, A., Velasco, O., Meza, A., Plancarte, A., Avila, G., Tapia, R., Aguilar, L., Mandujano, A., Alcántara, I., Morales, Z., Salcedo, A., Mañón, M., Valdespino-Gómez, J. (1999). Prevalence and risk of cisticercosis and taeniasis in an urban population of soldiers and their relatives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61(3): 386-389.
- Griffit, J. E. and Ojeda, R. S. (1992). *Textbook of endocrine Physiology*, 2nd ed., Oxford University Press, pp. 1733- 1734
- Grossman, J.C., Roselle, A.G., Mendenhall, L.C. (1991). Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 40(4-6): 649-659.
- Laralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govenzensky, T. and Romano, M.C. (1995). Sex Hormone Changes Induced by the Parasite lead to feminization of the Male Host in Murine *Taenia crassiceps* Cysticercosis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 56(6): 575-580.
- LeBoeuf, R.D. (1994). Negative regulatory molecules in the neuroendocrine and immune systems: suppressin as an example. *Immunomethods*. 5(1): 79-87.
- Lightowlers, W.M. (1999). Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int. J. Parasitol.* 29: 811-817.
- López-Moreno, H. (2002). Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos T cooperadores 1 y 2. *Salud Pública de México*. 44(2): 145-152.

- Manoutcharian, K., Terrazas, I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodriguez, M. and Govezensky, T. (1999). Phage- Displayed T-cell Epitope grafted into Immunoglobulin heavy- Chain complementarity- determining regions: an Effective vaccine Design tested in Murine Cysticercosis. *Infect. Immun.* 67 (9): 4764-4769.
- Manoutcharian, K., Terrazas, I., Gevorkian, G., Govezensky, T. (1998). Protection against murine cysticercosis using cDNA expression library immunization. *Immunol. Lett.* 62: 131-136.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernández, M., Fragosos, G. Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. and Sciuotto, E. (1996). Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82 (2): 250-254.
- Mc Cluskie, M.J. and Weeratna, R.D. (2001). Novel adjuvant systems. *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.* 1(13): 263-271.
- Morales- Montor, J., Baig, S., Hallal-Calleros, C., Damián, R.T. (2002) *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.* 100: 209-216.
- Morales-Montor, J., Baig, S., Mitchell, R., Deway, K., Hallal-Calleros, C. and Damian, R.T. (2001). Immunoendocrine Interactions During chronic Cysticercosis Determine Male Mouse feminization: Role of IL-6. *J. Immunol.* 167: 4527-4533.
- Morales-Montor, J., Hallal-Calleros, C., Romano, M.C., Damián, R.T. (2002). Inhibition of P-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 32: 1379-1387.
- Morales, J., Larralde, C., Arteaga, M., Govenzensky, T., Romano, M.C. and Morali, G. (1996). Inhibition of sexual Behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J. Parasitol.* 82(5): 689-693.
- Morales-Montor, J., Rodríguez-Dorantes, M., Cerbón, M.A. (1999). Modified expresión of sateroid 5 α - reductasa as well aromatasa, but not cholesterol side-chain cleavage enzyme, in the reproductive system of male mice during (*Taenia crassiceps*) cysticercosis. *Parasitol. Res.* 85: 393-398.
- Negrete, B., Bonilla, E., Valero, N., Giraldoth, D., Medina-Leedertz, S. and Afiez, F. (2001). In mice the efficiency of immunization with venezuelan Equine Encephalomyelitis virus TC-83 is transiently increased by dehydroepiandrosterone. *Invest. Clin.* 42(4): 235-240.

- Neveu, P.J. and Le Molal, M. (1990). Physiological basis for neuroimmunomodulation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 4(3): 281-305.
- O'Hagan, D.T. (1998). Recent advances in vaccine adjuvants for systemic and mucosal administration. *J. Pharm. Pharmacol.* 50(1): 1-10.
- Pumarola, A., Rodríguez Torres, A. García Rodríguez, J.A. Piedrola Angulo, G. (1987). *Microbiología y Parasitología Médica*, 2ª. Ed., Masson-Salvat. Cap.79.
- Rodríguez-Sosa, M., R. David, J., Bojalil, R. Satoskar, A., Terrazas, I. (2002). Susceptibility to the larval stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* is mediated by TH2 response induced via STAT6 signaling. *J. Immunol.* 168(7): 3135-3139.
- Sarti, E.(1997). La teniasis y cisticercosis por *taenia solium*. *Salud pública de México.* 39(3): 225-230.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Rosas-Salgado, G., Hernández-González, M., Herrera-Estrella, L., Cabrera-Ponce, J., López-Casillas, F., González-Bonilla, C., Santiago-Machuca, A., Ruiz-Pérez, F., Sánchez, J., Goldbaum, F., Aluja, A., Larralde, C. (2002). New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch. Med. Res.* 33(4): 371-378.
- Spangelo, B.G. and Gorospe, W.C. (1995). Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. *Front. Neuroendocrinol.* 16(1): 1-22.
- Terrazas, I., Bojalil, R., Govenzensky, T. and Larralde, C. (1998). Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84(1): 74-81.
- Toenjiens, S.A., Spolsky, J., Mooney, A. and Kuhn, E. (1999). The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2- type response. *Parasitol.* 118: 623-633.
- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C. and Sciutto, E. (2001). Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against Murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* 69(3): 1766- 1773

- Toledo, A., Larraalde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., López-Casillas, F., Kubli, G., Vázquez, R., Terrazas, I. and Sciuotto, E. (1999). Towards a *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: an Epitope shared by *Taenia crassiceps* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67(5): 2522-2530.
- Ulett, C., Ketheesan, N. and Hirst, G. (2000). Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 68(4): 2034-2042.
- Valdez, F., Hernández, M., Govenzensky, G., Fragoso, G and Sciuotto, E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80(6): 931-936.
- Verthelyi, D. (2001). Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int. Immunopharmacol.* 1: 983-993.
- Villa, O.F. and Kuhn, R.E. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with a concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitol.* 112: 561-570.
- White, A.C. (2000). Neurocysticercosis: Updates on epidemiology pathogenesis, diagnosis, and management. *Ann. Rev. Med.* 51: 187-201.
- William, G.T. Willats, (2002). Phage display: practicalities and prospects. *Plant Mol. Biol.* 50: 837-854
- Zuck, M. and McKean, K.A. (1996). Sex differences in parasite infections: Patterns and Processes. *Int. J. Parasitol.* 26(10): 1009-1024

APÉNDICE I.

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Con el fin de conocer las condiciones óptimas para la obtención de la mayor cantidad de producto de amplificación de cada uno de los genes para interleucinas en el bazo de ratón, así como para disminuir la posibilidad de obtener productos inespecíficos en la amplificación, se modificaron el número de ciclos y temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos, construyéndose las curvas de ciclos a partir de las densitometrías realizadas a las fotografías de los geles de electroforesis.

Se escogió el número de ciclos que se encontrara en la fase logarítmica de la curva construida para cada interleucina (El valor numérico en el eje de las ordenadas se expresa como Unidades de Densidad Óptica, DO). Para escoger la temperatura óptima se buscó la banda que mostrara con mayor claridad y especificidad el producto de expresión de cada gen.

Los resultados escogidos se resumen en la tabla 1 y se señalan con una flecha en la fotografía y en la gráfica correspondiente a cada interleucina. A continuación se presentan las curvas construidas así como las fotografías de los geles de electroforesis de ciclos y temperaturas probados para cada gen.

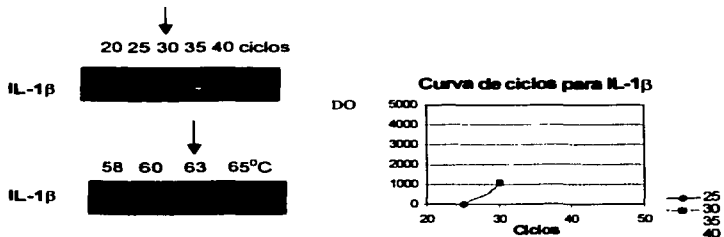


Figura a. La fotografía superior muestra que la mejor banda de expresión para IL-1 β se presentó en 30 ciclos así también se encontró dentro de la fase logarítmica en la curva del gráfico a la izquierda. La mejor temperatura para este gen se encontró en 63°C como lo muestra la fotografía inferior.

