

00346

13
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE ACADEMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)**

P R E S E N T A

Q.F.B. Miriam Rodríguez Sosa

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL BOJALIL PARRA.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

165012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, y en el Laboratorio de Inmunología del Dr. Carlos Larrañe del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM bajo la asesoría del Dr. Rafael Bojalil Parra y la co-asesoría del Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés.

Y ha sido financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto: 0535PM).

El comité Tutorial que evaluó el desarrollo de la tesis estuvo integrado por :

Dr. Rafael Bojalil Parra

Dr. Luis I. Terrazas Valdés

Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

El jurado asignado para examinar este trabajo fue :

Dr. Rafael Bojalil Parra

Presidente

Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

Primer vocal

Dr. Juan Pedro Laclette San Roman

Segundo vocal

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Tercer vocal

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Secretario

Dr. Fernando García Tamayo

Suplente

Dr. Abraham Landa Piedra

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Rafael Bojalil Parra, por su apoyo durante mis estudios de maestría.

A los miembros del jurado, por sus valiosas opiniones, en especial al Dr. Luis F. Montaña por el interés demostrado en este trabajo.

Una parte de estos datos fueron procesados en el laboratorio del Dr. Carlos Larralde, del Instituto de investigaciones Biomédicas de la UNAM, mi agradecimiento a todos los miembros de ese laboratorio por facilitarme el trabajo.

A los Dr. Pedro A. Reyes por las facilidades que me dio para poder llevar a término mis estudios de maestría.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", en especial a las Químicas Soco y Maru por facilitarme mi trabajo en el laboratorio.

A mis amigos: Rashidi, Héctor y Rodrigo por su apoyo en el trabajo y por los buenos momentos que pasamos juntos.

A mi amiga Libia Vega, por su amistad y compañía durante estos últimos años.

A mi amiga Elisa Fernández por su perseverante amistad.

A todos mis amigos de los laboratorios del INC, "Ignacio Chávez".

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS.....	4
TABLAS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
INTRODUCCION	
1) Respuesta inmune.....	7
2) Mecanismos de polarización de los linfocitos Th (Th1/Th2).....	10
Antígeno (naturaleza, vía de entrada, dosis)	
Cronicidad del estímulo	
Tipo de Células presentadoras de Ag	
Modulación de los receptores celulares	
Microambiente de citocinas	
3) <i>Taenia crassiceps</i>	16
Características generales	
Inmunología	
4) <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Características generales	
Inmunología	
5) Justificación.....	21
Planteamiento del estudio.....	22
HIPOTESIS	23
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y METODOS	25
RESULTADOS	30
Número de parásitos	
Proliferación celular	
Citocinas	
Anticuerpos específicos a <i>T. cruzi</i>	
Oxido Nítrico	
Linfocitos y eosinófilos	
DISCUSION	45
CONCLUSIONES	53
REFERENCIAS	54

ABREVIATURAS

Células NK	Células Asesinas Naturales
DTH	Reacciones de Hipersensibilidad Retardada
EAE	Encefalomiелitis Autoinmune Experimental
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferon gama
ip	Intraperitoneal
RI	Respuesta Inmune
LIT	Infusión de Hígado y Triptosa
MBP	Myelin Basic Protein
NaCl	Cloruro de Sodio
NH ₄ Cl	Cloruro de Amonio
NO	Oxido Nítrico
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Solución Buffer de Fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
TCR	Receptor de Células T
[H ³]TdR	Timidina Tritiada
TNF- α (β)	Factor de Necrosis Tumoral alfa (beta)

TABLAS Y FIGURAS

	Pag
Esquema 1. Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	16
Figura 1. Polarización de la respuesta inmune en ratones Balb/c infectados con <i>T. crassiceps</i>	18
Esquema 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Tabla 1. Estado inmunológico de ratones Balb/c infectados con <i>Taenia crassiceps</i>	30
Figura 2. Cinética de la parasitemia por <i>T. cruzi</i>	31
Figura 3A. Respuesta proliferativa a Con A.....	32
Figura 3B. Respuesta proliferativa a Ag soluble de <i>T. cruzi</i>	32
Figura 4. Producción de IL-2 en respuesta a Con A	35
Figura 5. Producción de IL-2 en respuesta a Con A	35
Figura 6A. Producción de IFN- γ en respuesta a Con A.....	36
Figura 6B. Producción de IFN- γ en respuesta a Ag soluble de <i>T. cruzi</i>	36
Figura 7. Producción de Oxido Nítrico.....	37
Figura 8A. Producción de IL-4 en respuesta a Con A.....	38
Figura 8B. Producción de IL-4 en respuesta a Ag soluble de <i>T. cruzi</i>	38
Figura 9A. Producción de IL-10 en respuesta a Con A.....	40
Figura 9B. Producción de IL-10 en respuesta a Ag soluble de <i>T. cruzi</i>	40
Figura 10 A,B,C y D. Producción de anticuerpos específicos de <i>T. cruzi</i>	42
Figura 11A. Número de eosinófilos.....	43
Figura 11B. Número de linfocitos.....	43

RESUMEN

En este trabajo se buscó establecer si en ratones BALB/c una infección causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps* afecta la susceptibilidad a una infección posterior por un parásito intracelular como *Trypanosoma cruzi*. La infección por *T. crassiceps* induce en estos ratones un cambio secuencial en el patrón de citocinas que se produce, lo que se aprovechó para explorar *in vivo* si estos diferentes perfiles de citocinas pudieran influir la respuesta inmune y la susceptibilidad a *T. cruzi*. Los resultados demuestran que ambos parámetros se alteran y que estas alteraciones varían en función del tiempo de evolución de la primera infección: 1) Cuando los ratones se infectaron con *T. cruzi* a la segunda semana después de la infección por *T. crassiceps* (en presencia de un patrón de citocinas de tipo Th1, generada por la primera infección), el nivel de la parasitemia fue ligeramente menor que el de los controles. 2) Cuando los ratones fueron retados a la cuarta semana (en presencia de un perfil mixto Th1/Th2), el nivel de parasitemia se mantuvo por debajo de los controles, pero además hubo un retraso en el inicio de la misma. 3) En contraste, cuando la segunda infección se inició a las ocho y doce semanas después de la primera (en presencia de un patrón de citocinas de tipo Th2), el nivel de parásitos circulantes tuvo incrementos significativos (> del 80 %) con respecto al de los controles desde muy temprano. Se evaluó el perfil de citocinas generado por linfocitos de bazo provenientes de cada grupo. En las coinfecciones tempranas (a las 2 y 4 semanas), los linfocitos respondieron inicialmente con un patrón de citocinas de tipo mixto, Th1/Th2 (altos niveles de IFN- γ e IL-4), que retrasó la parasitemia mientras se mantuvo; en coinfecciones tardías (a las semanas 8 y 12) presentaron una respuesta de tipo Th2. La respuesta proliferativa a Con A de linfocitos de bazo provenientes de los distintos grupos de animales coinfectados fue menor con respecto a los infectados sólo con *T. cruzi* con una clara tendencia a decrecer aún más a medida que la infección con *T. cruzi* se hacía más tardíamente. Por otro lado, se evaluó también la cinética de la respuesta humoral a *T. cruzi* (IgG2a, IgG2b e IgG1). Los anticuerpos específicos se detectaron después de 10 días de infección, cuando el número de parásitos fue más alto. Sin embargo el título máximo de anticuerpos se alcanzó después de los 60 días de infección y persistió en la fase crónica (> de 60 días). La distribución de los isotipos, fue en todos los casos igual, con títulos mayores de IgG2a y por debajo IgG2b e IgG1. En conjunto nuestros resultados demuestran que: el incremento temprano y constante en la replicación de *T. cruzi* en coinfecciones hechas a las 8 y 12 semanas puede deberse a cambios en la respuesta inmune celular generada por la primera infección (*T. crassiceps*), lo cual se refleja en el patrón de citocinas producido como respuesta a la segunda infección, pero no en los títulos de anticuerpos. Existe la probabilidad de que los helmintos afecten la capacidad de sus hospederos de responder adecuadamente a aquellos patógenos en contra de los cuales se requiere de una respuesta tipo Th1 ó mixta (Th1/Th2) para proteger, lo cual representaría un problema de salud pública más importante que el reconocido hasta ahora.

INTRODUCCION

1) Respuesta inmune

Históricamente, la palabra inmunidad significa protección contra enfermedades infecciosas, aunque actualmente una definición más específica es la que se refiere a la inmunidad como una serie de reacciones que se dan en un organismo en contra de sustancias ajenas, incluyendo microbios y macromoléculas como son proteínas y polisacáridos sin que haya consecuencias fisiológicas o patológicas en el organismo. Las diversas células y moléculas responsables de dichos eventos de la inmunidad constituyen lo que conocemos como sistema inmune, y la respuesta colectiva y coordinada de estas células cuando hay invasión de sustancias ajenas al organismo conforman la respuesta inmune (RI) (Abbas 1994).

Las diversas células que constituyen al sistema inmune se encuentran distribuidas en todo el organismo, aunque se acumulan de manera predominante en los órganos linforreticulares, tales como ganglios linfáticos, bazo, médula ósea, timo y los tejidos linfoides asociados a las mucosas de los intestinos del sistema genito-urinario y del árbol respiratorio. Todas las células que intervienen en la RI se originan de células primordiales pluripotenciales y autorrenovables de la médula ósea.

Los linfocitos son las células que desempeñan la función central en la respuesta inmune innata como en la adquirida. En número los linfocitos predominan sobre los demás inmunocitos, como son los macrófagos, células endoteliales, eosinófilos, basófilos, neutrófilos y células cebadas.

Las dos grandes líneas de linfocitos reconocidas hasta ahora son las células B y las células T (Nossal, 1993), las cuales se distinguen principalmente por sus receptores de membrana con los que reconocen al antígeno, y por ciertos marcadores característicos de la superficie celular denominados grupos de diferenciación (CD). Así, las células B reconocen antígenos mediante inmunoglobulinas de superficie que en conjunto con otras moléculas forman el receptor de antígeno de las células B, mientras que las células T reconocen antígenos mediante una estructura de membrana llamada TCR/CD3 (Abbas et al. 1993).

Con respecto a los linfocitos T, se sabe que existe una correlación relativa entre la expresión de los antígenos de membrana y las actividades funcionales de estos. Las células T maduras pueden subdividirse en dos grupos denominados CD4⁺ y CD8⁺. Estas subpoblaciones de linfocitos representan, el 70 y 25 % respectivamente de la población total de células T en sangre y tejidos linfoides periféricos.

Las células T CD8⁺ median la mayoría de la citotoxicidad antígeno-específica (la capacidad para matar otras células que son reconocidas como ajenas - infectadas o alogénicas -). Los linfocitos T CD4⁺ forman el subgrupo denominado células colaboradoras (T helper-Th) debido a su capacidad de iniciar y regular la respuesta inmune, de mediar las respuestas efectoras antígeno-específicas (citotoxicidad mediada

por células) y de regular la actividad de otros leucocitos (Goodman, 1983). Algunos ejemplos de esto son la influencia que tienen sobre la activación y diferenciación de las células B, la capacidad de incrementar la respuesta de las células T CD8⁺, así como la capacidad para activar macrófagos (Harding and Unanue, 1990) lo cual se lleva a cabo a través de la secreción de diferentes factores solubles, entre los cuales se incluyen el interferón gama (IFN- γ) y las interleucinas (IL) (Constant et al. , 1995).

El reconocimiento del antígeno por las células T requiere de la participación de células presentadoras, esto es porque los linfocitos T no reaccionan con epítopes de la proteína intacta, sino que reconocen sólo a aquellos que son procesados y expuestos en la superficie de las células presentadoras de antígenos (ej. macrófagos). Esta presentación se da en forma de pequeños péptidos unidos a una estructura antigénica llamada complejo principal de histocompatibilidad (MHC), reconocidos por las células T por medio del TCR (alfa-beta)/CD3. La unión TCR/CD3 en la superficie de la células T con el péptido/MHC en la célula presentadora de antígeno forma un complejo que genera una señal de activación para las células T, la cual no es completa si en la interacción no participan las moléculas CD4 y/o CD8 para reconocer a los antígenos de histocompatibilidad (MHC), ya sea de clase II ó de clase I respectivamente y otras moléculas como B7 y CD28. Estos eventos de activación son necesarios pero no suficientes para la inducción subsecuente de la linfoproliferación. Por lo general, se requiere de otras señales como son las inducidas por las citocinas producidas por las células presentadoras de antígenos (IL-1 de los monocitos) que pueden inducir la producción de linfocinas y factores de crecimiento por las células T, los cuales, finalmente, estimulan la proliferación celular (Finkelman, 1995). Sin embargo, aún no están del todo claros los mecanismos reguladores que pueden encender, amplificar o apagar la respuesta inmune celular. En 1984 se propuso la existencia de células T CD8⁺ supresoras que eran capaces de inhibir específicamente la respuesta inmune celular (Dorf and Benacerraf, 1984). Sin embargo, esta hipótesis ha sido prácticamente desechada debido a que hasta el momento no ha sido posible aislar y clonar una célula T CD8⁺ que induzca supresión. Los conceptos de origen y regulación de la RI sufrieron un gran cambio a partir del descubrimiento de que las células T CD4⁺ vírgenes activadas por un antígeno se diferenciaban en distintos subgrupos funcionales, los cuales se caracterizan por el patrón de citocinas secretado por ellas (Mossman, et al. 1986).

Una estimulación antigénica repetida en células TCD4⁺ *in vitro*, da como resultado el desarrollo de patrones restringidos de citocinas que permitieron clasificar a las células T en subpoblaciones. De acuerdo con esto, entonces la población de células T CD4⁺ pudo subdividirse en los subtipos Th1 y Th2 (Mossman y Coffman 1987).

Las células del subtipo Th1 son las que producen altos niveles de IL-2, IFN- γ y linfotóxina (TNF - β) y son las responsables de la inmunidad mediada por células, generan activación de macrófagos, y promueven

reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH), activación de células T CD8⁺ citotóxicas, activación de células NK (Mossman and Coffman, 1989).

Las células del subtipo Th2 son las que secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, generan y mantienen la respuesta inmune de tipo humoral, con proliferación y diferenciación de linfocitos B, producción de anticuerpos principalmente de la clase IgG1 e IgE, inmunidad de las mucosas por células cebadas, inducción de diferenciación y proliferación de eosinófilos, y facilitación de la producción de IgA (Mossman and Coffman, 1989; Doherty et al. 1993).

Una vez expandidas estas dos subpoblaciones celulares tienden a regularse negativamente una a otra a través de la acción de las citocinas que producen. Así el IFN- γ inhibe la proliferación de las células Th2 y la secreción de IL-4 e IL-10, la liberación de IL-10 por macrófagos, y el reclutamiento de eosinófilos. Mientras que IL-4, IL-10 e IL-13 inhiben la acción de IFN- γ sobre sus células blanco e incluso inhiben la producción de IFN- γ por células Th1 (Fiorentino et al. 1991; Maggi et al. 1992).

Existen varias evidencias que sugieren que los fenotipos "maduros" Th1 o Th2 no están presentes entre la población de células T vírgenes CD4⁺ sino que parecen diferenciarse de un antecesor común, después de un primer evento de activación (Gajewski et al., 1994). Estas células que dan origen al subtipo celular Th1 o Th2 son conocidas como linfocitos Th0 y secretan interleucinas de ambas subpoblaciones celulares. Sin embargo, hasta ahora, aun no está claramente establecido *in vivo* qué es lo que condiciona el estado final de diferenciación de una población de células T CD4⁺, hacia Th1 o Th2, en un organismo que recibe un reto antigénico (Gajewski et al. 1994).