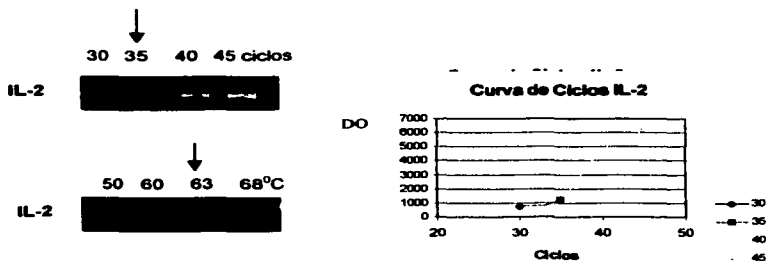


Figura b. La fotografía superior muestra el número de ciclos utilizados para IL-2, en la gráfica la fase logarítmica comienza en 35 ciclos. En el caso de las temperaturas no se muestran cambios apreciables en las intensidades de las bandas, sin embargo se escogió 63°C ya que en la mayoría de los genes para las interleucinas, esta temperatura presentó mejor expresión. Para la estandarización de este gen se ocuparon bazos de ratones hembras Knock-out en IL-6^{-/-}.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

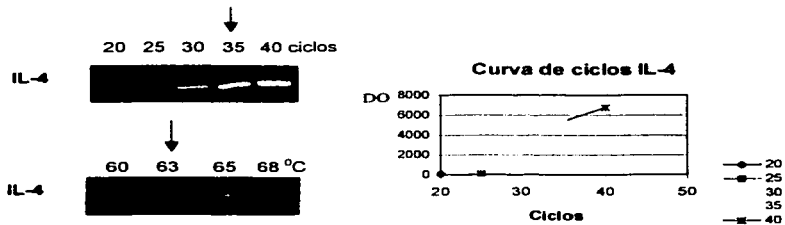


Figura c. En la fotografía superior se muestra la banda de expresión para IL-4 en 35 ciclos que está en la fase logarítmica de la curva de expresión. La fotografía inferior señala 63° C como la temperatura en donde se observa la mejor banda de expresión

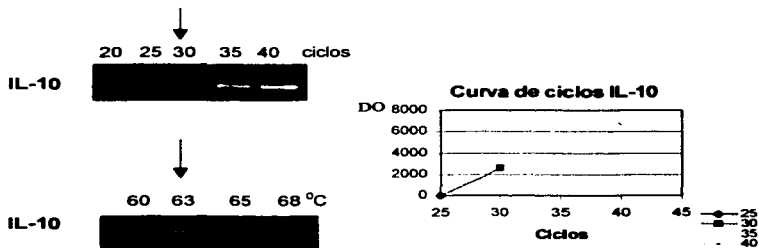


Figura d. En el gráfico de la derecha se demuestra que la banda de expresión en 30 ciclos de IL-10 (fotografía superior) se encuentra en la fase logarítmica de la curva. La fotografía inferior señala 63° C como la temperatura en donde se observa la mejor banda de expresión

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

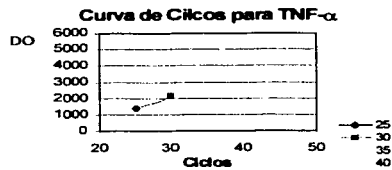
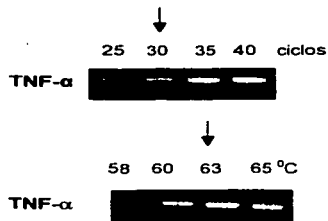


Figura e. Para TNF- α el número de ciclos dentro de la fase logarítmica de la curva son 30, correspondiente a la fotografía superior. La temperatura que muestra la mejor banda de expresión es de 63°C, correspondiente a la fotografía inferior.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APENDICE II. Sexual Dimorphism of the immune response in parasitic diseases: prevalence, mechanisms and significance.

Durante la realización del presente trabajo de tesis, el grupo que dirige el Dr. Carlos Larralde Rangel y el Dr. Jorge Morales Montor, realizó una revisión que a continuación se presenta y que justifica el creciente interés en el estudio de las interacciones inmuno-endocrinas, sobre todo atendiendo a infecciones parasitarias. Este trabajo se publicará en un corto periodo de tiempo.

PAGINACION

DISCONTINUA

SEXUAL DIMORPHISM OF THE IMMUNE RESPONSE IN PARASITIC DISEASES: PREVALENCE, MECHANISMS AND SIGNIFICANCE.

Morales-Montor J¹, Chavarría A¹, De León MA¹, Del Castillo LI¹, Escobedo EG¹, Sánchez EN¹, Vargas JA¹, Contreras A¹, Romo-González T², and Larralde C.^{1,3}

¹Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM, Mexico, ²Departamento de Biología Molecular, Instituto de Investigaciones Biológicas, UV, Xalapa and ³Centro Internacional de Ciencias, AC, Cuernavaca, Morelos, Mexico.

Corresponding author:

Dr. Carlos Larralde

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomedicas, U.N.A.M. AP 70228; Mexico DF 04510; Mexico.

Phone: +5255 56223854

Fax: +5255 56223369

e-mail : larralde@servidor.unam.mx

Key words: sexual dimorphism, sex hormones, immunity, parasite infection, immuno-endocrine, sex-associated infection susceptibility.

ABSTRACT. A review of current literature on sexual dimorphism in parasite infections of mammals revealed that in 71% of 28 infections females were reported to fare better than males, and the reverse in 18%, and in 11% there are only suggestions of sexual dimorphism. Immune dimorphism concomitant with infection was intentionally explored only in schistosomiasis, leishmaniasis, malaria, trypanosomiasis, toxoplasmosis and cysticercosis. In these, no uniform sexual preference was detected and each sex showed a unique immunological profile in each disease, thus discouraging generalizations about sexual privileges in parasitic infections via immune dimorphism. The potent effects of sex hormones and cytokines on the immune and endocrine systems of the host and on the parasite are well documented. A flow chart of all the interactions between the hosts systems components revealed a complex network capable of jointly regulating their functions when dealing with infection, immunity, inflammation and sexuality. The revealed network's complexity and long-range reach could be involved in pathologies other than infection (i.e., neoplasia, stress, hypertension). In fact, the network's complexity appears excessive to deal only with sexual differences in susceptibility to infection and insinuates it can deal also with the self/not-self infractions posed by pregnancy, with dichotomous ontological differentiation and behavior, and with the dynamics of host and parasite evolution. The potentially great impact of sexual dimorphism on the immune response advises its careful exploration when studying parasite infections and immunity in general. As for immunologically mediated sexual privileges a casuistic approach is recommended as the immune response may favor either sex in facing a given challenge and may impact unexpected fields of the hosts physiology.

INTRODUCTION

Sexual dimorphism (SD) is recognized in several parasite infections (Infection SD) of various animal species (Liesenfeld et al, 2001; Gonzalez et al, 2001; Shuster et al, 2001; Soliman et al, 2001; Sibille et al, 2000; Nakazawa et al, 1997; Walker et al, 1997; Grulich et al, 1996; Larralde et al, 1995) but is generally ignored in most. SD is also neglected in basic studies of the immune response. Paradoxically, sex steroids and cytokine regulation of the immune and endocrine systems components and expressions is gathering experimental support (Spinedi et al, 2002; Verthelyi D, 2001; Zhang et al, 2000; Hunter et al, 2000; Ottaviani et al, 1999; Nussdorfer et al, 1998; Sternberg EM, 1997; Loria RM, 1996). Thus, differences of the immune responses of male and female vertebrates (Immune SD) are suspected may be involved in the few sexually dimorphic infections known (Remoue et al, 2001; Kurtz et al, 2000, do Prado et al, 1999; Terrazas et al, 1998, Walker et al, 1997; Satoskar and Alexander, 1995, Roberts et al, 1995) and perhaps in the many more in which the issue was left unstudied. Two notions are held as firm and general principles of immuno-endocrine (IE) regulation of Infection SD in mammals: 1) females are more resistant than males to parasite infections (Verthelyi D, 2001; Roberts et al, 2001; Klein SL, 2000, do Prado et al, 1998), and 2) androgens are immunosuppressive and estrogens stimulators of humoral immunity (Hughes and Randolph, 2001; Ganley and Rajan, 2001; Watanabe, et al, 1999). Because our results in experimental murine cysticercosis conflicted with these notions we decided to review the current literature on Infection SD in relation to Immune SD, its factual foundations, its generality and its mechanisms and consequences.