2) Mecanismos de polarización de los linfocitos Th (Th1/Th2)

En las investigaciones enfocadas a definir qué es lo que determina la polarización de las células T hacia alguno de los subtipos celulares Th1 o Th2 después del reconocimiento del Ag, se han hecho experimentos, tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales han utilizado principalmente modelos de infección por bacterias, virus o parásitos. Todos estos estudios coinciden en que la participación de las subpoblaciones Th1 y Th2 son fundamentales para el resultado final de la infección. Sin embargo, todavía no se conoce bien el mecanismo por el cual una célula Th0 da origen a una respuesta tipo Th1 ó Th2 después de un estímulo antigénico. Se cree que la diferenciación de las células Th0 es afectada, además de las características genéticas del individuo, por otros factores (Nicholson and Kuchroo 1996) como son:

- **Naturaleza del antígeno:** A finales de los 80's se empezaron a hacer estudios enfocados a analizar el papel de la estructura del antígeno en la generación de diferentes respuestas inmunes que generarán resistencia o susceptibilidad. Uno de los primeros trabajos donde usaron péptidos modificados fue en el modelo murino de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), en el cual se ha reconocido universalmente como células autopatógenicas a las células Th1. Los experimentos descritos en este modelo demuestran que el péptido de la mielina básica Ac 1-11 (MBP Ac1-11), que genera la encefalomiелitis, es capaz de proteger contra la enfermedad con el cambio de un solo aminoácido (Wraith et al. 1989). En su momento se creyó que este efecto era debido a un bloqueo del MHC, pero subsecuentes análisis demostraron que esto no era el caso para todos los péptidos (Smilek et al., 1991; Wauben et al., 1992). La identificación de diferentes antígenos modificados que antagonizan (De Magistris et al., 1992), anergizan (Sloan et al, 1993) o parcialmente activan (Evavold, 1991) clonas de células T, sugiere que los antígenos modificados tienen la propiedad de afectar la diferenciación de las células T hacia uno de los subtipos celulares Th1 o Th2. Esto fue comprobado de forma parcial usando antígenos modificados con diferentes afinidades para las moléculas del MHC; en estos experimentos se modificaron aminoácidos que afectaban su unión a los antígenos de histocompatibilidad MHC, preservando los residuos que interaccionan con el TCR. Resultando que la inmunización con péptidos de baja afinidad daban una RI caracterizada por la producción de citocinas tipo Th2, mientras que los de alta afinidad incrementaba la frecuencia de las células productoras de IFN- γ "in vivo" (Kumar et al., 1995). En otro estudio análogo se encontró que los péptidos de baja afinidad producían anticuerpos tipo IgG1 (Th2) y que los ligandos de alta afinidad inducían IgG2a (Th1) (Chaturvedi, 1996). Parece ser que la manipulación del nivel de activación de un complejo péptido - moléculas del MHC reconocido por las células T puede influir en el fenotipo de las respuesta de las células T. Aunque no está todavía definido el mecanismo por el cual ésto pudiera suceder. Existen más trabajos (Constant, 1995;

Hosken, 1995; Nicholson, 1995) que apoyan que la polarización de la respuesta hacia los subtipos Th1 o Th2 está mediada por el tipo de antígeno, indicando que existen antígenos (incluso de un misma fuente) que inducen una respuesta Th1 y otros que inducen específicamente una respuesta tipo Th2, independientemente de si ambas respuestas inmunes son o no protectoras (Scott, 1991).

- **Vía de entrada del antígeno:** Desde la década de los 80's ya se mencionaba que la vía de exposición al antígeno en el hospedero era un factor importante en la determinación de la severidad y el curso que tomaban algunas infecciones (Van den Eertweg et al., 1992). Un claro ejemplo de esto es un reporte donde la infección por *Leishmania* tenía un amplio grado de variabilidad en la severidad de la enfermedad resultante si la infección se inducía en el cojinete plantar, vía nasal, ótica o en diferentes lugares de el abdomen. Inicialmente ésto se trató de explicar considerando algunas variables del sitio como son la temperatura local de la piel, la microvasculatura linfática, o la distribución de las células de Langerhans, las cuales podrían contribuir en las diferencias observadas en la severidad de la infección cutánea por *Leishmania*. Sin embargo en un trabajo posterior estudiaron la influencia del sitio de inoculación del parásito (*Leishmania major*) sobre la respuesta inmune tipo Th1 y Th2 en ratones F1 (BALB/c x C57BL/6) y demostraron que los ratones que desarrollaban la enfermedad progresiva cuando eran inoculados en la piel dorsal presentaban una respuesta tipo Th2, mientras que los inoculados en el cojinete plantar, en los cuales la infección no progresaba e incluso era eliminada, se desarrollaba una respuesta tipo Th1, la cual provee resistencia en contra de este parásito.

Recientemente se ha dado gran importancia al lugar en que se aloja el patógeno, así, de los trabajos realizados con infecciones parasitarias se ha llegado a concluir que para algunos agentes infecciosos fundamentalmente virus y parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Reiner et al., 1994), *Mycobacterium tuberculosis* (Martín, 1995) y *Plasmodium sp* (Stevenson and Tam, 1993), la respuesta inmune provocada es dependiente de Th1, la cual además provee en general protección (esencial para eliminarlos) (Gessnar et al., 1993; Miralles, et al. 1994; Kemp et al., 1993), en tanto una respuesta inmune mediada por Th2 es ineficiente y en ocasiones hasta facilitadora (Pearce, 1995). Por el contrario, para otras infecciones, fundamentalmente aquellas causadas por ciertas bacterias y algunos parásitos extracelulares principalmente los helmintos intrainestinales como *Trichuris muris* (Eise and Grencis, 1991), *Trichinella spiralis* (Grencis et al., 1991) y *Necator americanus* (Pritchard, 1995) la respuesta observada es dependiente de Th2, que en general es capaz de proteger. Todo parece indicar, que la polarización de la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo Th1 o Th2 puede ser influida por la vía de entrada o de alojamiento del antígeno. Los mecanismos por los cuales ocurre ésto no están del todo claros aunque en algunos casos como en la administración oral del Ag se ha demostrado que se induce tolerancia por múltiples mecanismos, incluyendo

apoptosis y anergia de células T reactivas -antigénicas (Chen et al., 1994) y la inducción de células T reguladoras del fenotipo Th2 (Chen et al., 1995).

- **Dosis administrada del antígeno:** Desde hace aproximadamente 20 años se sabe que la dosis de antígeno administrada puede determinar la clase de respuesta inmune, ya sea hacia una inmunidad celular o humoral. Estudios más recientes sugieren que diferentes células T CD4⁺ efectoras pueden producir diferentes citocinas dependiendo de la dosis de antígeno usada. Se ha observado que bajas dosis promueven la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) al estimular el desarrollo de células tipo Th1, mientras que dosis altas inducen la producción de anticuerpos debido a la producción predominante de citocinas tipo Th2 (Bancroft et al., 1994). Un ejemplo de esto es el experimento donde la susceptibilidad normalmente observada en los ratones BALB/c a la infección con *L. major* fue disminuida por la inyección inicial con un número pequeño de parásitos. Estos ratones fueron resistentes a pequeños inóculos de *L. major*, pero además también fueron resistentes cuando se les retó cuatro meses después con dosis de parásitos que deberían normalmente ser letales. Estos ratones desarrollaron una inmunidad mediada por células caracterizada por un predominio de IFN- γ más que la respuesta dominante de IL-4 que normalmente inician estos ratones en la infección con *L. major* (Bretscher, 1992). Otro ejemplo es el trabajo de Bancroft y colaboradores, en 1994 mostraron que una cepa de ratón (BALB/K) que normalmente desarrolla una respuesta inmune tipo Th2 que confiere resistencia en contra de *Trichuris muris* se puede bloquear si se infecta con niveles bajos de este parásito (menos de 40 huevos). En este caso observaron una baja producción de citocinas del tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-9) y una producción elevada de las del tipo Th1 (IFN- γ) que está asociada a la susceptibilidad. En ambos casos se cree que las bases inmunológicas que explican el fenómeno están relacionadas a una dramática alteración en la polarización de la respuesta de las células CD4 dependiente de la dosis utilizada. En los dos casos estaban involucrados principalmente antígenos complejos, por lo que podrían estar presentes diferentes péptidos con densidades que variarían dependiendo de la dosis de antígeno administrada. Esto es consistente con otros autores que dicen que el nivel de activación (dependiente de la interacción péptido-MHC y moléculas coestimuladoras) de las células presentadoras de Ag puede influir en el fenotipo de la respuesta de las células T CD4⁺ (Nicholson y Kuchroo 1996). Las dosis bajas de Ag promueven la diferenciación de las células T hacia el fenotipo Th1 y dosis altas hacia el fenotipo Th2 (Hosken, 1995).

- **Cronicidad del estímulo:** Algunas evidencias en enfermedades o infecciones crónicas sugieren que un estímulo persistente contribuye al cambio de una respuesta tipo Th1 a una de tipo Th2 (Gorczynsky, 1995). En el caso de infecciones parasitarias existen algunos ejemplos, como es el de la infección murina con *Brugia*

malayi, en la cual se ha reportado que durante las dos primeras semanas después de la inoculación con el parásito hay un perfil de citocinas Th1 (niveles altos de IFN- γ), pero después de 21 días hay un incremento significativo de IL-4 e IL-5 con un claro decaimiento de IFN- γ dependiente de IL-10 (Pearlman, 1993). Otro claro ejemplo se observa en el modelo experimental murino de cisticercosis, donde también existe un cambio secuencial de una respuesta Th1 a una respuesta Th2 conforme la infección avanza (Terrazas et al., 1998). En ambos casos está claro que la cronicidad del estímulo parece contribuir al cambio de una respuesta tipo Th1 a una respuesta tipo Th2.

- **El tipo de células presentadoras:** Gajewski y colaboradores (1991) publicaron evidencias que afirman que la proliferación de los tipos celulares Th1 o Th2 es influido por el tipo de célula que presenta el antígeno. Ellos desarrollaron clones de Th1 y Th2 específicas para OVA y usaron un panel de células presentadoras de antígenos (CPA) para examinar su capacidad para estimular la proliferación de las dos subtipos celulares. Los resultados obtenidos demostraron que las células adherentes (macrófagos y cel. dendríticas) inducen eficientemente la proliferación de las células Th1 pero no de las Th2. Mientras que los linfocitos B tienen preferencia por las células Th2 pero no por las del tipo Th1. La explicación para este hecho no es clara, sin embargo existe la posibilidad de que las diferentes CPA expresen cofactores especializados necesarios para la óptima proliferación de un tipo celular, pero no para el otro. Es decir que Th1 y Th2 tienen distintos requerimientos para reconocer la señal de proliferación provista por las células presentadoras de Ag.

- **Modulación de los receptores celulares:** En el proceso de iniciación de la RI las células CD4⁺ vírgenes entran en contacto con algún Ag y se diferencian a células T efectoras productoras de citocinas (T helper). Para tal diferenciación se requieren señales asociadas al TCR antígeno-específico y de otras señales coestimuladoras, en particular CD28 y su homólogo CTLA-4 que interactúan con B7-1 y B7-2 respectivamente, moléculas de superficie que son expresadas por células presentadoras de antígenos profesionales como macrófagos y linfocitos B (Gause et al., 1997). Últimamente, diversos estudios sugieren que en ciertos modelos de enfermedades autoinmunes el bloqueo de B7-1 vs B7-2 puede afectar el curso de la enfermedad (Kuchroo et al. 1995, Racke et al. 1995, Lenschow et al. 1995), ésto es apoyado con otros estudios que sugieren que el bloqueo de moléculas como CD4, CD30 y CD2 afecta el fenotipo de las células T y en consecuencia la susceptibilidad a infecciones o enfermedades. Por otro lado, Dubey y colaboradores usando CPA pulsadas con péptidos para estimular a células T CD4⁺ demostraron que además de ser necesaria la interacción con B7 para la producción óptima de citocinas, existe una respuesta diferencial para las señales coestimuladoras, es decir, la producción de IL-2 por células T fue más dependiente de B7 que la

producción de IL-4 (Dubey et al. 1996). Estos hallazgos son consistentes con estudios en los que se usaron clonas de células tipo Th1 y Th2 donde las células Th1 fueron más dependientes de B7 que las clonas Th2 (McArur et al. 1993, McKnight et al. 1994, Harding et al. 1992, Lichtman et al. 1988). Por lo tanto, la vía coestimuladora CD28/CTLA-4-B7-1/B7-2 parece ser una más de las influencias sobre el balance de citocinas que afecta la diferenciación de las células T.

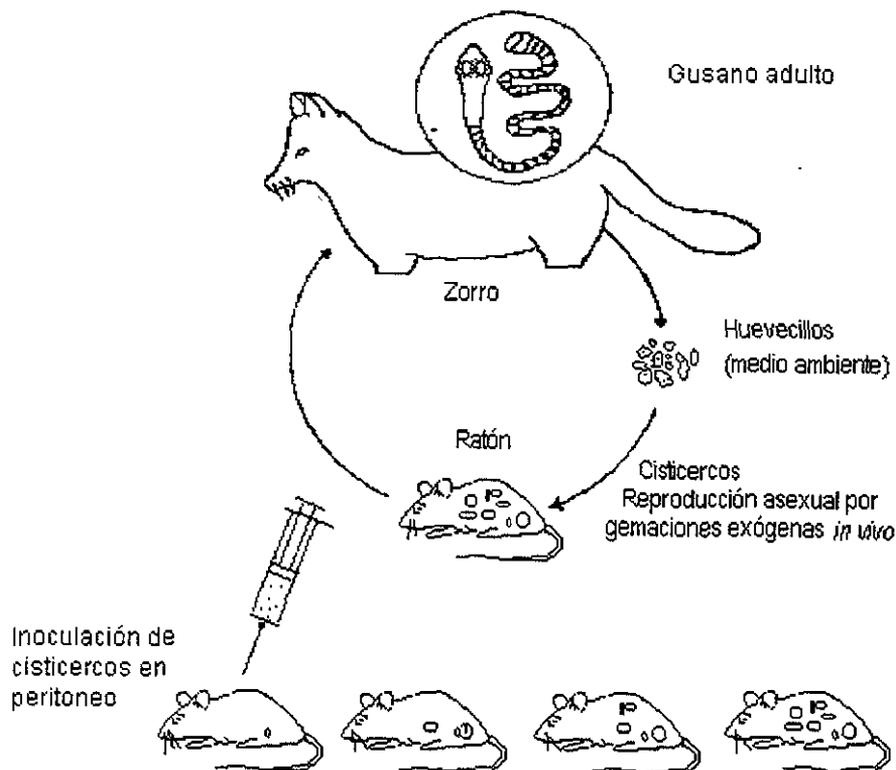
Existe otra hipótesis propuesta por Gajewsky y col. (1990, 1994), la cual propone que de acuerdo a la transducción de la señal asociada al reconocimiento antigénico por el TCR y a la movilización de Ca^{++} intracelular es que la célula puede diferenciarse hacia Th1 ó Th2. Ellos compararon clonas de células tipo Th1 con clonas tipo Th2 y mostraron que las células Th2 no unen Ca^{2+} intracelular de manera "aleatoria", mientras que las células tipo Th1 sí. Sin embargo, estos experimentos tenían la desventaja de que las células utilizadas eran de distintos organismos con distinta especificidad antigénica y que por lo tanto muchas variables pudieron haber contribuido a estos resultados. Esto fue resuelto en un estudio posterior que hicieron Sloan -Lancaster y colaboradores donde compararon clonas de tipo Th1 y Th2 que maduraron de un precursor común *in vitro*. Para esto utilizaron células vírgenes de un ratón transgénico que estimularon con antígeno bajo condiciones que favorecieran ya fuera uno u otro fenotipo y midieron la habilidad de las células diferenciadas Th1 o Th2 para utilizar las vías de señalización de (Ca^{2+}). Sus resultados mostraron que ciertamente las células T vírgenes están acopladas a la vía de Ca^{2+} , pero que la señal es amplificada significativamente por una subsecuente estimulación antigénica bajo condiciones que generan células tipo Th1. En contraste, cuando las células maduran hacia un fenotipo Th2 pierden selectivamente la habilidad para usar esta vía de señalización. Parece ser entonces que las células de tipo Th1 tienen diferentes requerimientos para activarse que las células de tipo Th2.

- **Microambiente de citocinas:** A pesar de todos los factores antes mencionados, actualmente hay un consenso general que reconoce que el principal estímulo para la polarización de la respuesta inmune hacia el tipo Th1 o Th2 son las citocinas. Se reconoce que las citocinas, por sí mismas determinan la diferenciación de las células vírgenes y probablemente de memoria. Aunque son varias las citocinas que intervienen en la respuesta inmune, ya sea del tipo Th1 o Th2, hay un completo acuerdo que tanto para ratones como para humanos la presencia de la interleucina 12 (IL-12), la cual es sintetizada principalmente por células presentadoras de Ag, como macrófagos, monocitos y células dendríticas (Magrath et al. 1996), promueve la diferenciación de las células Th0 hacia Th1 porque estimula la secreción de IFN- γ por las células T activadas por un antígeno. Y que la presencia de interleucina 4 (IL-4) induce la diferenciación hacia el tipo Th-2 (Afonso, et al. 1994), ya que regula de manera negativa la respuesta Th1 de manera indirecta, dado que afecta la

función de las células presentadoras de Ag (Pearlman, 1993). Tanto la IL-12 como la IL-4, parecen ser las citocinas mas importantes que regulan la diferenciación hacia alguno de los subtipos celulares, si es que están presentes tempranamente en una respuesta inmune (Nichoison y Kuchroo 1996).

3) Taenia crassiceps

Características generales. La cisticercosis generada por *Taenia solium* es frecuente en México y en otros países en vías de desarrollo (Larralde et al 1992). En los últimos años se han incrementado de manera importante las investigaciones sobre esta enfermedad. Sin embargo, trabajar directamente con los hospederos naturales de *T. solium* (humanos y cerdos) es difícil y costoso, por lo que ha recurrido a otras especies de metacéstodos que infectan a hospederos de manejo fácil lo cual genera modelos experimentales que permiten estudiar más detalladamente los factores biológicos que pudieran intervenir en la interacción hospedero-parásito (los mecanismos de susceptibilidad o protección a la cisticercosis). Se ha adoptado como modelo de *T. solium*, a la cisticercosis experimental murina causada por el metacéstodo de *Taenia crassiceps* (Esquema 1).



Esquema 1.- Ciclo de vida de *Taenia crassiceps* (Larralde et al. 1989)

En este modelo, el ratón alberga al cisticerco en la cavidad peritoneal como una infección crónica causando poca inflamación en la superficie intestinal, semejante a la que se presenta en el estado tardío de la enfermedad causada por *T. solium* en las meninges basales del hombre, sin causar daño a las estructuras

vecinas del hospedero, únicamente ocupando cierto espacio provocando escasa inflamación (Larralde et al. 1989, 1992).

El ciclo de vida de *T. crassiceps* es parecido al de *T. solium* (Esquema 1), requiere de un hospedero intermediario como es el ratón (cerdo para *T. solium*) y otro definitivo como es el zorro (humano para *T. solium*) en el cual lleva a cabo su reproducción sexual. A diferencia de *T. solium*, *T. crassiceps* también tiene la capacidad de reproducirse por gemación en el peritoneo del ratón.

Inmunología de *T. crassiceps*. Los estudios que se han llevado a cabo sobre la respuesta inmune en contra del metacéstodo de *T. crassiceps* indican que existe una clara participación de la respuesta inmune celular en el control de esta parasitosis. Aunque el hospedero es capaz de establecer una RI humoral específica en contra de los antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* (Chernin et al. ; 1977), ésta es insuficiente para la protección (Good y Miller en 1976, Sciutto y cols. 1991). Sin embargo, la participación de la respuesta inmune celular es de mayor importancia. Existen estudios donde la respuesta inmune celular fue estimulada con ciclofosfamida lo cual indujo una carga parasitaria menor. Por el contrario, cuando los ratones fueron timectomizados, la respuesta inmune celular disminuyó, mientras que la susceptibilidad al parásito aumentó significativamente. Esto fue corroborado cuando a los ratones se les transfirieron células esplénicas inmunes ricas en linfocitos T y los animales tuvieron una carga parasitaria significativamente menor (Bojalil et al., 1993). Este último punto llevo a investigar la participación de las subpoblaciones Th1 y Th2 en esta parasitosis, y actualmente se sabe que en la infección causada por *T. crassiceps* existe un desplazamiento gradual de una respuesta tipo Th1 hacia una tipo Th2. Es decir durante la infección temprana (una semana) existe una alta respuesta a mitógenos de células T (estimuladas con Concanavalina A), una alta producción de IL-2 e IFN- γ , mientras que no existe producción de IL-4, IL-6, ni de IL-10, lo que se considera una clásica respuesta tipo Th1. En la cuarta semana de infección se han encontrado interleucinas de ambos subtipos celulares (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ e IL-10). Sin embargo, a partir de la octava semana post-infección, la respuesta inmune contra *T. crassiceps* está completamente dominada por interleucinas características del tipo Th2 y una alta producción de anticuerpos específicos de subclase IgG1 (Figura 1 ;Terrazas, et al., 1998.).

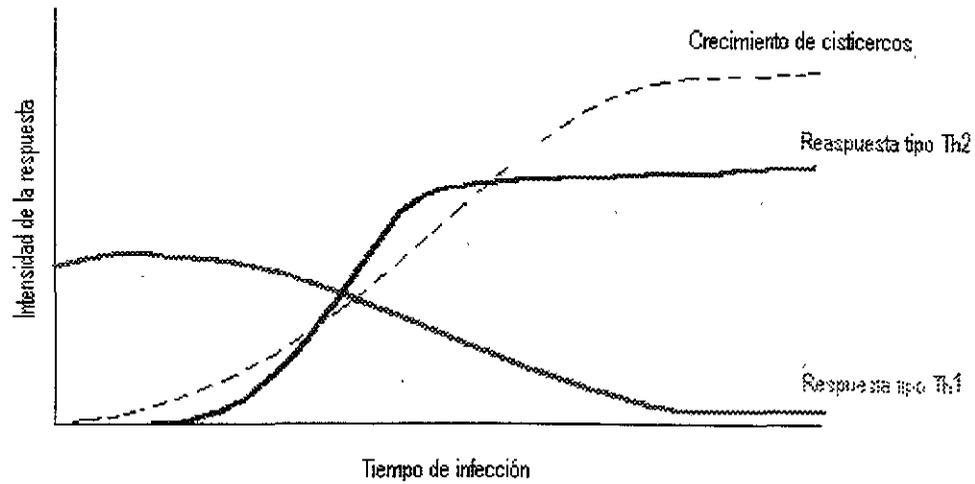
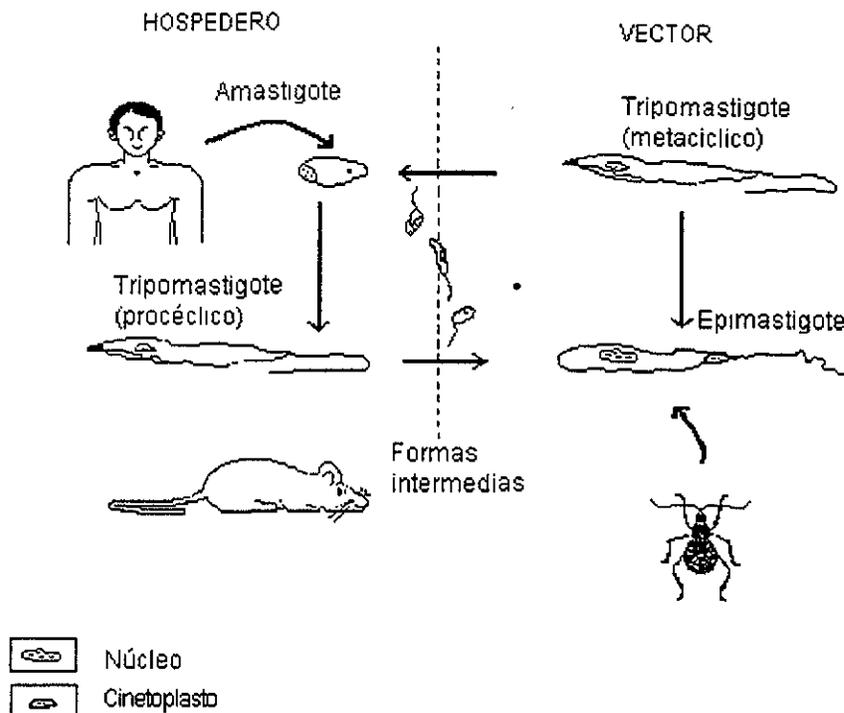


Figura 1 - Representación de la polarización de la respuesta inmune en ratones BALB/c infectados con *Taenia crassiceps* (Terrazas et al. 1998).

4) *Trypanosoma cruzi*

Características generales. La tripanosomiasis Americana, mejor conocida como enfermedad de Chagas ha sido registrada desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y representa un problema de salud pública en Brasil, Argentina, Venezuela, Bolivia, Chile, Perú, Uruguay, y probablemente en México, Paraguay, Panamá, Colombia, Ecuador y el Salvador. La enfermedad es causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo flagelado de la familia de Trypanosomatidae, subgénero Schizotrypanum. Una parte de su ciclo vital ocurre en artrópodos y otra parte en vertebrados (Esquema 2). Generalmente la infección por *T. cruzi* se transmite por picadura de chinches, aunque también existe la posibilidad de infección por transfusión de sangre proveniente de un donador chagásico. El *Trypanosoma cruzi* penetra por la piel o por la superficie de las mucosas, frecuentemente causa una reacción inflamatoria en el sitio de entrada, pero casi inmediatamente invade el torrente sanguíneo caracterizándose por un gran incremento en la replicación parasitaria (lo cual puede ser monitoreada en la sangre de los individuos infectados). A este período de la infección se le conoce como fase aguda. La fase crónica viene después, cuando la infección está bien establecida, puede ser asintomática o presentar una serie de signos y síntomas relacionados con cardiomiopatía o dilatación irreversible del esófago o colon (Tarleton, 1991).



Esquema 2.- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

La infección en murinos ha sido extensamente usada como modelo experimental de la enfermedad ya que no existen prácticamente diferencias con la patología presentada en humanos, además de que ofrece la ventaja de que las cepas singénicas de ratones pueden ser divididas o clasificadas como genéticamente resistentes o susceptibles basándose en su habilidad para controlar la infección, ya sea en el nivel de parasitemia o por su letalidad. Dos claros ejemplos de esto son la cepa BALB/c y la C57BL/6 reconocidas como susceptible y resistente para *T. cruzi* respectivamente.

Inmunología de *T. cruzi*. La respuesta humoral parece no tener una clara participación en el control de esta parasitosis, los anticuerpos contra *T. cruzi* se han encontrado altos en todos los estados de la infección y persisten a través de la fase crónica; la distribución de los isotipos permanece invariable a lo largo del curso de la infección; se caracteriza por la predominancia de IgG2a y en menor grado de IgG2b e IgG1, y al parecer no hay ninguna diferencia en la distribución entre las cepas resistentes y susceptibles. Por el contrario se cree que la continua permanencia de células B estimuladas generadas por la infección de *T. cruzi* puede tener importantes consecuencias en la patología de la enfermedad de Chagas (D'Imperio Lima et al. 1985). Por otro lado, al igual que en otras parasitosis, la respuesta inmune celular parece participar de manera importante en el control de esta infección (Hunter, 1996). A diferencia de otras infecciones parasitarias, en la infección por *T. cruzi* no está claramente definida la predominancia de alguno de los dos perfiles de citocinas, ya que durante la fase aguda de la infección, así como durante la fase crónica es posible detectar citocinas de ambos tipos (IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , o TGF- β), con excepción de que tanto en humanos como en animales del laboratorio infectados con *T. cruzi* la capacidad para producir IL-2 está disminuida (Cardillo et al., 1996). Existen algunos reportes que indican que el IFN- γ es un importante mediador de la resistencia a *T. cruzi*, se ha visto en modelos murinos que la administración de IFN- γ recombinante incrementa la resistencia, mientras que la neutralización de la producción endógena del IFN- γ incrementa la susceptibilidad en la fase aguda de la infección (Christoph et al., 1998). Esto está reforzado por otros estudios donde se ha visto que las cepas de ratones susceptibles a la infección por *T. cruzi* muestran una aparente disminución de las citocinas tipo Th1 (IFN- γ) después de 45 días y una temprana aparición de TNF (Zhang and Tarleton, 1996), aunado a otros estudios que dicen que la administración de IL-12, y el incremento de IFN- γ reducen la carga parasitaria y alargan el tiempo de sobrevivencia en los ratones infectados (Hunter et al., 1996). A pesar de que las evidencias demuestran que la participación de la respuesta tipo Th1 puede ser la responsable de inducir "protección", esto no puede dogmatizarse, dado que hasta ahora no hay reportes de un solo caso donde la inducción de una respuesta tipo Th1 haya resuelto completamente la infección.

5) Justificación

Las infecciones por helmintos son comunes en los países en vías desarrollo, los individuos que crecen en condiciones de higiene inadecuadas están permanentemente expuestos a este tipo de infecciones. Además, no es raro que estos mismos individuos tengan también infecciones originadas por parásitos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium sp.*, y *Trypanosoma cruzi*. Esta coexistencia natural de dos o más infecciones implica la posibilidad de que la presencia de una primera infección pueda afectar la resistencia a infecciones subsecuentes. Esto se explicaría por ejemplo si el ambiente inmune generado por la primera infección no permitiera establecer los mecanismos protectores en contra de una segunda infección, como probablemente sucede al predominar alguna de las respuestas inmunes, ya sea del tipo Th1 ó Th2. Si consideramos que una de las características de los helmintos, es que inducen infecciones crónicas y, casi por regla general, cuando se hacen crónicas, inducen respuestas inmunes de tipo Th2 (Actor et al, 1993; Hermanek, 1993; Svetic et al., 1993) creemos que las infecciones por helmintos pueden tener implicaciones epidemiológicas importantes debido a que podrían modificar el patrón de citocinas de la respuesta inmune y podrían modificar la susceptibilidad a otros agentes patógenos, en los cuales se requiera una respuesta protectora de tipo Th1, como es el caso para *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Mycobacteria* (Louis, 1993) ó disminuir la susceptibilidad a aquellos en contra de los cuales se requiere de una respuesta protectora tipo Th2, como es el caso para *Trichuris* (Bancroft, 1994). Esto es así al menos en experimentos con ratones donde se ha reportado que el preestablecimiento de una respuesta Th2 inducida por una infección con *Brugia malayi* es capaz de alterar la respuesta *in vitro* de las células TCD4⁺ al PPD, que normalmente induce una respuesta de tipo Th1 (Pearlman et al., 1993), y en la infección en ratones con *Schistosoma mansoni*, en donde la polarización de la respuesta inmune hacia Th2 afecta su capacidad de respuesta a antígenos no relacionados como son el Ag de VIH glycoproteína 160 y la mioglobina de esperma de ballena (Actor et al., 1993; Kullberg et al., 1992), así como su capacidad para eliminar al virus vaccinia (Actor et al., 1993). Por el contrario, esta misma infección, aumenta la resistencia de los ratones a otro helminto (*Trichuris muris*) en contra del cual una respuesta dependiente de Th2 es protectora (Bancroft, 1994; Curry et al. 1995). Estos ejemplos son algunas evidencias de que el microambiente de citocinas generado por una infección previa puede modificar la respuesta inmune a un segundo reto antigénico. Sin embargo, esta posibilidad no se había explorado directamente ya que en ninguno de los casos se probó *in vivo* cómo un ambiente dinámico de citocinas puede alterar paulatinamente la RI y la susceptibilidad a un parásito no relacionado. El entendimiento de estos mecanismos inmunes puede ayudar al desarrollo de vacunas y a la comprensión de la regulación inmunológica de infecciones crónicas.

6) Planteamiento del estudio

El fenómeno de polarización de la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado, gracias al uso de modelos animales en la interacción hospedero-parásito. La ventaja de utilizar parásitos para el estudio de la regulación de la respuesta inmune, es que éstos, al contrario de los otros patógenos tienden a causar infestaciones crónicas, de tal forma que el estudio de la regulación de la respuesta inmune ante un parásito puede llevarse a cabo desde el inicio de la infección experimental, durante el transcurso de la misma, en el momento de la eliminación del patógeno, o bien cuando la infección parasitaria se ha hecho crónica.