MATERIALS, DEFINITIONS AND PROCEDURE

We reviewed over one hundred publications found in Medline (hormones & sex & parasite, 1995-2002) and many more articles derived from them, in search for Infection SD and Immune SD in parasitic infections and/or sex hormone effects on immunity or immunological parameters. When infections were found that documented both forms of dimorphism, we examined the rationale in proposing a cause-effect relationship between them.

By SD we understood any systematic difference between males and females regarding infection (Infection SD) or the immune response (Immune SD), two matters that are sometimes mistaken as equivalent. Infection SD relates to differences between the host sexes in the presentation of the parasitic disease, and is expressed in terms of prevalence, intensity, severity, morbidity, mortality, hormonal profiles and changes in social and reproductive behavior of infected animals. Immune SD relates to immunological differences between the hosts sexes towards the parasite, and is expressed in levels, classes, types and functionality of specific anti-parasite antibodies, immune cell profile (B, T, CTL, NK), interleukins and cytokines, cellular hypersensitivity, vaccination effects, *in vitro* cell reactivity, TH1/TH2 balance and other immunological parameters.

MAIN FINDINGS

Limitations of the list of references on sexual dimorphism and infection

A cursory examination of the list of references reveals that:

1) The list captured only 45 different parasite species and 10 species of mammalian hosts, an exiguous sample considering the millions of parasites (Hoberg, EP 1997) and the thousands of mammalian species (Sidney et al, 1984).

2) There is a striking medical bias to the investigations on SD: nearly 56% of all articles are oriented to the study of infections affecting humans or, if in experimental animals infections, that have a human counterpart.

3) Most articles do not directly explore the existence or consequences of Immune SD and Infection SD but rather describe the *in vitro* effects of sexual hormones or cytokines on the immediate response of some immunologic or endocrinological component derived from either sex: this usually in the presence of fetal calf serum in the culture medium and in the absence of other modulatory influences coming from other systems in the organism or from different parts of the same systems. The resulting data are then projected by some authors on the more complicated scenario of an infection, not always with due respect.

The poor representation of species in the list of references, its medical bias, the uncontrolled effects of isolating system components and the background noise of *in vitro* experiments, caution against general conclusions on SD in infection and immunity and advise to limit statements to specific host-parasite relationships and assessment circumstances.

Sexual dimorphism in specific parasite infections

Table I summarizes the 43 references concerned with 21 infections in 28 host-parasite relationships (some parasites infects more than one host species) that provided information on the subject of Infection SD and/or Immune SD. Table I documents that: a) In 20/28 (71%) of the host-parasite relationships females fared better than males in prevalence, intensity and/or pathological consequences of infection, to extents varying from insignificant to prominent, b) In 5/28 (18%) males fared better than females, and in 3/28 (11%) there are only hints about sex preferences, c) In all but one case (*Schistosoma haematobia* in humans) there was no contradiction between the different infection parameters in a given host-parasite relationship (i.e., an increased prevalence mismatching with decreased intensity or severity) and, d) Immune SD is rarely studied.

Table II concentrates on the five host-parasite relationships in which several infection and some immune parameters were measured at some time of infection. The immune parameters collected varied in each infection. Complete comparison of immune profiles is possible only in IFN- γ and TNF- α in all but one infection. Plasmodium and toxoplasma infections are more prevalent and intense in females than in male mice, but their immune parameters differ considerably in each infection: TNF- γ , TNF- α and IL-12 are more prominent in females than males infected with plasmodium and viceversa with respect to toxoplasma. In contrast, in leishmania and schistosome infections of mice and human, respectively, prevalence and intensity are higher in males than in females but, again, all their immune parameters differ excepting TNF- α , which is found elevated in all but one of the male host's (murine cysticercosis).

The rationale behind each host's immunological strategy in response to the parasite infections in Table II is not clear one would expect it to match the parasites strategies in time, location, number and offensive and defensive maneuvers. Extracellular stages of the parasite would appear vulnerable to antibodies and complement either by their direct impact on the parasites external surface (Phillip et al, 1980). So it happens to some but not all tachyzoites in toxoplasmosis (Johnson and Sayles, 2002), early larvae in cysticercosis (Restrepo et al, 2001), merozoites in malaria (Daly and Long, 1995), trophozoites in amoebiasis (Gosh et al, 1998) and promastigotes in leishmaniasis (Rafati et al, 2001). But many extracellular parasite forms escape the

circulation and manage to reach, untouched by harmful antibodies, their target cells interior. When intracellular, their vulnerability to antibody mediated damage is diminished. If at all operative, an immune response against intracellular parasites would depend on the expression of parasite antigens on the infected cells membrane (Kyes et al, 2001) and the triggering of innate immune effectors. Attraction of effective leukocyte cells (PMN, eosinophils, basophils), CTLs and NK cells activities to the site of parasite location should aid in parasite destruction or at least containment of growth and dispersion. Thus, an emphasis in TH2 response would seem appropriate against extracellular parasites and a TH1 response if intracellular (Sher et al, 1992). If so, female hosts, if truly favoring TH2 responses, should deal better with extracellular parasites and initial stages of infection whilst males, if androgens truly favor TH1 responses, should better handle intracellular parasites and late stages of infection. Unexpectedly, this is not always the case in the infections listed in Table II. This is probably because the dealings between host and parasite are subtle and complicated. Each parasite has evolved various strategies of its own to survive its specific host attacks (i.e., affect different tissues varying in immune privilege, multiply faster than they are destroyed, degrade host molecules in their neighborhood, have developed impenetrable surfaces, disguise themselves with externally adhered hosts components, produce and liberate complement inhibitors, diversify their antigen structure with time of infection towards more resistant or elusive versions, surround themselves with fibrous capsules protective of host cells incursions, manipulate the immune and endocrine systems of the host towards less aggressive forms of response, etcetera). Complete detailed understanding of the hosts and parasites negotiations leading to the destruction of one or the other, or else to a tolerable entente, needs of much more research and the application of more discerning technology. Perhaps simultaneous microarray genomic and proteomic studies on both host and parasite will shed light on their most delicate negotiations. We anticipate they will be highly specific for each host-parasite relationship and hosts sex.

As for crude approaches to deal with parasite infections, like vaccination, when the parasite is just entering, when its numbers are small and localize extracellularly is perhaps its most vulnerable state. An immune response that does not totally curtail infection in this initial state is only left with the co-temporizing option of restricting parasite growth and limiting its localization and pathogenesis. In this option each parasite infection may also be dealt with differently by each host gender.

The special case of murine Taenia crassiceps cysticercosis.

The issue of Infection SD and Immune SD in experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* has been previously explored (Sciutto et al, 1991; Huerta et al, 1992; Larralde et al, 1995; Terrazas et al, 1998; Morales-Montor et al, 2001). Briefly, experimental findings reveal that: a) In different congenic and syngenic strains of mice more females become infected than males when equally challenged (Sciutto et al, 1991); b) Females carry larger parasite loads than males (Huerta et al, 1992; Larralde et al, 1995; Morales-Montor et al, 2002); c) Estrogens favor parasite reproduction whilst androgens inhibit it (Bojalil et al, 1993; Terrazas et al, 1994; Morales-Montor et al, 2002); d) Gonadectomy and thymectomy equalize parasite loads between sexes by greatly increasing that of males and slightly decreasing that of females (Huerta et al, 1992; Terrazas et al, 1994; Morales-Montor et al, 2002); e) Males are more thoroughly protected by vaccination than females (Sciutto et al, 2002); f) External 17β -estradiol and