Aprovechando el modelo murino de cisticercosis generada por *T. crassiceps*, donde se desarrollan de manera secuencial los dos tipos de respuestas inmunes dependientes de CD4⁺ (Th1 ó Th2), se buscó establecer si esta infección persistente en ratones BALB/c afecta la susceptibilidad a una infección posterior por un parásito intracelular como *Trypanosoma cruzi*.

Tomando en cuenta que la infección por *T. crassiceps* induce durante las dos primeras semanas un perfil tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ), que cambia paulatinamente, observándose alrededor de la 4a semana un perfil mixto Th1/Th2, y posteriormente desde la 8a semana un perfil tipo Th2 (IL-4 e IL-10) (Fig. 1 ; Terrazas, et al., 1998), exploramos si estas modificaciones en el perfil de citocinas podrían influir sobre la RI y la susceptibilidad a una segunda infección no relacionada (*T. cruzi*). Para esto, ratones BALB/c fueron infectados con *T. crassiceps*, y dos, cuatro, ocho y doce semanas después fueron coinfectados con *T. cruzi*.

El impacto de la infección previa sobre la susceptibilidad a *T. cruzi* y sobre la respuesta inmune inducida por este protozooario, se estudió determinando: **a)** los niveles del parásito en sangre, **b)** la proliferación de linfocitos de bazo, **c)** la producción de citocinas (IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-10, e IL-4) en respuesta a Con A y un extracto soluble de *T. cruzi*, y **d)** la producción de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* de los isotipos IgG2a (marcadores de Th1), IgG2b e IgG1 (marcadores de Th2).

HIPOTESIS

Una infección crónica por helmintos que genera un microambiente de citocinas tipo Th2 afecta significativamente la capacidad de sus hospederos para responder adecuadamente a retos subsecuentes por patógenos en contra de los cuales se requiere de una respuesta protectora tipo Th1 o mixta (Th1/Th2).

OBJETIVOS

General

Definir si el perfil de citocinas generado en el hospedero por una infección inicial es capaz de modificar la respuesta inmune en contra de otra infección no relacionada.

Particulares

1) Demostrar si una infección persistente causada por un parásito extracelular (*Taenia crassiceps*) en ratones BALB/c afecta la susceptibilidad a una infección posterior por un parásito intracelular como *Trypanosoma cruzi*.

2) Investigar la posibilidad de disminuir la susceptibilidad de una cepa murina (BALB/c) al protozooario *Trypanosoma cruzi*, cuando el hospedero presenta una producción de interleucinas pertenecientes a una respuesta mixta tipo Th1/Th2.

3) Definir si se genera una mayor susceptibilidad a *Trypanosoma cruzi* en la cepa murina BALB/c, cuando el hospedero presenta una alta producción de citocinas características de la subpoblación Th2, por la presencia previa de un parásito (*T. crassiceps*) que las induce.

5) Determinar *in vitro* si el extracto antigénico de *Trypanosoma cruzi* induce respuestas diferentes, cuando las células del hospedero provienen de animales infectados con T cruzi poco tiempo después de la infección con *T. crassiceps* (coinfección temprana) ó cuando provienen de un coinfección tardía.

MATERIAL Y METODOS

Animales. Se utilizaron ratones hembras BALB/c (susceptibles a *T. crassiceps* y *T. cruzi*) y C57BL/6 (susceptibles a *T. crassiceps* y resistentes a *T. cruzi*) con edades de 6-8 semanas.

Parásitos. Se utilizó el modelo experimental murino del cisticerco de *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*), cepa ORF (crecimiento rápido), los cuales han sido mantenidos en ratones BALB/c por subsecuentes pasajes i.p. Para la infección, los cisticercos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal del ratón y lavados cuatro veces en PBS y seleccionados para inocularlos en los ratones (2 mm de diámetro, sin gemas). También se utilizaron tripomastigotes sanguíneos del protozooario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), cepa Ninoa. Estos parásitos fueron obtenidos de un paciente mexicano en 1978 y se han mantenido en ratones BALB/c por subsecuentes pases i.p.

Infeccion y co-infeccion con *T. crassiceps*-*T. cruzi*. Los ratones hembras fueron inoculados con diez cisticercos de *T. crassiceps* por vía i.p, con jeringa de 1 ml para insulina y usando como vehículo 0.3-0.4 ml de PBS. Después de dos, cuatro, ocho o doce semanas de infección, estos mismos animales fueron coinfectados por vía i.p. con 1000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Ninoa, usando para este caso como vehículo solución Alsever.

Colateralmente a los grupos de animales coinfectados, como controles se usaron ratones sanos de la misma edad que solo fueron infectados i.p. con 1000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* y fueron mantenidos en las mismas condiciones del bioterio. En ellos, al igual que en los coinfectados se evaluó el desarrollo de la parasitemia cada semana durante 60 días.

Evaluación de la cinética de parasitemia por *T. cruzi*. El desarrollo de la parasitemia por *T. cruzi*, se evaluó por un proceso que consistió en obtener 5 µl de sangre de la cola del animal infectado y diluirlos 1:50 en una solución de Alsever, de esta dilución se tomaron 10 µl para contar directamente el número de parásitos en una cámara de Neubauer en los cuadrantes para leucocitos. El número de parásitos por ml de sangre se obtuvo desarrollando la fórmula.

$$\frac{\text{No. de parásitos} \times \text{la dilución (1:50)}}{0.1 \times \text{No. de cuadrantes contados}} = \frac{\text{No. Parásitos}}{\text{mm}^3}$$

Extendidos de sangre. De cada animal se tomó una gota de sangre y se extendió sobre un portaobjetos limpio para determinar las características morfológicas de cada tipo celular y evaluar la frecuencia relativa de los distintos leucocitos, se dejó secar la laminilla y se fijó con alcohol metílico absoluto durante 3 minutos. Se tiñó con colorante de Wright (0.0016 g/ml en alcohol metílico absoluto libre de acetona), por tres minutos, se agregó un volumen igual de PBS por 5 minutos, se lavó el portaobjetos con agua corriente.

Se determinó el número de eritrocitos, leucocitos y eosinófilos, en las diferentes muestras que fueron tomadas a los 9, 27 y 60 días en todos los animales.

Antígenos de *T. cruzi*. Para la obtención de antígenos proteicos de *T. cruzi*, se cultivó a este parásito *in vitro* en medio LIT a 36 °C sin agitación, durante 2 semanas. Posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm para eliminar el medio de cultivo, se lavaron 2 veces con PBS hasta que el botón de parásitos quedó claro. El botón se resuspendió en 2ml de PBS con inhibidores de proteasas (Aprotinin, EDTA, PMSF, Pepstatin y TLCK, Sigma) y los parásitos fueron sonicados (sonicador Biospec Products) en tres intervalos de 5 min cada uno, con una intensidad de 400 Watt. Se revisó al microscopio la destrucción del parásito. El producto del sonificado se centrifugó a 10 000 rpm por 30 minutos para separar el sobrenadante que fue utilizado como una mezcla de antígenos solubles. La concentración proteica del sobrenadante fue determinada por el método de Lowry (Lowry et al, 1951).

Determinación de anticuerpos en suero. Se obtuvo sangre a través del plexo retroorbital, previa anestesia de los animales con éter. La sangre se dejó coagular a 37 °C durante 1 h, se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm y se extrajo el suero, que se congeló a -20 °C hasta su uso. El suero de cada animal se procesó individualmente para evaluar niveles de IgG1, IgG2a e IgG2b específicas contra antígenos de *T. cruzi* y *T. crassiceps* por un ensayo de ELISA - indirecto. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pozos (Corning) con 0.5mg de antígeno soluble (de *T. cruzi* ó de *T. crassiceps*) en un buffer de Tris .075 M (pH 7.8), se incubaron estas placas toda la noche a 4 °C, posteriormente se lavaron dos veces con PBS-Tween (PBS-T) y se bloquearon con PBS-BSA 3% durante dos horas. Se lavaron dos veces con PBS-T y se colocaron por duplicado los estándares y los sueros de los distintos grupos de animales diluidos 1:100 en PBS-BSA 1%, 100 µl/pozo, y se incubaron 1 h a 37 °C. Se lavaron cuatro veces las placas y se pusieron 100 µl por pozo de los anticuerpos monoclonales diluidos en PBS-BSA al 1% 1/1000, 1/1500 y 1/1000 respectivamente contra los

isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b (Zymed) marcados con peroxidasa, se incubaron las placas nuevamente 1 h a 37 °C. Por último, las placas se lavaron 6 veces y se revelaron con el sustrato ABTS (Zymed) durante 30 minutos y se leyeron en lector de placas de ELISA (Metertech, Sigma 960) a 405 nm.

Linfoproliferación *in vitro*. Inmediatamente después de obtener la sangre de los ratones, estos fueron sacrificados por dislocación cervical. En condiciones de esterilidad se obtuvo el bazo de cada uno de los animales, se obtuvieron las células linfoides por la técnica de perfusión, inyectando 5 ml de Solución de Hanks fría a través del bazo; las células se depositaron sobre una caja petri, donde se dejaron reposar para eliminar por sedimentación posibles fragmentos de tejido. Los eritrocitos se eliminaron con un choque osmótico con NH₄Cl durante 3 minutos a 1500 rpm, posteriormente las células se lavaron tres veces con Hanks frío por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min. Se resuspendieron en 1 ml de medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino/estreptomomicina, 1 % de aminoácidos esenciales, 25 mM de buffer Hepes, y 0.5 % de L- Glutamina (todo marca Gibco). Se tomaron 20 µl de esta suspensión celular para determinar el número total y viabilidad por exclusión del colorante vital azul tripano en cámara de Neubauer. Las células se ajustaron a 5,000,000/ml y se sembraron 100 µl de cada muestra por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos (Costar). Posteriormente, fueron estimuladas con 100µl de una solución de 2 µg/ml de Con-A (Sigma) disuelta en una solución saturada de NaCl, esterilizada por filtración y cuantificada por coeficiente de extinción con luz ultravioleta a 280 nm (ó antígeno de *T. cruzi*, 12.5 µg/ml). Las placas fueron incubadas a 37 °C en 5% de CO₂ durante 72 h. Durante las últimas 18 h de cultivo las células fueron marcadas con 0.5 µCi de timidina tritiada ([H³] TdR New England Nuclear) en 10 µl de medio RPMI suplementado. Posteriormente, las células fueron cosechadas en papel fibra de vidrio (Whatman), y procesadas para determinar la incorporación de radiactividad en las células estimuladas y en los controles. El nivel de estimulación fue determinado mediante la fórmula : *cpm de las células estimuladas – menos - cpm de las células no estimuladas*.

Producción *in vitro* de citocinas. Se utilizó una fracción de las mismas células esplénicas obtenidas para la proliferación. Brevemente, se sembraron 5 x 10⁶ cels/pozo en placas de 24 pozos (Costar), fueron estimuladas con 2 µg/ml de Con A (ó con 25 µg de Ag soluble de *T. cruzi*). Las placas fueron incubadas a 37 °C , 5 % CO₂ y 19 % de humedad. Después de 48 h de cultivo se cosechó 1 ml del sobrenadante (SN) de cada cultivo (para las células estimuladas con antígeno se cosecharon a las 72 h). Estos SN se centrifugaron a 3000 rpm., durante 10 min, para eliminar células del cultivo. Una vez separadas

las células y en condiciones de esterilidad, los sobrenadantes fueron congelados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la posterior determinación de las citocinas.

Detección y evaluación de citocinas. Interleucina-2.- Se evaluó a través de un bioensayo en células dependientes de esta interleucina. Brevemente, se utilizaron 1×10^4 células de la línea CTLL-2 en $100\text{ }\mu\text{l}$ de RPMI suplementado. Se agregaron alícuotas de $25\text{ }\mu\text{l}$ de los sobrenadantes de cultivos. Se incubaron durante 48 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 y 19% de humedad. Ocho horas antes de la finalización del cultivo, las células se marcaron con $[\text{H}^3]$ TdR, se cosecharon en papel de fibra de vidrio (Whatman) y fueron procesadas en un contador de centelleo (beta-plate) para determinar la incorporación de radioactividad en las células estimuladas y en las controles (no estimuladas). Para determinar la especificidad de la IL-2 sobre el crecimiento celular observado, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-IL-2 y anti-IL-4 (Pharmingen). Los valores fueron obtenidos en U/ml después de extrapolarlos sobre valores obtenidos de una curva dosis-respuesta de IL-2 recombinante murina (Pharmingen).

IL-4, IL-10, IL-12 e IFN- γ . Todas estas citocinas fueron evaluadas en los sobrenadantes de los cultivos por medio de la técnica de ELISA-Sandwich. Las placas de 96 pozos (High binding, Costar) se sensibilizaron con $50\text{ }\mu\text{l}$ por pozo del anticuerpo de captura (purified anti-mouse IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12) diluido en buffer de bicarbonato de Na 0.1 M pH 8.2, concentración $2\text{ }\mu\text{g/ml}$. Se dejaron incubar toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrida la incubación se lavaron dos veces con PBS-Tween 0.05 % (PBS-T). Posteriormente se bloqueó con PBS-BSA 3% ($100\text{ }\mu\text{l}$ por pozo), se incubaron dos horas a temperatura ambiente. Después de lavarse dos veces con PBS-T, se procedió a poner la curva de interleucinas (con IL recombinante murina) por duplicado en los primeros pozos de la placa. (La curva se comenzó con una concentración de 2000 pg/ml y se fueron haciendo diluciones a la mitad, (ocho pozos por lo menos), a los pozos restantes de la placa se le pusieron $50\text{ }\mu\text{l}$ de PBS-BSA, para después agregar por duplicado $50\text{ }\mu\text{l}$ de las muestras de los sobrenadantes (dilución 1:2). Se incubaron toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la incubación se lavaron cuatro veces con PBS-T. Se agregó el segundo anticuerpo (biotinilado) en PBS-BSA a una concentración de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ y se agregó a cada pozo $100\text{ }\mu\text{l}$. Se incubaron a temperatura ambiente por 45 min. Una vez transcurrida la incubación se lavaron seis veces con PBS-T. y se agregó a cada pozo $100\text{ }\mu\text{l}$ de streptoavidina/peroxidasa diluida 1:1500 en PBS-BSA al 1%. Se incubó a temperatura ambiente 30 min, se lavó ocho veces con PBS-T y se reveló por 30 minutos con el sustrato para peroxidasa ($100\text{ }\mu\text{l}$ por pozo). Se paró la reacción con $50\text{ }\mu\text{l}$ de ácido sulfúrico 4 N y se leyó en el lector de ELISA (Mertertech, S 960) a 490 nm .

Detección de óxido nítrico (NO). La detección de óxido nítrico se realizó en todos los sobrenadantes de las células de bazo que se probaron para las interleucinas. El ensayo consiste en preparar dos soluciones por separado, sol. A y sol. B. (**Sol. A** 0.1 % naphthylethylenediamine dihydrochloride en agua destilada y **Sol. B** sulphaniilamide en 5 % en H₃PO₄ concentrado al 5%). Poco antes de realizar en ensayo, se mezclaron la sol. A y B a igual volumen, para tener el reactivo de Griess. En una placa de 96 pozos se colocó una curva de nitrito de sodio óxido (NaNO₂) como control y referencia para extrapolar las concentraciones, se agregaron 100 µl por cada pozo por duplicado de las diferentes concentraciones que van diluidas al doble (0.01, 0.005, 0.0025, 0.00125, 0.000625, 0.000315 M), para las muestras también se colocan 100 µl del sobrenadante celular y 70 µl del reactivo de Griess. Se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se midió a 550 nm-620 nm en un lector de ELISA (Metertech S 960).