dihydrotestosterone reconstitute parasite loads to their normal levels in gonadectomized animals, whilst T cells but not antibodies restore the effects of thymectomy (Bojalil et al, 1993); g) TH1 response hinder parasite growth early in infection (Terrazas et al, 1999; Toenjes et al, 1999; Spolski et al, 2000; Rodriguez-Sosa et al, 2002); h) TH2 response prevails in later times of infection but is incapable of slowing parasite growth (Terrazas et al, 1998; Toenjes et al, 1999); i) In chronic infections, the male mouse is feminized (estrogenized and deandrogenized) due to over-expression of P-450-aromatase in correlation with high levels of IL6 (Morales-Montor et al 2001) to a degree that inhibits the males sexual behavior (Morales et al, 1996). These findings led to the proposal of an IE interaction in control of cysticercus reproduction, in which androgens favor a TH1 response that is limiting of parasite growth, whilst estrogen favors a TH2 response that is permissive of parasite reproduction (Morales-Montor et al, 2001, Morales-Montor et al, 2002). Recently reported findings further support the correlation between androgens and TH1 response and of estrogen and TH2 response (Morales-Montor et al, 2002a,b,c). On-going work extended the domain of the hypothetic IE interactions in murine cysticercosis to include other targets of the parasite and host that are responsive to sex hormones. Sexual steroids were shown to act *in vitro* directly upon the parasite, limiting or prompting its reproduction, and *in vivo* on some of the host's central nervous system areas, inducing in both targets the over-expression of AP1 genes involved in cellular differentiation and proliferation (Morales-Montor et al, 2003) as they do in other stressful and immunological challenges (Pacheco-Lopez et al, 2002). Signs of sexual dimorphism in cysticercosis were recently disclosed in other host and taenia species. Sexual steroids are also very likely implicated in pig cysticercosis caused by *Taenia solium*, as castration and pregnancy nearly double prevalence of naturally acquired cysticercosis in rustic pigs (Morales et al, 2002). Also, women are more frequently afflicted than men by severe neurocysticercosis (del Brutto et al, 1988; Larralde et al, 1988; Sciutto et al, 2002) and show higher inflammatory profiles (Fleury et al, 2003). That the human parasite *T. solium* seems to be also sensitive to sex-steroids and that other parasite infections are also responsive to similar IE interactions, such as *Schistosoma mansoni* in mice and baboons (Morales-Montor et al, 2001 a,b), *Trichinella spiralis* in rats (Klein et al, 1999) and *Taenia taeniformis* in rats (Lin et al, 1990), assure that findings in *Taenia crassiceps* were not limited to an artifactual experimental disease of laboratory mice but show its operation in natural parasite infections.

The IE network in charge of infection and immune sexual dimorphism.

The usual experimental strategy to study the mechanisms of sexual steroids effects upon the immune and endocrine systems consists in adding a sexual hormone or a cytokine to an isolated system's component and to register its response. With the results obtained by this strategy and some of the *in vivo* data in Table II, we constructed a referenced flow-chart of the immune and endocrine circuitry that includes all the interactions across species, sexes, cells, and types of responses. The result was an all encompassing IE-network of the circuits connecting components within and between the immune and endocrine systems of the host and those of the parasite (Figure 1). The magnitude and complexity of the IE network includes practically all the sexual hormones and many of the immunological components described till now. Its simple inspection suggests its possible relevance to many other biological scenarios besides infection. The complexity incorporates circuits with forward and backward regulation, and gives the

impression that it can bring about any effect on the parasite or the host, and that it can do so by several avenues. Since some of the events in the IE- network involve cellular reproduction and *de novo* synthesis of receptors, the IE network appears capable of learning and behaving intelligently (i.e. changing its ways with experience).

A node for strong hormonal modulation of acquired immunity in the IE network is the proposed conflictive effects of androgens and estrogens acting upon TH1/TH2 mutually controlled balance. It is possibly there, where the Immune SD chiefly adjusts the relationship with the parasite or with any other intruder to achieve pacific coexistence or belligerent confrontation. The sex-hormones' many receptors, placed on a variety of immunocompetent cells involved in clonal expansion, phagocytosis, antigen presentation and physiological responses to cytokines and chemokines, provides the hormones with the capacity of finely modulating the immune cells numbers and activities (Table III).

The prominent and varied connections of the IE-network with other hormones well known to be related to stress and to the inflammatory process (Dantzer et al, 2001; Besedovsky and Del Rey, 2002) suggests that it can also influence innate immune mechanisms, so readily awakened by infections (Yokoyama and Scalzo, 2002). The IE-network also exhibits the possibilities of the host sexual hormones acting directly upon the parasite, affecting its reproductive capacity through sexual steroids favouring the expression of genes related to cellular differentiation and proliferation. These effects could also reach the host cells considering the high conservation of these genes in the examined species, thus possibly bearing on proliferative disorders (Fig.1).

As particular examples of the IE-network's explanatory and predictive properties upon parasite infections, circuits that are turned-on in experimental cysticercosis (Figure 2) and schistosomiasis (Figure 3) are illustrated. They are not identical, but in both IL-6 is a prominent feature. The IE interactions in cysticercosis are really self-fulfilling prophesies (the circuits were drawn from the cysticercosis data) but are they are time predictions that may be explored in schistosomiasis which shows inclinations via IL-6 and MIF (Morales-Montor et al, 2003), whilst others predictions remain to be evaluated. There are also circuits capable of masculinizing the infected female if P-450 aromatase would be inhibited directly or by inhibition of GNRH in the hypothalamus, mediated or not by IL6, or by enhancing the expression of 5- α reductase type II by means of an interleukin yet to be identified. In the opposite direction, the dehydroepiandrosteredione (DHEA) upregulation of TH1, for instance, endows the endocrine system with participation in immunological defense, a prediction that has yet to be verified in TH1 sensitive infections (Baszler et al, 1999; Suzuki et al, 1999; Rogers et al, 2002). The IE-network's prowess, with its manifold forward and backward regulations in operation, does indeed suffice to explain and predict variegated profiles of Infection-SD and Immune-SD in the various host-parasite relationships. It does not however necessarily imply there will be differences between sexes in the final results of a given confrontation with a parasite infection.

Perspectives from the immuno-endocrine network: medical and biological

The literature search revealed an extremely complex IE-network involving hormones and cytokines that foresees potent interactions in events generally attributed to the exclusive operation of single systems in response to simple precepts (i.e., reproduction, defense). So much plasticity and multifunctionality of the macro net is not without risk. Mishaps of control could lead to the loss of tolerance and the rise of autoimmunity (Derijk and

Berkenbosch, 1996; Lechner et al, 1996), or be involved in the immune compromise of aging (Panerai and Ottaviani, 1995), and/or in the physiopathology of some infections that course with inflammation (Mandrup-Poulsen et al, 1995). Also, the IE network could connect parasite infections with other diseases apparently distant from the immunologic and endocrinologic domains, such as arterial hypertension (Peeters et al, 2001), atherosclerosis (Chae et al, 2001) and cancer (REF con lista de autopsias con Olvera, Herrera and Ostrosky-Wegman, 2001; Polat et al, 2002). Biological questions remain unanswered. Why is there sexual dimorphism in the immune response at all? Why not host gender equality in immunological privileges? Has the parasite influenced the evolution of the hosts Immune SD? The complexity of the IE-network hints to reasons for Immune SD other than the self/foreign precept. Perhaps it has evolved as the best strategy for individuals of either sex in confronting successfully not only infection, even if by different mechanisms, but also solve with precision sex specific challenges coming from scenarios of higher biological hierarchy, like pregnancy.

What can be a biological reason for Immune SD in evolution that is superior to defense of the host's individual's health?. One possibility that has been raised is that Immune SD would allow both defense against infection and also reproduction in a dioecious species (Gaillard and Spinedi, 1998; Agrawal et al, 2001; Moore and Wilson, 2002; Owens IP, 2002; Charles et al, 2002; Potti et al, 2002; Tella et al, 2002). This would be accomplished by a transient immunological allowance of females pregnancy with an offspring that is half-foreign: an awkward demand breaching the self/foreign precept (Martal et al, 1995; Medzhitov and Janeway, 2002; Metzinger, 2002). The demand would originate from the advantage in species diversification gained through sex dichotomy. However its satisfaction would need of occasional fastidious but transient regulation from both hormones and cytokines lest the product be lost or the host succumb to infection (Barnea ER, 2001). As for the males, Immune SD may provide them with the specialized ability to better cope, without much qualms about the self/foreign precept, with their more stressful and dangerous lives when displaying intense laboral, exploratory, belligerent and risky behaviors (Spinedi et al, 2002). Even the parasite could benefit from the hosts Immune SD. If the individuals of one sex are used as selective pressure for the fittest parasite: i.e., the parasite restrictive males in the case of murine cysticercosis are behaviorally enhanced vehicles in the parasites final destiny in the gut of carnivores (Willis and Poulin, 2000; Gourbal et al, 2001). The other sex (i.e., the parasite proliferation permissive females in the case of murine cysticercosis) would act as the optimal host for the massive reproduction of the fittest version of the parasite contemporarily available (Barnard et al, 1998; Poulin et al, 1996; Zuk and McKean, 1996; Panhuis et al, 2001). No doubt many of these and other perspectives and speculations left unmentioned need of research. Their promise to explain or illuminate as yet disputed immunological puzzles by virtue of IE regulation is certainly alluring: (like tolerance and autoimmunity to name but two immunological riddles, the connection of hypertension and cancer with infection to mention two medical questions, and the role of Immune SD in species diversification as a biological querie).

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support was provided by Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico, U.N.A.M., grant # IN21224 to C. Larralde and J. Morales-Montor, and by grant # 136430-N from The National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT) to J. Morales-Montor. G. Escobedo is CONACyT PhD fellow. L.I del Castillo, and M. de Leon have a fellowship as Research Assistant (to C. Larralde) from Sistema Nacional de Investigadores, National Council of Science and Technology of Mexico (CONACyT). I. Perez-Montfort and R. Mitchell corrected the english version of the manuscript.

REFERENCES

- Agrawal AF, Lively CM. (2001). Parasites and the evolution of self-fertilization. *Evolution Int J Org Evolution*. 55: 869-79.
- Anderson, Sydney y J. Knox Jones, Jr. (1984). *Orders and Families of Recent Mammals of the World*. John Wiley & Sons. 1- 686.
- Barnard CJ, Behnke JM, Gage AR, Brown H, Smithurst PR. (1998). The role of parasite-induced immunodepression, rank and social environment in the modulation of behaviour and hormone concentration in male laboratory mice (*Mus musculus*). *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 265: 693-701.
- Barnea ER. (2001). Embryo maternal dialogue: From pregnancy recognition to proliferation control. *Early Pregnancy*. 5: 65-6.
- Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA. (1999). Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice.

Int	J	Parasitol.	10:	1635-46.
-----	---	------------	-----	----------
- Besedovsky HO, del Rey A. (2002). Introduction: immune-neuroendocrine network. *Front Horm Res*. 29:1-14.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciuotto E, Larralde C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*. 79: 384-9.
- Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. (2001). Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension*. 38: 399-403.
- Charles S, Morand S, Chasse JL, Auger P. (2002). Host patch selection induced by parasitism: basic reproduction ratio $r(0)$ and optimal virulence. *Theor Popul Biol*. 62: 97-109.
- Daly TM, Long CA. (1995). Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria. *J Immunol*. 55: 236-43.
- Dantzer R, Koonsman JP, Bluth RM, Kelley KW. (2002). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci*. 85: 60-5.
- Del Brutto OH, Garcia E, Talamas O, Sotelo J. (1988). Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med*. 148: 544-6.
- Derijk R, Berkenbosch F. (1991). The immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis and autoimmunity. *Int J Neurosci*. 59: 91-100.
- do Prado JC Jr, Levy AM, Leal MP, Bernard E, Kloetzel JK. (1999). Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 85: 826-9.
- do Prado JC, Leal M de P, Anselmo-Franci JA, de Andrade HF, Kloetzel JK. (1998). Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 84: 100-105.
- Gaillard RC, Spinedi E. (1998). Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest Anim Endocrinol*. 15:345-52.
- Ganley L, Rajan TV. (2001). Endogenous testosterone levels do not affect filarial worm burdens in mice. *Exp Parasitol*. 98: 29-34.

- Ghosh PK, Gupta S, Leon LR, Ghosh R, Ruiz Ordaz BH, Ortiz-Ortiz L. (1998). Intestinal amoebiasis: antibody-secreting cells and humoral antibodies. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1:1-7.
- Gonzalez MT, Acuna E, Oliva ME. (2001). Metazoan parasite fauna of the bigeye flounder, *Hippoglossina macrops*, from Northern Chile. Influence of host age and sex. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96: 1049-54.
- Gourbal BE, Righi M, Petit G, Gabrion C. (2001). Parasite-altered host behavior in the face of a predator: manipulation or not?. *Parasitol Res.* 87: 186-92.
- Grulich AE, Kaldor JM. (1996). The sex ratio of AIDS-associated Kaposi's sarcoma does not provide evidence that sex hormones play a role in pathogenesis. *AIDS.* 10: 1595-6.
- Herrera L and Ostrosky-Wegman P. (2001). Do helminths play a role in carcinogenesis? *Trends Parasitol.* 17: 172-175.
- Hoberg, E.P. (1997) Phylogeny and historical reconstruction: host-parasite systems as keystones in biogeography and ecology. In *Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources* (Reaka-Kudla, M.L. et al., eds), pp. 243-261, Joseph Henry Press.
- Huerta L, Terrazas LI, Sciuotto E, Larralde C. (1992). Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol.* 78: 471-6.
- Hughes VL, Randolph SE. (2001). Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites. *J Parasitol.* 87: 49-54.
- Hunter CA, Reiner SL. Cytokines and T cells in host defense. (2000). *Curr Opin Immunol.* 12: 413-8.
- Johnson LL, Sayles PC. (2002). Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun.* 70: 185-91
- Klein SL, Gamble HR, Nelson RJ. (1999). Role of steroid hormones in *Trichinella spiralis* infection among voles. *Am J Physiol.* 277: R1362-7.
- Klein SL. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 24: 627-38.
- Kurtz J, Wiesner A, Gotz P, Sauer KP. (2000). Gender differences and individual variation in the immune system of the scorpionfly *Panorpa vulgaris* (Insecta: Mecoptera). *Dev Comp Immunol.* 24: 1-12.
- Kyes S, Horrocks P, Newbold C. (2001). Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol.* 55: 673-707.
- Larralde C, Sciuotto E, Huerta L, Terrazas I, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Thurn JR. (1988). Neurocysticercosis and possible sex-related severity of inflammatory reaction. *Arch Intern Med.* 148: 2689-97.
- Larralde C, Morales J, Terrazas I, Govezensky T, Romano MC. (1995). Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 52: 575-80.
- Lechner O, Hu Y, Jafarian-Tehrani M, Dietrich H, Schwarz S, Herold M, Haour F, Wick G. (1996). Disturbed immunoendocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in murine lupus. *Brain Behav Immun.* 4: 337-50.
- Liesenfeld O, Nguyen TA, Pharke C, Suzuki Y. (2001). Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J Parasitol.* 87: 1491-3.

- Lin, Y.C., Kikihisha, Y., Kono, H., and Gu, Y. 1990. Effects of larval tapeworm of (*Taenia taeniformis*) on reproductive functions in male and female host rats. *Experimental Parasitology*. 70: 344-352.
- Loria RM, Padgett DA, Huynh PN. (1996). Regulation of the immune response by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *J Endocrinol*. 150: S209-20.
- Mandrup-Poulsen T, Nerup J, Reimers J, Pociot F, Andersen HU, Karlsen A, Bjerre U, Bergholdt R. (1995). Cytokines and the endocrine system. I. The immunoendocrine network. *Eur J Endocrinol*. 133: 660-71.
- Martal J, De La Llosa-Hermier MP, Chene N, Huynh L, Millet S, L'Haridon R, Assal A, Roignant N, Chaouat G. (1995). Trophoblastic interferons and embryonal immune tolerance. *Contracept Fertil Sex.* 23: 562-72.
- Matzinger P. (2002). The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 296: 301-5.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 296: 298-300.
- Moore SL, Wilson K. (2002). Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. *Science.*, 297: 2015-8.
- Morales J, Larralde C, Arteaga M, Govezensky T, Romano MC, Morali G. (1996). Inhibition of sexual behavior in male mice infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *J Parasitol*. 82: 689-93.
- Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltran C, Villalobos N, Aluja A, Rodarte LF, Sciutto E, Larralde C. (2002). Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol*. 30: 41-8.
- Morales-Montor J, Newhouse E, Mohamed F, Baghdadi A, Damian RT. (2001a). Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. *J Infect Dis*. 183: 313-320.
- Morales-Montor J, Mohamed F, Ghaleb AM, Baig S, Hallal-Calleros C, Damian RT. (2001b). *In vitro* effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol*. 87: 1132-9.
- Morales-Montor J, Baig S, Mitchell R, Deway K, Hallal-Calleros C, Damian RT. (2001c). Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6. *J Immunol*. 167: 4527-33.
- Morales-Montor J, Baig S, Hallal-Calleros C, Damian RT. (2002a). *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp Parasitol*. 100: 209-16.
- Morales-Montor J, Baig S, Kabbani A, Damian RT. (2002b). Do interleukin-6 and macrophage-migration inhibitory factor play a role during sex-associated susceptibility in murine cysticercosis? *Parasitol Res*. 88: 901-4.
- Morales-Montor J, Hallal-Calleros C, Romano M, Damian R. (2002c). Inhibition of P-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int J Parasitol*. 32: 1379-87.
- Morales-Montor, J, F. Mohamed, Amjed Baghdadi, Salman Baig, C. Hallal-Calleros, and R.T. Damian. (2003). *Schistosoma mansoni* infection in baboons induces the expression of mRNA for IL-1 β , IL-6, TNF- α and Macrophage Migration Inhibitory Factor in Hypothalamus, Pituitary and Adrenal glands. *Experimental Parasitology*. *In press*.