Análisis estadístico. Las comparaciones entre los diferentes grupos considerados en este trabajo se llevaron a cabo mediante U de Mann-Whitney. Se consideraron significativas las comparaciones con valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Modificación de la parasitemia. Con el propósito de estudiar si el estado inmune generado por una infección persistente causada por un helminto puede modificar la susceptibilidad a otro parásito no relacionado, se infectaron intraperitonealmente ratones de la cepa BALB/c con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* (helminto), después de 2, 4, 8 ó 12 semanas de iniciada esta infección se determinó la evolución de la parasitemia (número de cisticercos), la capacidad de proliferar y el perfil de citocinas de las células de bazo en respuesta a Con A y los niveles séricos de anticuerpos específicos generados por la infección. En la tabla 1 pueden observarse estos resultados, dos semanas después de la infección se observó una respuesta inmune con un perfil de tipo Th1, niveles altos de IL-2, de IFN- γ , y de IgG2a. A las cuatro semanas de infección el perfil no está claramente definido, pareciera una respuesta de tipo mixto (presencia similar de citocinas de tipo Th1 y Th2), pero a las semanas ocho y doce se observó una clara polarización de la respuesta inmune hacia un perfil de tipo Th2 con niveles incrementados de IL-4 y de IgG1 y niveles bajos de IL-2, de IFN- γ y de IgG2a. La semana de infección 0 representa al grupo control de ratones que no fueron infectados.

Sem infec.	No. parásitos	Respuesta a Con-A	Producción de citocinas (pg/ml)			Producción de anticuerpos	
		(cpm)	IL-2	IFN- γ	IL-4	IgG2a	IgG1
0	--	118165 \pm 15466	964 \pm 243	1430 \pm 280	420 \pm 24	0.003	0.013
2	4.2 \pm 1.8	94522 \pm 7442	1047 \pm 64	1126 \pm 138	421 \pm 21	0.435	0.131
4	153.3 \pm 53	59015 \pm 6358	568 \pm 87	464 \pm 28	468 \pm 18	0.164	0.346
8	440.2 \pm 117	10818 \pm 1567	200 \pm 22	539 \pm 49	641 \pm 72	0.093	1.500
12	1308 \pm 327	4892 \pm 1259	72 \pm 22	254 \pm 38	1104 \pm 98	0.028	2.200

Tabla 1.- Estado inmune en los ratones infectados con *Taenia crassiceps*. La producción de citocinas en respuesta a Con A y la producción de anticuerpos específicos a *T. crassiceps* se hizo por ELISA, en sobrenadante de células de bazo y en suero respectivamente. Los valores representan el promedio y el SE; n= al menos 6 ratones por grupo. El SE en la producción de anticuerpos fue menor al 10%.

Los mismos animales fueron coinfectados intraperitonealmente con 1000 tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ninoa, a las 2, 4, 8 y 12 semanas de iniciada la infección con *T. crassiceps*, es decir, cuando se observó una respuesta inmune de tipo Th1, mixta (Th1/Th2) y tipo Th2 inducida por la presencia previa de *T. crassiceps*. La evolución de la segunda infección (*T. cruzi*) se evaluó semanalmente durante 60 días. En la fig.2 se observa cómo la susceptibilidad a *T. cruzi* se modifica por la presencia de la infección previa con el

cisticerco de *T. crassiceps*. La modificación en la susceptibilidad a *T. cruzi* varió en función de la cronicidad de la primera infección. Cuando la coinfección con *T. cruzi* se efectuó a las 2 y 4 semanas después de la primera infección (*T. crassiceps*), la curva de parásitos de *T. cruzi* tuvo un retraso de una semana en su inicio, pero ésta alcanzó niveles máximos indistinguibles de la de los ratones control al día 27 (sólo infectados con *T. cruzi*). Cuando la infección por *T. cruzi* se efectuó a las 8 y 12 semanas después de la infección por *T. crassiceps*, los ratones tuvieron un dramático incremento en la susceptibilidad a *T. cruzi*, que resultó significativo desde el día 14 hasta el día 32 de la parasitemia. En el día 24 por ejemplo, las diferencias tienen $p=0.004$ y $p=0.005$ respectivamente con respecto al control.

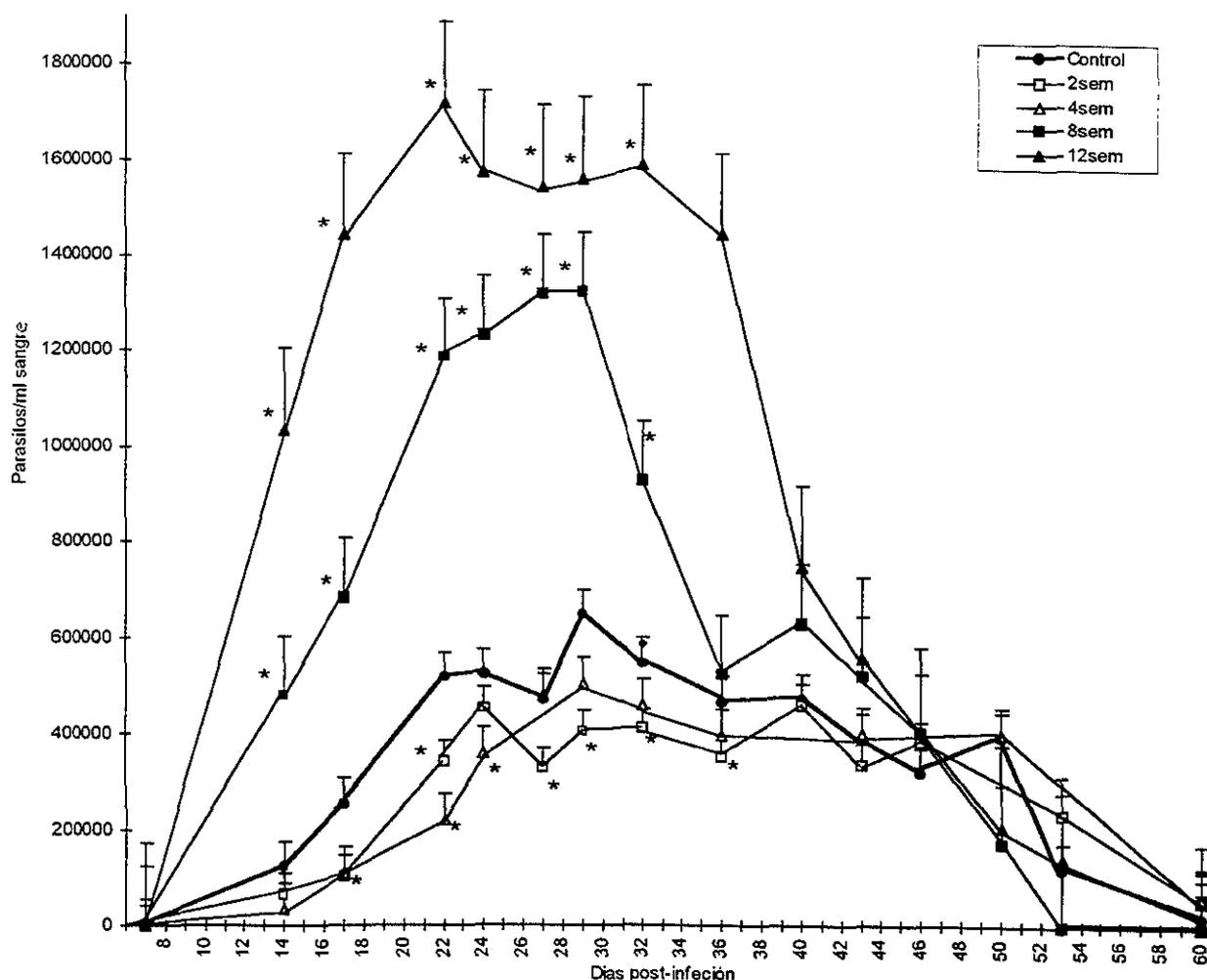


Figura 2.- Cinética de la parasitemia por *T. cruzi*. La curva indicada como control —○— corresponde a los animales infectados únicamente con *T. cruzi* y es el punto de referencia o comparación para cada uno de los tiempos de coinfección estudiados. Cuando la infección de *T. cruzi* se inició a la segunda semana —□— ; a la cuarta semana —△— ; a la octava semana —■— y a la decimosegunda semana —▲— después de la infección con *T. crassiceps*. Los datos ilustrados aquí representan el promedio \pm ES de al menos 9 ratones por grupo en cada punto de la cinética, * $p < 0.05$ con respecto al control.

Respuesta proliferativa de los linfocitos de bazo a Con A. Con el fin de examinar la respuesta inmune celular en los distintos grupos de animales, linfocitos obtenidos de bazo en 3 momentos importantes de la parasitemia por *T. cruzi* (a los días 9, 27 y 60) fueron estimulados con concanavalina A (Con A) y un extracto antigénico soluble de *T. cruzi*, para posteriormente medir la respuesta proliferativa por incorporación de [3]TdR.

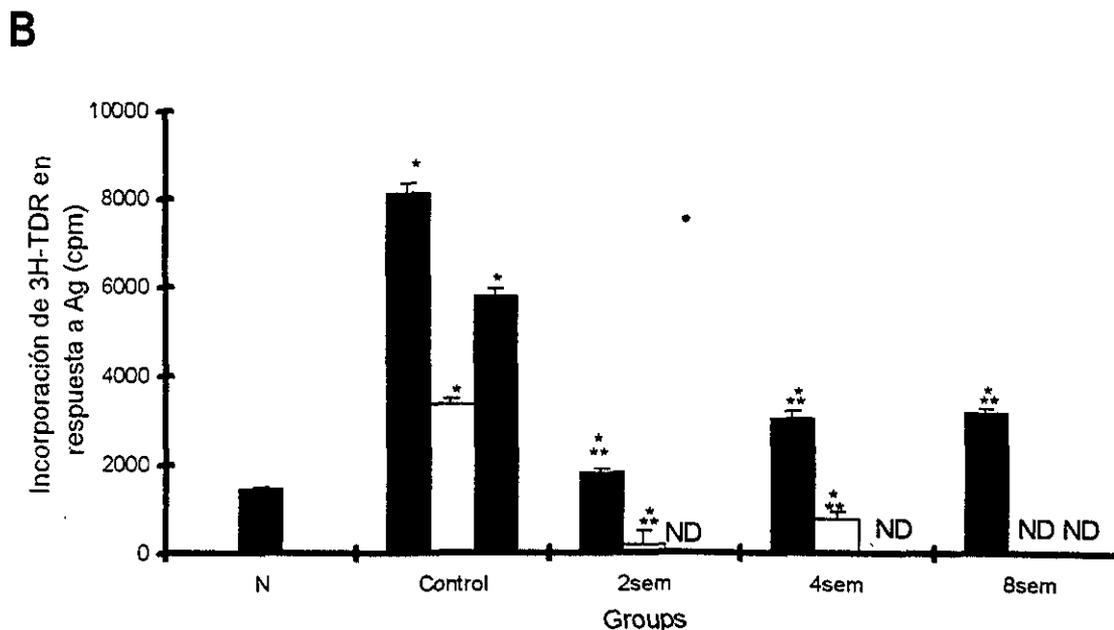
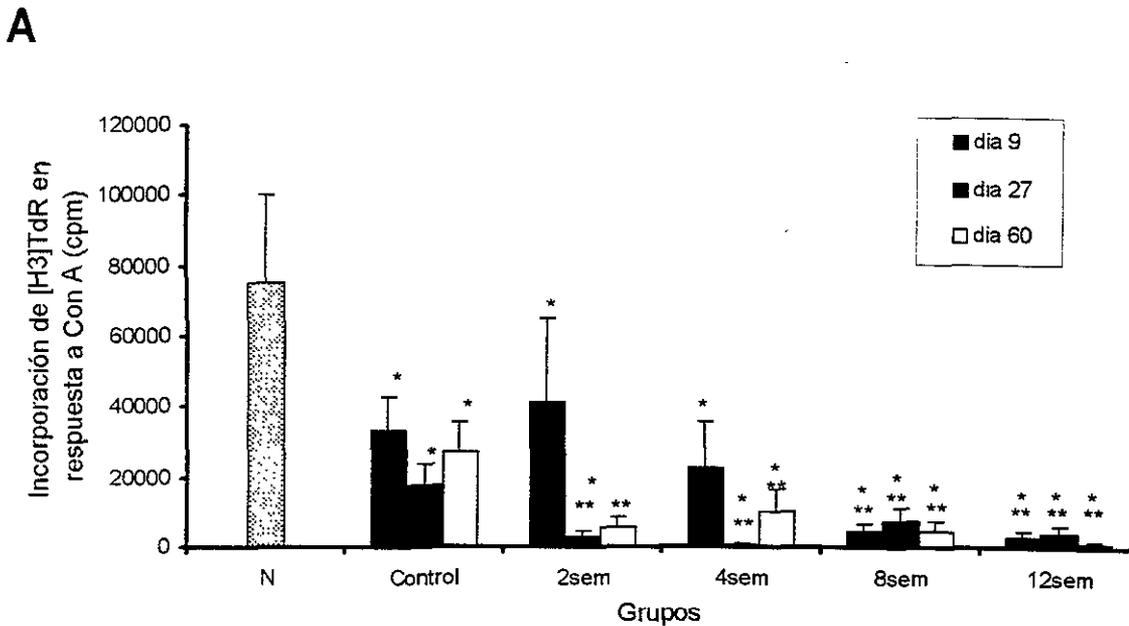


Figura 3.- La respuesta proliferativa (A) Con A ; (B) Ag soluble de *T. cruzi* . Se aislaron los linfocitos de bazo de ratones sanos, N; infectados únicamente con *T. cruzi* Control ; infectados con *T. crassiceps* y coinfectados con *T. cruzi* a la 2sem ; 4sem ; 8sem y 12sem . Las barras representan el momento en el que se efectuó la determinación con respecto a la infección de *T. cruzi*, a los 9 \blacksquare ; 27 \blacksquare ; y a los 60 días \square . La tasa de proliferación se evaluó por incorporación de [3]TdR. Las barras representa el promedio y el ES de al menos 9 animales por grupo, * $p < 0.05$ con respecto a N, ** $p < 0.05$ con respecto al Control.

En la figura 3 A se observa que los linfocitos de ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (control), así como los esplenocitos de los animales coinfectados con *T. crassiceps* y *T. cruzi*, presentaron proliferaciones significativamente menores ($p < 0.05$) que los linfocitos de los ratones sanos, medidos durante el curso de la parasitemia.

Si comparamos la proliferación del grupo control con respecto a los ratones coinfectados en tiempos tempranos (2 y 4 semanas), se observa que estos presentaron en el día 9 una respuesta similar, aunque en los días 27 y 60, la respuesta a Con A disminuyó.

Por otro lado, la respuesta proliferativa de las células de ratones coinfectados tardíamente (a las semanas 8 y 12) fue menor desde el inicio de la parasitemia, con una tendencia a decrecer a medida que la determinación se hacía más tarde. En ambos casos de coinfección (temprana y tardía) la respuesta proliferativa fue significativamente menor en los días 27 y 60 que la de los controles.

La respuesta proliferativa de las células en respuesta al extracto total de *T. cruzi* (Ag), presentó un patrón de distribución muy similar al observado en respuesta a Con A. Las células de los ratones que fueron infectados únicamente con *T. cruzi* (control) presentaron una disminución estadísticamente significativa en tiempos de infección avanzados (figura 3B, día 27 y 60), pero en las coinfecciones tempranas y tardías la disminución en la respuesta proliferativa fue estadísticamente significativa con respecto al control desde tiempos tempranos (figura 3B, día 9 y 27).

Medición de citocinas. Se midió la producción de citocinas por células de bazo estimuladas por Con A y por un extracto soluble de *T. cruzi* de: **a)** ratones normales (N), **b)** infectados sólo con *T. cruzi* (control), **c)** de ratones infectados con *T. crassiceps* y 2 ó 4 semanas después coinfectados con *T. cruzi*, **d)** infectados con *T. crassiceps* y 8 ó 12 semanas después coinfectados con *T. cruzi*. De todos los grupos se hicieron las mediciones de citocinas al inicio (9 días), en el pico (27 días) y al final (60 días) con respecto a la curva de parasitemia de *T. cruzi*. Los resultados de los ratones con coinfectados a las 2 y 4 semanas por un lado y los coinfectados 8 y 12 fueron muy similares, razón por la cual se decidió agruparlos y denominarlos como coinfecciones tempranas y coinfecciones tardías, respectivamente.