- Morales-Montor, J. I. Arrieta, L. I. del Castillo, M. Rodríguez-Dorantes, M. A. Cerbón and C. Larralde. (2003). Cysticercosis by *Toenia crassiceps* induces *c-fos* gene expression changes in the central nervous system and in reproductive organs of infected male mice. *Parasitology. In press*.
- Murtaugh MP, Foss DL. (2002). Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 87: 109-21.
- Nakazawa M, Fantappie MR, Freeman GL Jr, Eloi-Santos S, Olsen NJ, Kovacs WJ, Secor WE, Colley DG. (1997). *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. *Exp Parasitol.* 85: 233-40.
- Nasrallah JB. (2002). Recognition and rejection of self in plant reproduction. *Science.* 296: 305-8.
- Nussdorfer GG, Mazzocchi G. (1998). Immune-endocrine interactions in the mammalian adrenal gland: facts and hypotheses. *Int Rev Cytol.* 183: 143-84.
- Ottaviani E, Franchini A, Genedani S. (1999). ACTH and its role in immune-neuroendocrine functions. A comparative study. *Curr Pharm Des.* 5: 673-81.
- Owens IP. Ecology and evolution. (2002). Sex differences in mortality rate. *Science.* 297: 2008-9.
- Pacheco-Lopez G, Espinosa E, Zamorano-Rojas HM, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F. (2002). Peripheral protein immunization induces rapid activation of the CNS, as measured by c-Fos expression. *J Neuroimmunol.* 131: 50-9.
- Panerai AE, Ottaviani E. (1995). Immunoendocrine reshaping with age. *Int Rev Immunol.* 12: 75-84.
- Panhuis TM, Butlin R, Zuk M, Tregenza T. (2001). Sexual selection and speciation. *Trends Ecol Evol.* 1: 364-371.
- Pfuetznerreiter MR, de Avila-Pires FD. (1999). Clinical manifestations in patients with computerized tomography diagnosis of neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 57: 653-8
- Philipp M, Parkhouse RM, Ogilvie BM. (1980). Changing proteins on the surface of a parasitic nematode. *Nature.* 287: 538-40.
- Polat A, Cinel L, Dusmez D, Aydin O, Egilmez R. (2002). Expression of cell-cycle related proteins in *Helicobacter pylori* gastritis and association with gastric carcinoma. *Neoplasma.* 49: 95-100.
- Potti J, Davila JA, Tella JL, Frias O, Villar S. (2002). Gender and viability selection on morphology in fledgling pied flycatchers. *Mol Ecol.* 11: 1317-26.
- Poulin R, Thurn JR. (1996). Sexual inequalities in helminth infections: a cost of being a male? *American Naturalist.* 147: 287-295.
- Rafati S, Salமான AH, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N. (2001). Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. *Mol Biochem Parasitol.* 113: 35-43.
- Remoue F, To Van D, Schacht AM, Picquet M, Garraud O, Vercruyse J, Ly A, Capron A, Riveau G. (2001). Gender-dependent specific immune response during chronic human *Schistosomiasis haematobia*. *Clin Exp Immunol.* 124: 62-8.
- Restrepo BI, Aguilar MI, Melby PC, Teale JM. (2001). Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am J Trop Med Hyg.* 65: 366-70.

- Roberts CW, Cruickshank SM, Alexander J. (1995). Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect Immun*. 63: 2549-55.
- Roberts CW, Walker W, Alexander J. (2001). Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev*. 14: 476-88.
- Rodriguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. (2002) Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol* 168: 3135-9.
- Rogers KA, DeKrey GK, Mbow ML, Gillespie RD, Brodskyn CI, Titus RG. (2002). Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol Lett*. 209: 1-7.
- Satoskar A, Alexander J. (1995). Sex-determined susceptibility and differential IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*. *Immunology*. 84: 1-4.
- Schuster JP, Schaub GA. (2001). Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitol Res*. 87: 994-1000.
- Sciutto E, Fragoso G, Diaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res*. 77: 243-6.
- Sciutto E, Fragoso G, Manoutcharian K, Gevorkian G, Rosas-Salgado G, Hernandez-Gonzalez M, Herrera-Estrella L, Cabrera-Ponce J, Lopez-Casillas F, Gonzalez-Bonilla C, Santiago-Machuca A, Ruiz-Perez F, Sanchez J, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C. (2002). New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch Med Res*. 33: 371-8.
- Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzofsky JA, Mosmann TR, James SL, Morse HC 3rd. (1992). Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev*. 127: 183-204.
- Sibille P, Calleja C, Carreras F, Bigot K, Galtier P, Boulard C. (2000). *Fasciola hepatica*: influence of gender and liver biotransformations on flukicide treatment efficacy of rats infested and cured with either clorsulon/ivermectin or triclabendazole. *Exp Parasitol*. 94: 227-37.
- Soliman S, Marzouk AS, Main AJ, Montasser AA. (2001). Effect of sex, size, and age of commensal rat hosts on the infestation parameters of their ectoparasites in a rural area of Egypt. *J Parasitol*. 87: 1308-16.
- Spinedi E, Gaillard RC, Chisari A. (2002). Sexual dimorphism of neuroendocrine-immune interactions. *Front Horm Res*. 29: 91-107.
- Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE. (2000). Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol*. 6: 297-305.
- Sternberg EM. (1997). Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest*. 100: 2641-7.
- Suzuki Y. (1999). Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. *Immunobiology*. 201: 255-71.
- Tella JL, Scheuerlein A, Ricklefs RE. (2002). Is cell-mediated immunity related to the evolution of life-history strategies in birds? *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 22: 1059-66.

- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. (1994). A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 80: 563-8.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitol. 84: 74-81.
- Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. Parasitol Res. 85: 135-41.
- Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE. (1999). The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. Parasitology. 118: 623-33.
- Verthelyi D. (2001). Sex hormones as immunomodulators in health and disease. Int Immunopharmacol. 1: 983-93.
- Walker W, Roberts CW, Ferguson DJ, Jebbari H, Alexander J. (1997). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* is influenced by gender and is associated with differences in interleukin-12 and gamma interferon production. Infect Immun. 65: 1119-21.
- Watanabe K, Hamano S, Noda K, Koga M, Tada I. (1999). *Strongyloides ratti*: additive effect of testosterone implantation and carbon injection on the susceptibility of female mice. Parasitol Res. 85: 522-6.
- Willis C, Poulin R. (2000). Preference of female rats for the odours of non-parasitised males: the smell of good genes? Folia Parasitol (Praha). 47: 6-10.
- Yokoyama WM, Scalzo AA. (2002). Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. Microbes Infect. 15: 1513-21.
- Zhang Z, Chen L, Saito S, Kanagawa O, Sendo F. (2000). Possible modulation by male sex hormone of Th1/Th2 function in protection against *Plasmodium chabaudi chabaudi* AS infection in mice. Exp Parasitol. 96: 121-9.
- Zuk M, McKean KA. (1996). Sex differences in parasite infections: patterns and processes. Int J Parasitol. 26: 1009-23.

LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. *Immune and endocrine network circuitry.*

The magnitude and complexity of the IE network includes practically all the sexual hormones and many of the immunological components described. Some of the events in the IE network involve cellular reproduction and *de novo* synthesis of receptors. A node for strong hormonal modulation of acquired immunity in the IE network is the proposed conflictive effects of androgens and estrogens acting upon TH1/TH2 mutually controlled balance. References: 1) Spinedi et al. 2002. *Front Horm Res*, 2) Esch T. 2002. *Gesundheitswesen*, 3) Medzhitov et al. 2002. *Science*, 4) Murtaugh et al. 2002. *Vet Immunol Immunopathol*, 5) Henri et al. 2002. *J Immunol*, 6) Pramparo P. 2002. *J Hum Hypertens*, 7) Hughes et al. 2001. *J Parasitol*, 8) Verthelyi D. 2001. *Int Immunopharmacol*, 9) Roberts et al. 2001. *Clin Microbiol Rev*, 10) Thaker et al. 2001. *Br J Neurosurg*, 11) Liesenfeld et al. 2001. *J Parasitol*, 12) Morales-Montor et al. 2001. *J Immunol*, 13) Taylor-Robinson A. 2001. *Trends Parasitol*, 14) Kurtis et al. 2001. *Infect Immun*, 15) Remoue et al. 2001. *Clin Exp Immunol*, 16) Ganley et al. 2001. *Exp Parasitol*, 17) Salzet et al. 2001. *Brain Res Mol Brain Res*, 18) Zhang et al. 2001. *Parasitol Res*, 19) Soliman et al. 2001. *J Parasitol*, 20) Feterowski et al. 2001. *Eur J Immunol*, 21) Peeters et al. 2001. *Eur J Clin Invest*, 22) Chae et al. 2001. *Hypertension*, 23) Barnea ER. 2001. *Early Pregnancy*, 24) Franco et al. 2001. *J Am Soc Nephrol*, 25) Gavras HP. 2001. *Am J Hypertens*, 26) Weinstock et al. 2000. *Eur J Endocrinol*, 27) Gomez et al. 2000. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 28) Zhang et al. 2000. *Exp Parasitol*, 29) Balemba et al. 2000. *Vet Parasitol*, 30) Benedetto et al. 2000. *New Microbiol*, 31) Hunter et al. 2000. *Curr Opin Immunol*, 32) Freilich et al. 2000. *Am J Trop Med Hyg*

Figure 2. *Proposed neuroimmunoendocrinological interactions that occur in schistosomiasis.*

Normally, there is a crosstalk between the neuroendocrine and the immune systems of the host. Infection results in a TH1/TH2 shift of the immune response. The parasite actively induces an immune response, which progressively leans towards TH2. Then, the increase in IL-1 β expression in hypothalamus stimulates CRH production, which in turn stimulates pituitary ACTH. Concomitantly, IL-6 and MIF could be regulating ACTH production directly in the pituitary gland. The ACTH production in turn stimulates adrenal gland to produce cortisol and DHEA, together with TNF- α , which can directly inhibit parasite growth. Infection triggers the immune response of the host by mediating the neuroendocrine system at HPA-axis level. The consequent microenvironment could be more permissive for the establishment and growth of the parasite. The net also exhibits the possibilities of HPA-axis hormones to act directly upon the parasite, affecting its reproductive capacity through adrenal steroids favouring the expression of genes related to cellular differentiation and proliferation.

Figure 3. *Immunoendocrinological interactions in cysticercosis.*

Infection with the metacestode (P) results in a feminization process and in a TH1/TH2 shift of the hosts immune response. The parasite actively induces an immune response, which progressively leans towards TH2. Then, the increase in IL-6 production in turn stimulates estradiol production by activating directly the enzyme P-450 aromatase, and at the same time increasing pituitary FSH levels. Estradiol would then cycle back to further favor TH2 response. The decreased testosterone production in turn inhibits TH1

dependent cellular response. In short, the parasite is able to drive the immune response of the host by mediating the endocrine system at P450-aromatase level. The consequence is the change of the microenvironment from restrictive (male) to permissive (female) for the growth of cysticerci. The net also exhibits the possibilities of the host sexual hormones to acting directly upon the parasite, affecting its reproductive capacity through sexual steroids favouring the expression of genes related to cellular differentiation and proliferation.

Table I. I Infection SD and/or Immune SD in different host-parasite relationships documented to date (some parasites infects more than one host specie).

PARASITE	HOST	DIMORPHISM	PREVALENCE	INTENSITY	SEVERITY	MORTALITY	MECHANISM	OTHER OBSERVATIONS	REFERENCE
<i>Brugia malayi</i>	Human	Yes	<	<	<				Garley 2001
<i>Brugia pahangi</i>	Rat	Yes	<	<		<			Bell 1969
<i>Dipetalonema vitae</i>	Hamster	Yes	<	<			17 β -estradiol and progesterone associate with protection in females		Reynoud 1984
<i>Onchocerca volvulus</i>	Mouse						Infected males have decreased levels of testosterone in plasma and urine	Females distinguish between infected and non infected males	Kovallars 1993, Kovallars 1993
<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	Mouse						Peripheral immune response is reduced in infected males and it is associated to higher levels of corticosterone	Infected males are less aggressive	Barnard 1988
<i>Helarckus spumosa</i>	Mouse	Yes	<	<			Testosterone favors the development of the parasite and his survival in the host		Harder 1982
<i>Hymenolepis diminuta</i>	Rat	Yes in response to treatment					Infected males have decreased levels of testosterone in plasma	A deficient diet in vitamin C complex inhibits growth of the parasite in females only. Females distinguish between infected and not infected males	Wills 2000, Addie 1948
<i>Ixodes ricinus</i>	Voies	Yes	<	<			Testosterone reduces innate and acquired resistance to tick feeding	Tick feeding favors transmission of others parasites	Hughes 2001
<i>Leishmania donovani</i>	Mouse	Yes	<	<				Testosterone treated macrophages have more promastigotes	Zhang 2001
<i>Leishmania major</i>	Mouse	Yes	<	<				Testosterone treatment in females increases parasite number	Mock 1988
<i>Leishmania mexicana</i>	Mouse	Yes	<	<	<		Infected females produce more IFN γ and infected males more TNF α	Treatment with IFN γ neutralizing antibody in females equals the lesion growth to male.	Saizabar A 1985
<i>Nippostrongylus</i>	Rat	Yes	<	<			Testosterone influences		Turtis 1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

<i>Braconia</i>								goblet cell destruction delaying the parasite expulsion.		
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Mice	Yes	<1	<1	<1	<1	<1	Testosterone decreases the levels of total IgG, IgG1 and IgG2b, increases CD4+ and decreases Ig+ cells in infected females.	Oral treatment with testosterone increases mortality in females.	Mossmann 1997, Bersten 1997
<i>Plasmodium chabaudi</i>	IFN γ R ⁻ Mice	Yes	<1	<1				Male sex hormones modulate the TH1/TH2 cell function.		Zhang 2000
<i>Plasmodium chabaudi</i>	IL4 ⁻ Mice	Yes	<1	<1				Male sex hormones modulate the TH1/TH2 cell function.		Zhang 2000
<i>Plasmodium chabaudi</i>	IL10 ⁻ Mice	Yes	>1				>1	The pathological features may be due to direct stimulation of TH2s by the parasite.		Li 1999
<i>Schistosoma haematobium</i>	Human	Yes	<1	<1	<1			Females have higher levels of specific IgA, TGF β and IL10 with a low specific proliferation compared to males.		Remoué 2001
<i>Schistosoma mansoni</i>	Human	Yes	<1	<1	<1					Mohamed-Ali 1999
<i>Schistosoma mansoni</i>	Mice	Yes	>1	>1	>1	>1	>1		Testosterone treatment in females or castrated males reduces mortality. DHEA treatment reduces parasite number in females.	Nakazawa 1997, Fallon 1996
<i>Schistosoma mansoni</i>	Hamster	Yes	<1	<1						Barrabas 1980
<i>Strongyloides ratti</i>	Rat	Yes	<1	<1					Testosterone treatment and/or macrophage blocking increases worm recovery in females.	Waterbale 1999
<i>Taenia crassiceps</i>	Mice	Yes	>1	>1				During infection there is a shift TH1/TH2, in the acute infection IL12 promotes CD4+ specific proliferation, in the chronic infection IL6 predominates and stimulates the aromatase activity which probably increases serum estradiol.	Chronically infected male lose their sexual behavior due to an increase in estradiol. Infection changes the response to the parasite facilitating the parasite cycle. Vaccination is more effective in males than females.	Scutto 1980, Scutto 1981, Lamas 1995, Morales 1996, Terrazas 1998, Morales-Montero 2001, Gourbal 2001, Terrazas 2002,
<i>Taenia solium</i>								Low levels of androgens		Morales 2002

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

			non-castrated	castrated				or high levels of estrogens probably influence susceptibility to infection		
<i>Toxoplasma gondii</i>	Human	Yes							Women develop a greater degree of inflammation when cysticerci are found in brain parenchyma and have more CSF inflammation and increased cellularity in CSF than men	Del Bruto 1988, Fleury in press
<i>Toxoplasma gondii</i>	Mice	Yes						Male SCID produce more rapidly IL-12 and higher levels of IFN γ . Males produce more rapidly and higher levels of TNF α and IFN γ at the beginning of the infection controlling parasite multiplication.	Testosterone treatment reduces parasite numbers and mortality in females. Infection produces infertility in females	Lesenfeld 2001, Walker 1991, Sahl 1994, Roberts 1995
<i>Trichinella spiralis</i>	Voles	Yes							Polygamous males have higher testosterone levels than monogamous and are more parasitized.	Klein 1999
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Mice	Yes							Dominant males have higher levels of testosterone and are more parasitized.	Schuster 2001
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Colony-cultured	Yes						Intact males have higher levels of lytic antibodies	Ovariectomized females have more parasites than controls, estrogen replacement reduces the parasitemia. Orchiectomized males have less parasites than controls, testosterone replacement increases parasitemia	do Prado 1998, do Prado 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table II.- Host-parasite relationships in which several infection and some immune parameters were measured at some time of infection. The immune parameters collected varied in each infection.