Citocinas de una respuesta tipo Th1 :

IL-2. Los resultados obtenidos en la medición de esta citocina en los ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (control) coinciden con reportes previos (Kierzenbaum et al., 1994). En la figura 4 puede observarse que los linfocitos de los ratones control produjeron menos IL-2 en respuesta a Con A en los 3 momentos medidos del curso de la parasitemia ($p < 0.05$) que los animales normales. Cabe hacer notar que el

punto mínimo de la producción de esta citocina coincidió con uno de los niveles más altos de parásitos en la curva de parasitemia (Fig.2, control, día 27) y que la aparente recuperación en la producción de esta citocina en el día 60 coincide con el final de la curva de parásitos, es decir cuando prácticamente desaparecen los tripanosomas de circulación (Fig.2, control, día 60). Los linfocitos de los animales coinfectados, en general, secretaron cantidades aún menores de IL-2 (casi indetectables) que los ratones sólo infectados con *T. cruzi* ($p < 0.05$, fig4).

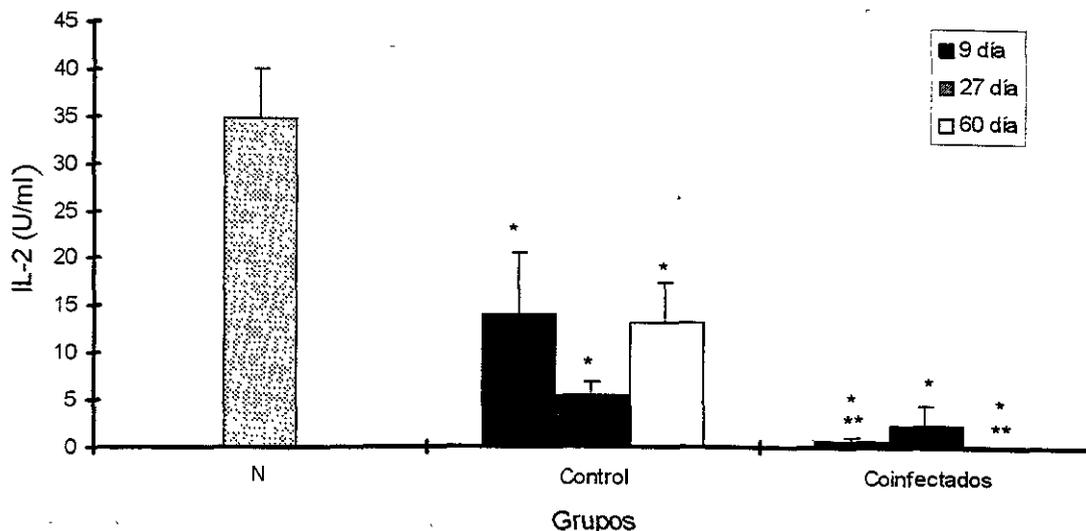


Figura 4. Producción de IL-2. Se aislaron los linfocitos de bazo de ratones sanos (**N**); ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (**Control**); infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi* (**Coinfectados**). Cada barra representa el momento en el que se efectuó la determinación con respecto a la curva de parasitemia de *T. cruzi*, a los 9 días □; a los 27 días □; a los 60 días □. La determinación se hizo por bioensayo con células CTLL-2 a partir de los sobrenadantes de las células de bazo estimuladas con Con A. * $p < 0.05$ con respecto a N, ** $p < 0.05$ con respecto al Control.

Por otro lado, no se detectó producción de IL-2 por las células de bazo en ninguno de los grupos estudiados al estimular con antígeno de *T. cruzi*.

IL-12. Los resultados presentados en la figura 5 muestran que los linfocitos estimulados con Con A, de los animales controles comparados con los ratones normales presentaron una producción disminuida de esta citocina al día 9 y disminuyó aún más al día 27 ($p < 0.05$) de la infección, lo cual coincide con uno de los puntos máximos de la parasitemia (Fig. 2, control día 27). Al día 60 hubo un aumento significativo ($p < 0.05$) con respecto a la producción de esta citocina en ratones normales, es por demás interesante, que se observe una producción mayor de IL-12 en estos animales una vez que los parásitos desaparecieron de la circulación (Fig.5 control, día 60).

Los linfocitos de animales coinfectados tempranamente (a las 2 y 4 semanas) produjeron niveles significativamente menores de IL-12 en comparación con los animales normales durante los días 9 y 27 ($p < 0.05$), pero tienden a recuperarse al día 60, una vez que el tripanosoma no está en circulación. Aún así, cabe mencionar, que esta recuperación no alcanza los niveles del día 60 de los ratones control. La producción de IL-12 en los linfocitos de los animales coinfectados tardíamente (a las semanas 8 y 12) es similar a la de los normales durante el inicio de la infección (Fig. 5, día 9). Sin embargo disminuye en los tiempos más avanzados de la infección, en los días 27 y 60. Es interesante que al final de la parasitemia, en el día 60, prácticamente desaparece esta citocina ($p < 0.05$ vs normales, $p < 0.001$ vs control).

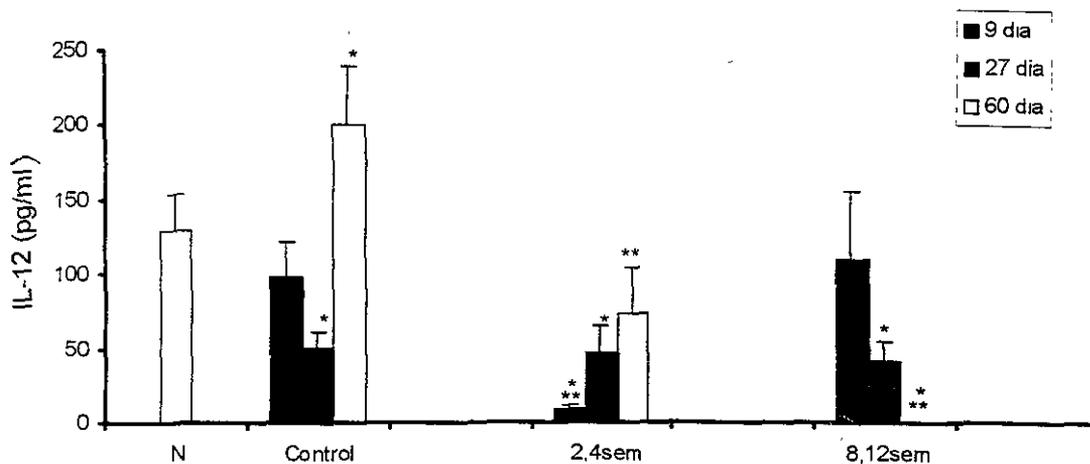


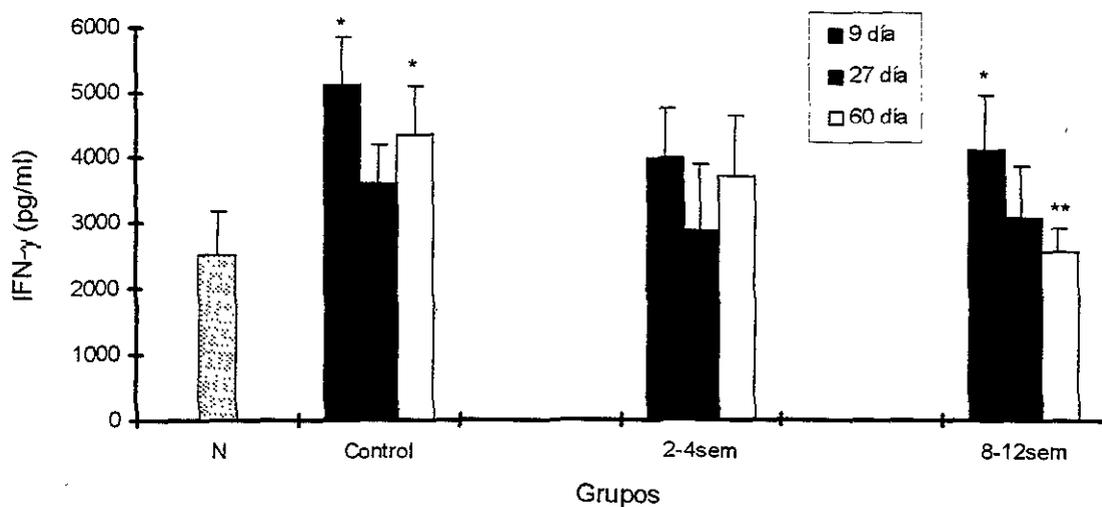
Figura 5.- La secreción de IL-12 esta disminuida en las coinfecciones. Se aislaron los linfocitos de bazo de ratones sanos (N); infectados con *T. cruzi* (Control); infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi* en etapas tempranas (2,4sem) y en etapas tardías (8,12sem.). Las barras representan el momento en el que se efectuó la determinación con respecto a la curva de parasitemia de *T. cruzi*. La cuantificación de los niveles de IL-12 se hizo por ELISA a partir de los sobrenadantes de las células de bazo estimuladas con Con A. * $p < 0.05$ con respecto a N, ** $p < 0.05$ con respecto al Control.

IFN- γ . Como se muestra en la figura 6A, la producción de IFN- γ por las células de los ratones infectados sólo con *T. cruzi* (control), en respuesta a Con A, se incrementó significativamente desde temprano (al día 9 post-infección, $p < 0.05$), en el día 27 se observó una ligera disminución en esta citocina, sin embargo hay una recuperación en la producción de IFN- γ al día 60 ($p < 0.05$; fig. 6A). Nuevamente, al igual que la IL-12 el nivel más bajo de IFN- γ coincide con uno de los puntos altos de parásitos en la curva (Fig. 2, curva control día 27 y fig.6 A, día 27).

Los niveles de IFN- γ de las células provenientes de los ratones coinfectados tempranamente tuvieron un patrón de producción y de distribución similares a los observados en las células provenientes de los ratones control (sin diferencias estadísticamente significativas).

En las células provenientes de ratones con coinfecciones tardías se observó que producen niveles altos de IFN- γ a los 9 días post-infección, pero para el día 60 se observó un decremento de éste con respecto al control.

A



B

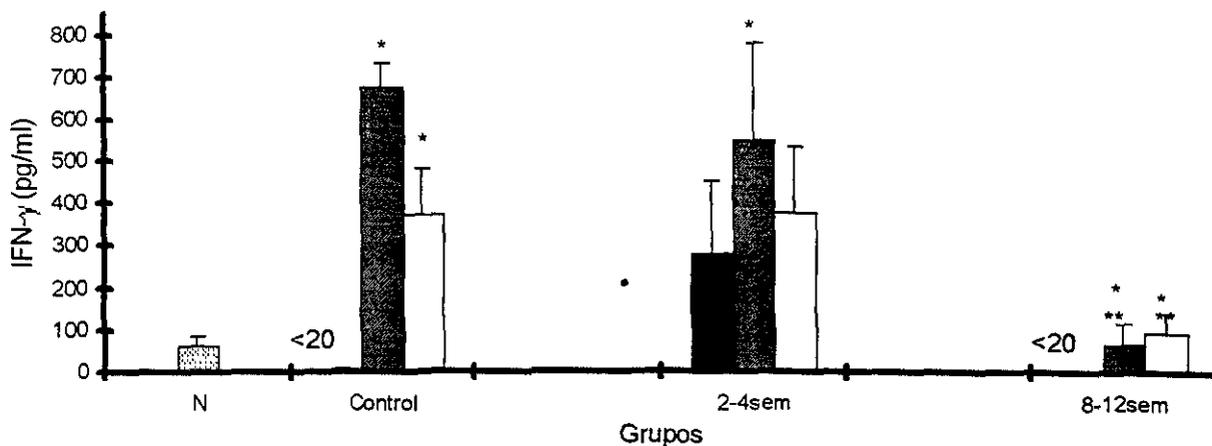


Figura 6.- La producción de IFN- γ en respuesta (A) Con A no presenta diferencias significativas en las coinfecciones tempranas pero esta disminuida hacia el final de las coinfecciones tardías. En respuesta (B) Ag soluble de *T. cruzi* esta disminuida en las coinfecciones tardías. Se aislaron los linfocitos de ratones sanos (N); ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (Control); infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi* en etapas tempranas (2,4sem) y en etapas tardías (8,12sem). Las barras para cada caso tienen el mismo significado que en las figuras anteriores. La cuantificación de los niveles de IFN- γ se hizo por ELISA a partir de los sobrenadantes de las células de bazo estimuladas con Con A, o Ag soluble de *T. cruzi*. * p < 0.05 con respecto a N, ** p < 0.05 con respecto al Control.

Por otro lado, la producción de IFN- γ por las células de bazo de los ratones infectados sólo con *T. cruzi*, al ser estimuladas con antígeno de *T. cruzi* produjeron escasamente esta citocina al día 9 post-infección,

pero para los días 27 y 60 se detectaron niveles altos. Las células de los ratones coinfectados tempranamente en presencia de Ag de *T. cruzi* produjeron niveles altos de IFN- γ todo el tiempo (9, 27 y 60 días). Sin embargo las células provenientes de los ratones coinfectados tardíamente tuvieron una producción disminuida de IFN- γ , si se compara tanto con el control como con las de coinfecciones tempranas.

Producción de Oxido nítrico. Actualmente se sabe que existe una alta correlación entre los niveles de IFN- γ y los niveles de NO que se producen (Hölscher et al. 1998). Por lo cual se decidió medir este parámetro en los sobrenadantes de las células de bazo de los mismos grupos de células estudiadas para IFN- γ estimuladas con Con A.

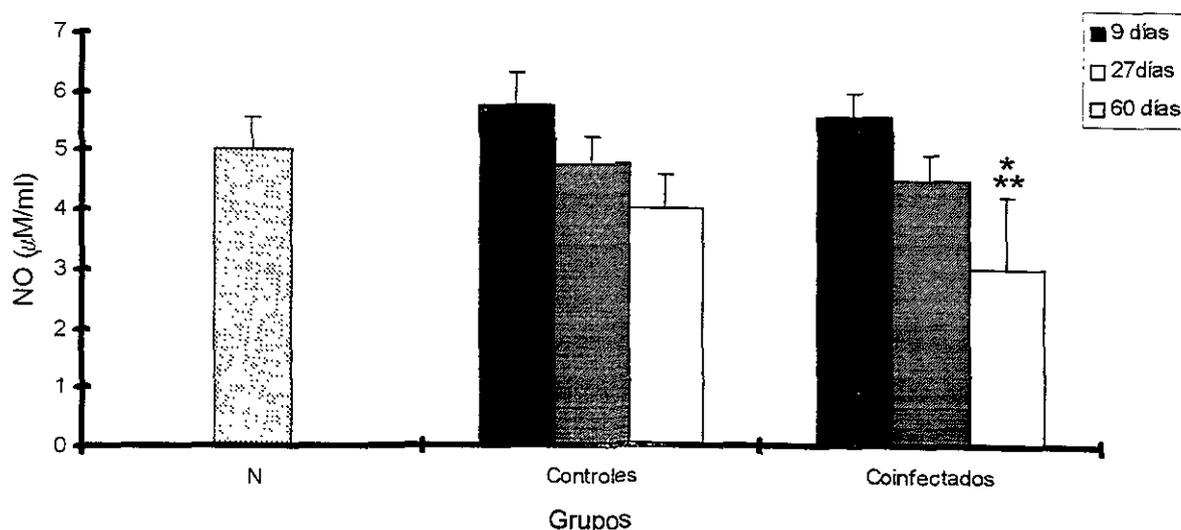


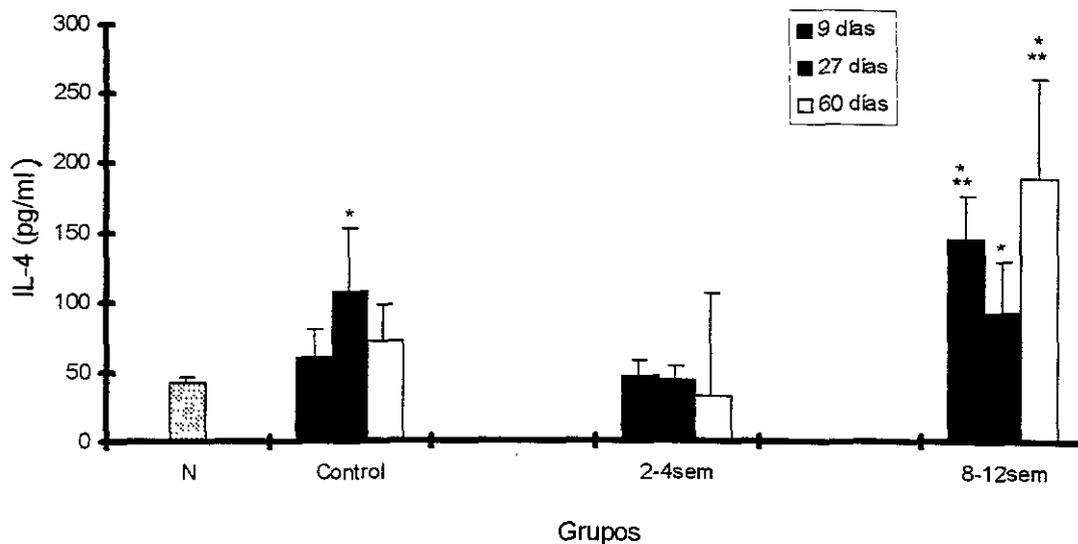
Figura7.- La producción de NO esta disminuida en el día 60 de la infección por *T. cruzi* tanto en los controles como en los coinfectados. Se aislaron los linfocitos de bazo de los diferentes grupos de animales, de ratones sanos (**N**); ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (**Control**); infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi* a las 2,4, 8 y 12 semanas después de la primera infección (coinfectados). Las barras tienen el mismo significado que en la figura anterior. La cuantificación de los niveles de NO se hizo por el método colorimétrico descrito por Migliorini (1991) a partir de los sobrenadantes de las células de bazo estimuladas con Con A. * $p < 0.05$ con respecto a **N**. ** $p < 0.05$ con respecto a los controles.

En la figura 7 puede observarse que la producción de óxido nítrico de los ratones infectados sólo con *T. cruzi* no tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, aunque hay una clara tendencia a disminuir cuando la infección por *T. cruzi* se va haciendo crónica. Por otro lado los niveles de óxido nítrico en los animales coinfectados tempranamente no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ni con N, ni con los controles. Sin embargo los niveles de oxido nítrico en el sobrenadante de las células de los ratones infectados tardíamente tienen niveles disminuidos al día 60 de la coinfección ($p < 0.05$), aunque ya desde el día 27 se observa una disminución no significativa.

Citocinas de una respuesta tipo Th2 :

IL-4. En respuesta a Con A las células de los ratones infectados sólo con *T. cruzi* (control) produjeron al día 9 y 60 niveles de IL-4 cercanos al nivel de los normales, aunque resultó interesante observar un incremento significativo ($p < 0.05$) en el día 27 cuando la parasitemia fue mayor (Fig.8A).

A



B

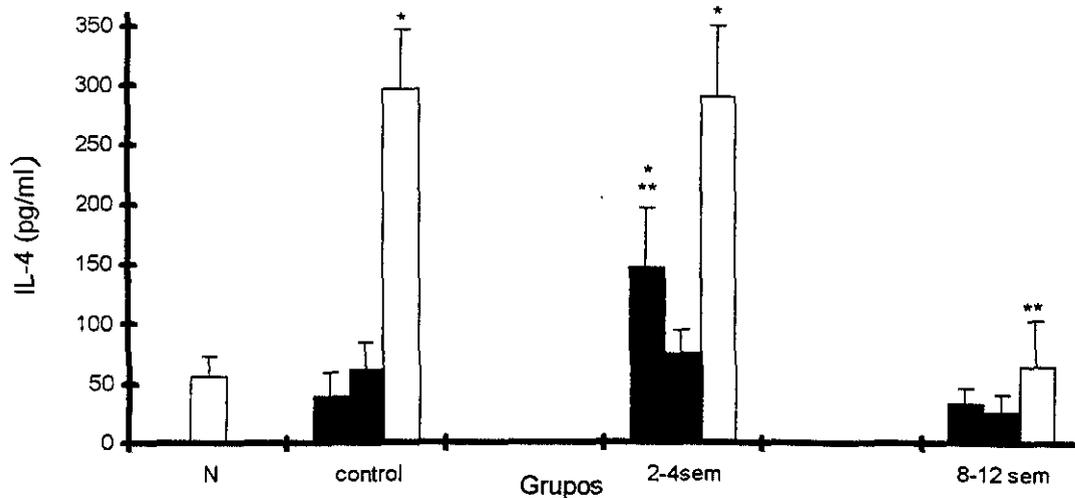


Figura 8.- La secreción de IL-4 en respuesta a con A (A), en respuesta a Ag soluble de *T. cruzi* (B). Se aislaron los linfocitos de bazo de los diferentes grupos de animales, de ratones sanos (N); ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (Control); infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi* en etapas tempranas después de la primera infección(2,4sem) y en etapas tardías (8,12sem.) Cada barra representa el momento en el que se efectuó la determinación con respecto a la curva de parasitemia de *T. cruzi*, a los 9 días □; a los 27 días □; a los 60 días □. La cuantificación de los niveles de IL-4 se hizo por ELISA a partir de los sobrenadantes de las células de bazo estimuladas Con A o con Ag de *T. cruzi*. * $p < 0.05$ con respecto a N, ** $p < 0.05$ con respecto al Control.

Los sobrenadantes de los linfocitos de animales coinfectados tempranamente, mostraron niveles de IL-4 similares a los de los ratones normales durante todo el curso de la parasitemia. Por otro lado, en franco contraste con los infectados tempranamente, los animales coinfectados tardíamente tuvieron un aumento sostenido y significativo ($p < 0.05$) en la producción de IL-4 desde el día 9 de la infección, con una ligera disminución en el día 27 (nivel alto de parásitos en circulación) y una clara recuperación en el día 60 (final de la parasitemia).

En respuesta al antígeno específico de *T. cruzi* (Fig. 8 B) la producción de IL-4 en los animales control se mantuvo en niveles basales durante los días 9 y 27, pero al día 60 tuvo un aumento significativo ($p < 0.05$).

En los animales coinfectados a las semanas 2 y 4 llama la atención un aumento en la producción de IL-4 durante los días 9 y 60 y una producción disminuida (basal) en el día 27.

En los animales coinfectados a las semanas 8 y 12 produjeron menores niveles de IL-4, semejantes al de los normales, durante toda la infección.

IL-10. En la figura 9A se observa la producción de IL-10 en respuesta a Con A. Las células de los ratones control produjeron en el día 9 y en el día 60 niveles de IL-10 indistinguibles estadísticamente de los producidos por los ratones normales. Sin embargo, en el día 27 tuvieron un nivel más bajo ($p < 0.05$), lo que vuelve a coincidir con uno de los puntos de más altos de la parasitemia.

Los linfocitos de los animales coinfectados tempranamente tuvieron niveles de IL-10 altos al inicio de la coinfección (día 9, $p < 0.05$), pero posteriormente los niveles fueron parecidos a los de los ratones control (día 27 y 60).

En los animales con coinfecciones tardías se observó una producción alta de IL-10 al día 9 con respecto a los normales y al control, sin embargo en la determinación al día 27 la coinfección, hubo una disminución que alcanzó diferencias significativas ($p < 0.05$). Al día 60 hubo una ligera recuperación aunque no alcanzó niveles significativos. Cabe señalar que en los tres casos, control, coinfección temprana y coinfección tardía, se observó que la producción de IL-10 sigue un patrón de producción similar durante todo el curso de la parasitemia, es decir, con el nivel más bajo en el día 27.

Por otro lado, la producción de IL-10 en respuesta al antígeno de *T. cruzi* (Fig. 9B) en los controles se mantuvo similar a los niveles basales durante el día 9, aumentó en el día 27 y aumentó aún más al día 60 ($p < 0.05$). En los animales coinfectados temprana como tardíamente, la producción de IL-10 fue similar al de los animales control, al día 9 tuvo niveles basales, pero al día 27 y 60 el aumento fue significativo comparado con los niveles de los ratones normales ($p < 0.05$). Cabe hacer notar sin embargo que al día 60 la producción de IL-10 en los coinfectados tardíamente no es tan alta como en la de los otros dos grupos, control y coinfectados tempranamente.

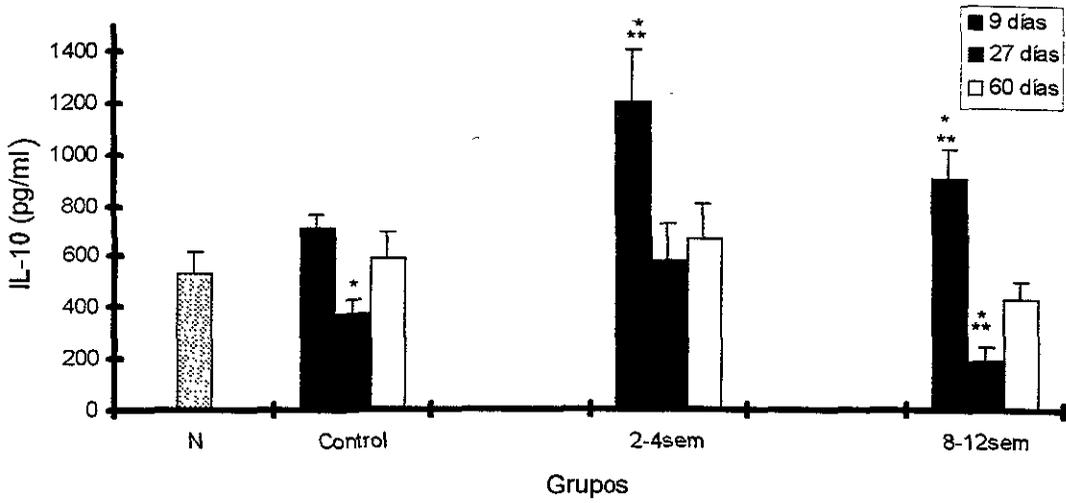
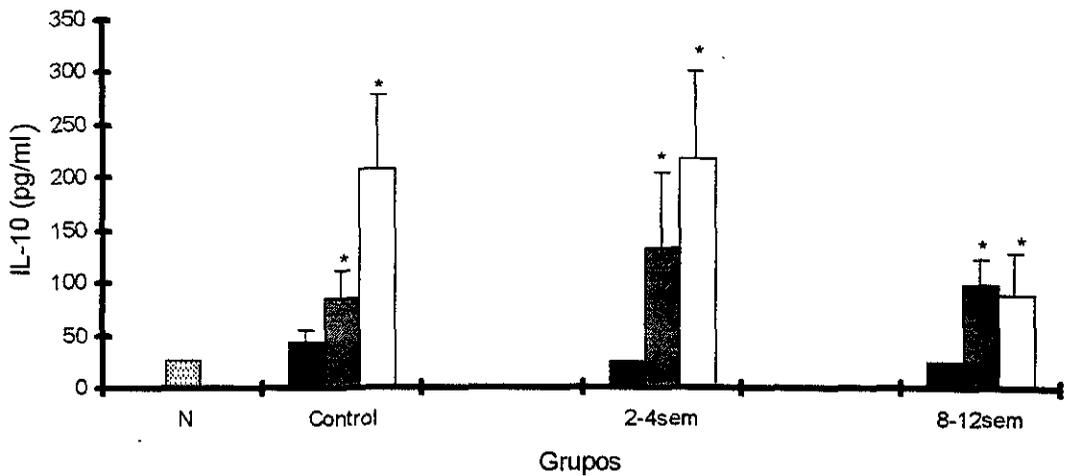
A**B**

Figura 9.- Secreción de IL-10 por linfocitos de bazo de los diferentes grupos de ratones ; sanos (**N**) ; ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (**Control**) ; infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi* en etapas tempranas después de la primera infección (**2,4sem**) y en etapas tardías (**8,12sem.**). Las barras tienen el mismo significado que las figuras anteriores. La determinación de IL-10 se hizo por ELISA a partir de los sobrenadantes de las células de bazo estimuladas con Con A (A) ó Ag soluble de *T. cruzi* (B). * $p < 0.05$ con respecto a N, ** $p < 0.05$ con respecto al Control.

Anticuerpos anti-*T. cruzi*. Con el fin de explorar la **respuesta inmune humoral** contra *T. cruzi*, y si ésta es alterada por la infección previa con *T. crassiceps*, se analizó la presencia de tres isotipos de los anticuerpos específicos contra antígeno de *T. cruzi*. Actualmente se considera a IgG2a como marcador de respuesta Th1, y a IgG1 e IgG2b como marcadores de una respuesta tipo Th2 (Figura 10 A - D).

En la figura 10 A en líneas punteadas se observan los títulos de IgG2a, IgG2b e IgG1 de los ratones infectados sólo con *T. cruzi* (control). Los tres isotipos fueron detectados hasta después de 10 días de la infección, cuando la parasitemia empieza a alcanzar títulos mayores, y fue en incremento a medida que avanzó la parasitemia alcanzando el nivel máximo a los 60 días de la infección, este título de anticuerpos persistió después de 60 días, aún cuando ya no se observan parásitos circulantes (datos no mostrados). La distribución de los isotipos coincidió con reportes previos de otras cepas de *T. cruzi*, títulos mayores de IgG2a, por debajo IgG2b y un poco más abajo IgG1 (D' imperio Lima, 1985; Spinella, 1990).

Los isotipos de los anticuerpos de los ratones coinfectados a la 2a, 4a, 8a, 12a semanas se muestran con líneas continuas en las figuras 10A, 10B, 10C y 10D respectivamente, y en cada caso están comparados con los anticuerpos producidos por el control (líneas punteadas). No se observaron diferencias en ninguno de los casos con respecto al momento de aparición de los isotipos ni con la distribución, aunque sí en los títulos alcanzados, ya que siempre fueron un poco por debajo de los niveles del control, aunque no fueron estadísticamente significativos, lo cual demuestra que la respuesta inmune humoral contra *T. cruzi* no se modificó por la presencia previa del cisticerco de *T. crassiceps*, aún en etapas tardías de la coinfección.