PARASITE	HOST	DIMORPHISM	PREVALENCE	INTENSITY	INF γ	TNF α	IL2	IL4	IL6	IL10	IL12	IgA	Specific Proliferation	REFERENCE
<i>Leishmania mexicana</i>	mice	Yes	< ¹	> ²	> ²	< ¹		?		?	?			Satoskar 1995
<i>Schistosoma haematobium</i>	human	Yes	< ¹	< ¹	< ¹	< ¹				?		?	< ¹	Remoué 2001
<i>Toxoplasma crassiceps</i>	mice	Yes	> ¹	> ¹	< ¹		?	< ¹	?	?			?	Terrazas 1998
<i>Plasmodium chabaudi</i>	mice IL10 ^{-/-}	Yes	> ¹	> ¹	< ¹	> ²		?			?			Li 1999
<i>Toxoplasma gondii</i>	mice	Yes	> ¹	> ¹	< ¹	< ¹					?		< ¹	Walker 1997, Roberts 1995

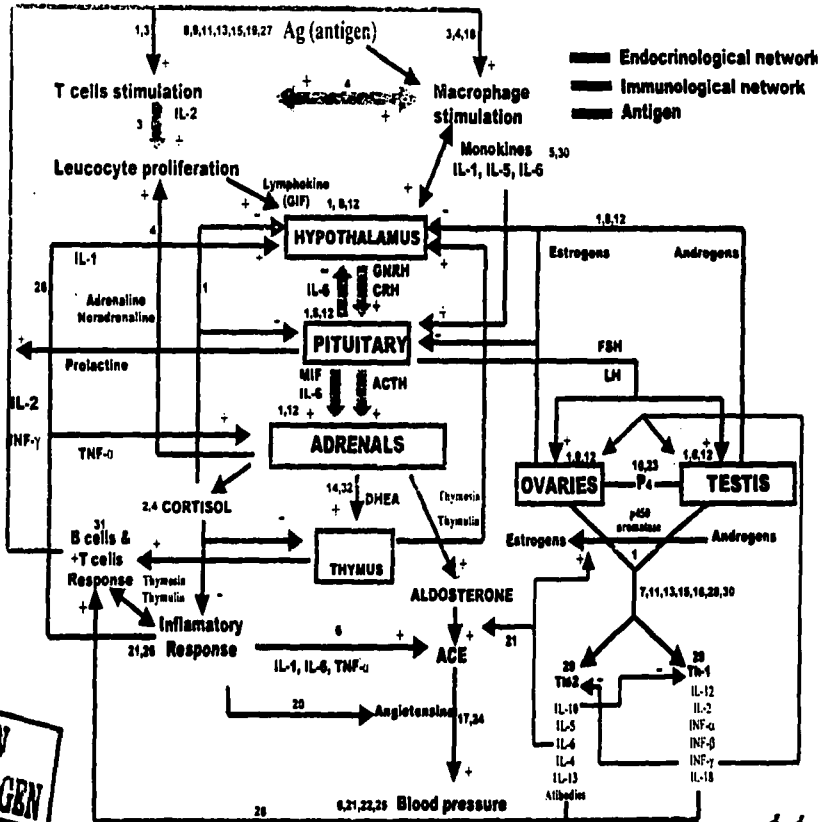
¹ In acute infection. ² In chronic infection.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Table III.- Main hormones effects on immunocompetent cells, and its mechanisms

<i>Hormone</i>	<i>Effect over immune system cells</i>
	Polyclonal B cell activator, Promotes B cells into plasma cells, ↓ bone marrow and thymus mass, ↑ IL-10 and IL-6 secreting cells, ↓ IFN-γ and IL-2 production, down-regulates NK activity, upregulate phagocytosis by macrophages, ↑ serotonin and histamine release.
Estradiol	
Testosterone	↓ B cell response to mitogen, ↓ mast cell secretion of histamine and serotonin, ↓ IL-1, IL-6 and TNF-α production.
Progesterone	↓ NK cytotoxic activity, ↓ TNF-α secretion, ↓ macrophage cytokine secretion, ↓ NO production
Cortisol	↓ prostaglandines and leukotrienes production, modulates T and B cell maturation, affect trafficking and activation of pro-inflammatory cells, ↓ the production of IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, and TNF-α.
DHEA	↑ IL-2 production, ↑ IFN-γ production, ↓ IL-6 secretion ↓ TNF-α production, Protects against neurooxidative damage ↑ T cell immunity, ↓ DTH reaction.
CRH	↑ IL-1 and IL-6 production, ↑ chemotaxis and superoxide production, ↑ B cell proliferation and ↑ expression of T cells IL-2 receptors.
ACTH	↑ antibody production, cytokine secretion and proliferation.
Prolactin	↑ lymphocyte proliferation in response to antigen and mitogens, ↑ IFN-γ and IL-2 secretion, ↓ cell death mechanisms in immune cells, induce NK cells to their differentiation to prolactin-activated killer cells (PAK cells).
VIP	↓ the production of pro-inflammatory agents, ↑ the production of anti-inflammatory cytokines both functions in activated macrophages, ↑ Th2 cell differentiation
GH	↑ adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells, ↑ release of thymocytes from thymic nurse cells, ↑ intrathymic T-cell traffic.
Thyroid hormones	Affects primary B cell development due to reduced proliferation of immature B-cell precursors.
Vasopresin and oxitinin	↑ cell proliferation
Enkephalins	Low doses : ↑ activates B and T cells High doses : immunosuppression
Endorphins	↓ antibody production and proliferation.
hCG	↓ Proliferation of T and NK and induction of T suppressors
Melatonin	Affects thymocyte maturation and differentiation

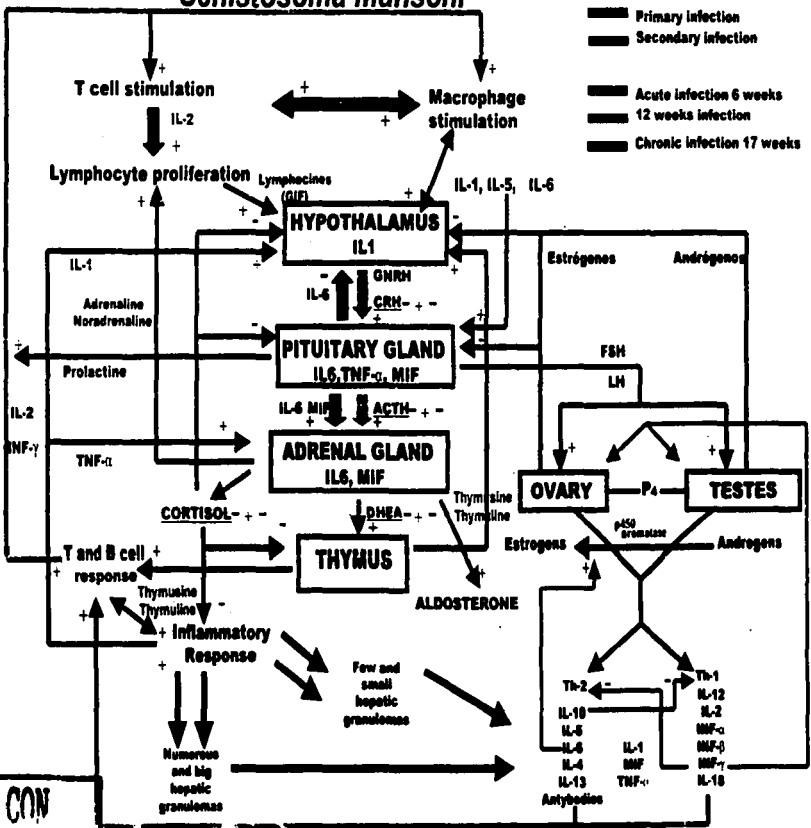
Immune-Endocrine Network



TESIS CON SELLA DE ORIGEN

EE

Schistosoma mansoni



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

29