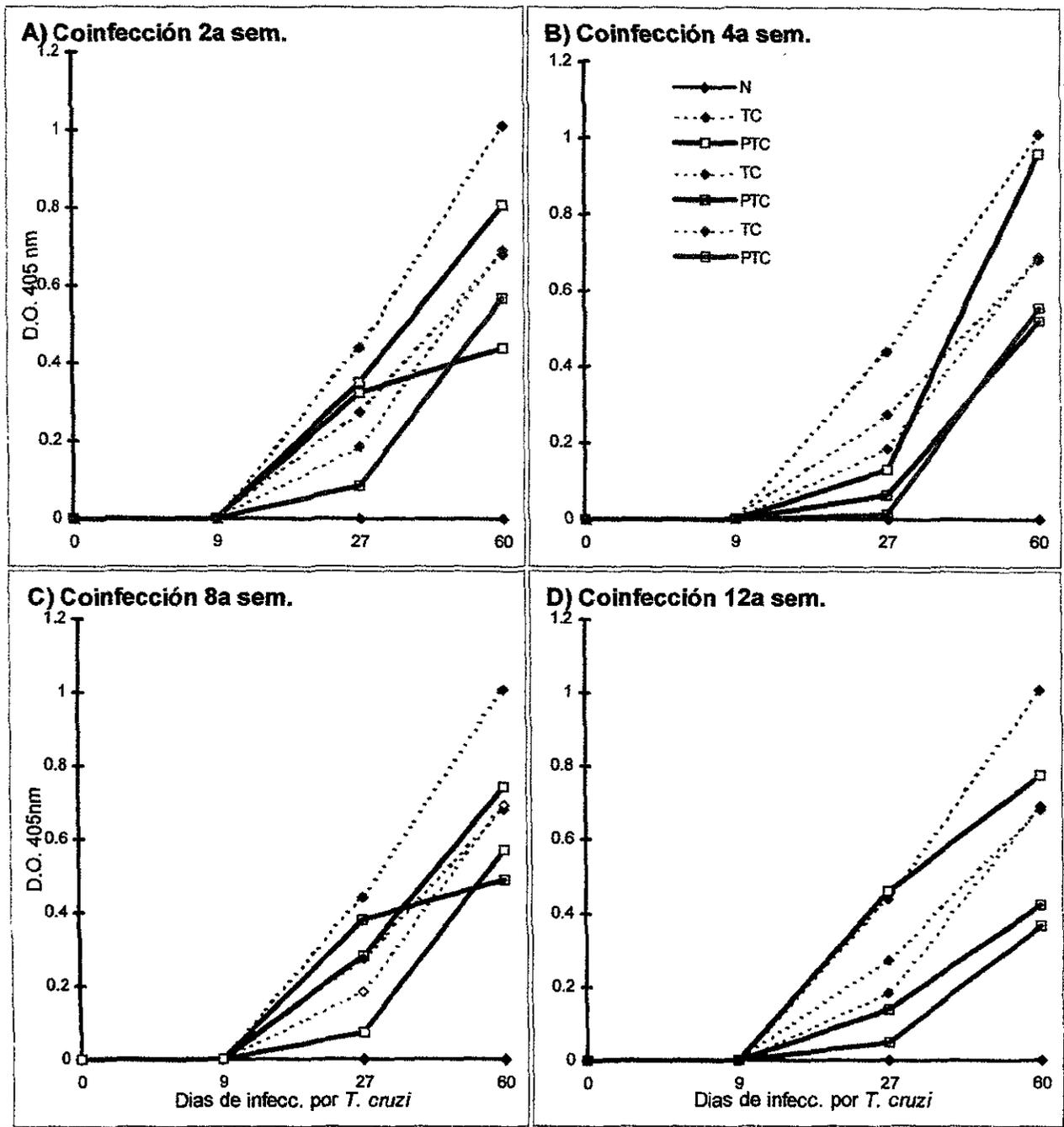
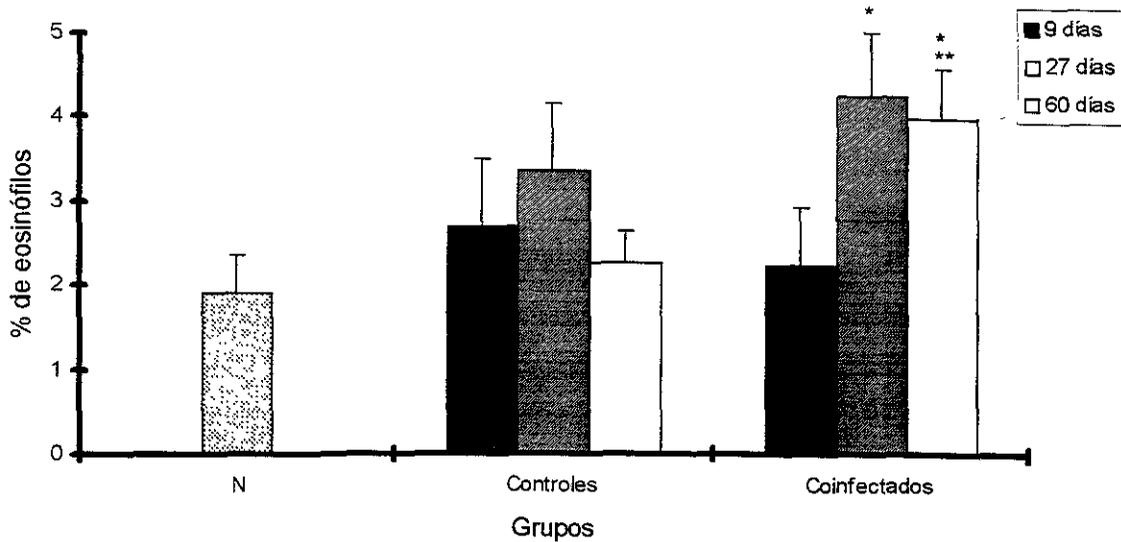


Figura10.- Producción de anticuerpos específicos a *T. cruzi*. La cuantificación se hizo en suero a una dilución de 1 :50 en animales infectados con *T. cruzi* (líneas punteadas) y coinfectados (líneas continuas). Las líneas azules representan la cuantificación de IgG2a, las rojas de IgG2b y las verdes de IgG1. Los determinación se hizo mediante la técnica de ELISA, los resultados están expresados en unidades de densidad óptica (405nm).

Eosinófilos y linfocitos circulantes (sangre periférica). La respuesta inmune a las infecciones parasitarias por helmintos se ha caracterizado con altos niveles de IgE, mastocitos y eosinofilia localizada y periférica, todo esto dependiente de las citocinas tipo Th2 (Finkelman et al., 1997), razón por la cual se decidió cuantificar la presencia de eosinófilos en sangre periférica de los diversos grupos experimentales antes mencionados.

A



B

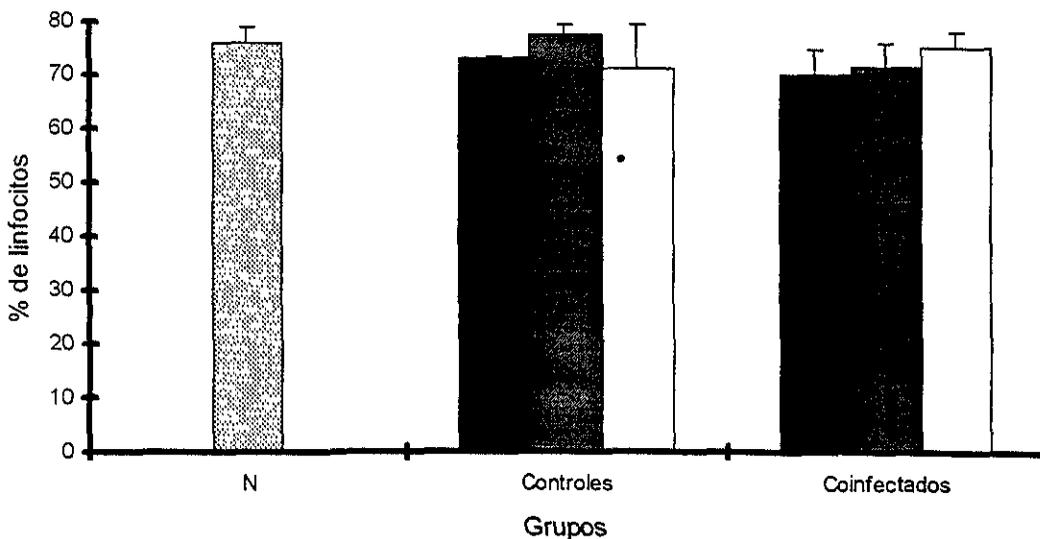


Figura 11. Se determinó el número de eosinófilos (A) y de linfocitos de sangre periférica de ratones sanos (N); ratones infectados únicamente con *T. cruzi* (Control); infectados con *T. crassiceps* y posteriormente coinfectados con *T. cruzi*. Para simplificar la figura se juntaron los coinfectados. Cada barra representa el momento en el que se efectuó la determinación con respecto a la curva de parasitemia de *T. cruzi*, a los 9 días ■; a los 27 días □; a los 60 días ▤. La determinación se hizo por un frotis de sangre periférica y el número de células observados es sobre 100. * $p < 0.05$ con respecto a N, ** $p < 0.05$ con respecto al control.

En la figura 11A puede observarse la determinación del número de eosinófilos por cada 100 células del frotis sanguíneo, debido a que no se observaron diferencias entre el grupo de coinfectados temprano como los coinfectados tardíamente y para simplificar los resultados se decidió juntar estos dos grupos, llamándolo para esta ocasión únicamente coinfectados. En los ratones infectados con *T. cruzi* se observó que hubo un ligero incremento con respecto al control, sin embargo el incremento no fue estadísticamente significativo.

Es de llamar la atención que los eosinófilos de los ratones coinfectados tuvieron un incremento mayor en los días 27 y 60 de la determinación, que resultó estadísticamente significativo con respecto a N; y en el día 60 también fue significativo para los infectados con *T. cruzi* (control).

Por otro lado, se aprovechó el mismo frotis de sangre periférica utilizado para observar los eosinófilos para determinar el número de linfocitos. En la figura 11 B puede verse que no hubo diferencias en el número de éstas células en ninguno de los casos estudiados.

DISCUSION

Actualmente se sabe que *in vitro* el microambiente de citocinas presente al momento del reto antigénico influye sobre la diferenciación de las células precursoras hacia alguna de las subpoblaciones de linfocitos TCD4⁺. La presencia de IL-12 o IFN- γ favorece la diferenciación de las células Th0 hacia Th1; mientras que la presencia de IL-4 favorece el desarrollo de células Th2 (Bradley et al., 1995; Kamogawa et al., 1993; Maggi et al., 1992; Magram et al., 1996; Trinchieri, 1995; Wynn et al., 1995). Este fenómeno observado *in vitro* abre la posibilidad de que lo mismo pueda suceder *in vivo*, esto sería que un ambiente de citocinas establecido previamente podría influir sobre la población de células que responde a un nuevo reto antigénico. Es decir, el microambiente de citocinas generado en respuesta a una infección podría modificar radicalmente la respuesta inmune y por lo tanto la susceptibilidad a infecciones subsecuentes no relacionadas con la primera.

In vivo este microambiente de citocinas se genera en respuesta a diferentes estímulos antigénicos, si éstos perduran el tiempo suficiente pueden generar ambientes de citocinas más o menos estables que pueden en su momento influir sobre el desarrollo de una respuesta inmune subsecuente.

Dentro de este contexto han sido útiles algunos modelos de enfermedades parasitarias (especialmente las causadas por helmintos) que pueden generar en el huésped respuesta inmunológicas con diferentes características. Las infecciones por helmintos son ampliamente conocidas por inducir respuestas inmunes altamente polarizadas hacia Th2, sobre todo al hacerse crónicas (Kullberg et al., 1996; Lawrence et al., 1995; Terrazas et al., 1998). Esta característica ha sido aprovechada por algunos investigadores para estudiar como dicho ambiente de citocinas generado por un parásito puede alterar o modificar la respuesta inmune contra un antígeno no relacionado. Los pocos ejemplos que existen en la literatura son coinfecciones entre dos helmintos como es el caso en la coinfección *S. mansoni*-*T. muris* (Curry et al., 1995), donde la infección primaria con *S. mansoni* protege contra el establecimiento de *T. muris* debido a que la respuesta protectora contra este último es de tipo Th2. Pero si la protección dependiera de una respuesta tipo Th1, como en los casos de *L. major* (Reiner et al., 1995), *M. tuberculosis* (Martin et al., 1995), *Plasmodium sp* (Stevenson, 1993) y posiblemente HIV (Cleirici et al., 1993) la presencia de helmintos podría generar una mayor susceptibilidad.

En otros casos se ha demostrado que la presencia de helmintos puede alterar la respuesta a un antígeno no viable y no relacionado, hasta ahora sólo existen reportes para la infección con *Brugia malayi* y la respuesta al PPD (Pearman, 1993), y para *Schistosoma mansoni* y esperma de ballena. En ambos casos la presencia del parásito afecta la respuesta al antígeno no relacionado. En otro trabajo se ha demostrado que la

infección con *S. mansoni* altera la resistencia al virus de vaccinia (Actor et al., 1993). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se ha considerado la cronicidad de la primera infección como un factor determinante que influye en la respuesta subsecuente, y la mayoría de los mismos solo han propuesto como posible mecanismos de estas alteraciones a la inmunosupresión.

Ahora en este estudio se describe como la cronicidad de una infección previa con un helminto (*T. crassiceps*) puede alterar diferencialmente la respuesta inmune y la susceptibilidad a un parásito filogenéticamente no relacionado y con el que además no compite por algún nicho dentro del huésped, como es el caso de *T. cruzi*.

Los datos obtenidos en este trabajo demuestran que : **a)** la infección por el cisticerco de *T. crassiceps* afecta diferencialmente la “susceptibilidad” de los ratones BALB/c a una infección subsecuente por el parásito intracelular *Trypanosoma cruzi*, **b)** la sola presencia del cisticerco de *T. crassiceps* no es el único factor que modifica la respuesta inmune en contra de la infección posterior por *T. cruzi*, sino que es muy importante el momento en que se lleve a cabo la segunda infección. Esto se sostiene porque cuando los ratones BALB/c se infectaron con *T. cruzi* dos o cuatro semanas después de la infección por *T. crassiceps* hubo un retraso en el inicio de la parasitemia y niveles significativamente menores de parásitos en circulación durante las primeras semanas. En contraste, cuando la segunda infección se inició a las ocho o doce semanas después de la primera, la parasitemia tuvo incrementos notables y estadísticamente significativos desde etapas muy tempranas, alcanzando durante el pico de la misma incrementos de más del 100% sobre los niveles de parásitos de los animales infectados sólo con *T. cruzi*, lo que indica que la “susceptibilidad varió en función del tiempo de evolución de la primera infección (Fig.2).

En la coinfección de dos semanas, cuando un ambiente de citocinas con predominio tipo Th1 inducido por la primera infección de *T. crassiceps* estaba presente (Tabla1), se esperaba encontrar cierta resistencia inmune en contra de *T. cruzi* (disminución de los niveles de parásitos), esto basado en reportes previos sobre la inmunología de *T. cruzi* que indican que una respuesta Th1 es protectora en contra de este parásito (Golden y Tarleton, 1991; Christoph et al., 1998). Sin embargo, la disminución en el nivel de parásitos que se observó no fue como se hubiera esperado si la respuesta inmune protectora fuera totalmente dependiente de Th1. Aunque sí hubo un retraso de una semana en el inicio de la parasitemia y el número de parásitos se mantuvo significativamente menor durante cinco semanas más (Fig. 2, hasta el día 36), finalmente el número máximo total alcanzado de parásitos en sangre fue similar al de los ratones sólo infectados con *T. cruzi* (Fig. 2). Esta “protección” parcial y transitoria observada podría tener dos explicaciones: primero, podría deberse a que aún cuando una respuesta de tipo Th1 fuera protectora en contra de este parásito (Cardillo, 1996; Golden, 1991; Hunter, 1996; Silva, 1992; Torrico, 1991; Christoph et al., 1998), el microambiente de citocinas tipo Th1

inducido por la infección previa con *T. crassiceps*, particularmente los niveles alcanzados de IFN- γ , no fueron lo suficientemente altos o persistentes para lograr la eliminación total de *T. cruzi*; segundo, podría deberse a que la respuesta inmune de tipo Th1 no fuera la protectora en contra de *T. cruzi*, ó que además de una respuesta tipo Th1 se requieran de otros elementos para lograr la desaparición del parásito, como se ha sugerido recientemente (Zhang and Tarleton, 1996).

Cuando se hizo la coinfección a las cuatro semanas tampoco se observó una franca protección en contra de *T. cruzi*, como se hubiera esperado si la respuesta inmune protectora fuera dependiente de una respuesta de tipo mixta (Th1/Th2), ya que en el momento de la coinfección se estaba dando el desplazamiento de una respuesta tipo Th1 a una Th2 debido a la presencia de *T. crassiceps*, o aún cuando una respuesta de tipo mixta fuese protectora en contra de *T. cruzi*, es posible que no se haya mantenido lo suficiente y antes de lograr la eliminación del parásito se hubiese dado el predominio de Th2, más adelante se muestra que los resultados de citocinas son compatibles con esta explicación.

En los dos casos de coinfecciones tempranas (2 y 4 semanas), a pesar de que se observó un retraso en el inicio de la parasitemia de *T. cruzi*, no se logró la resolución de la infección, lo cual deja abierta la posibilidad de seguir explorando el tipo de respuesta inmune necesaria que se requiere en contra de *T. cruzi*, si bien la respuesta inmune tipo Th1 indujo cierta resistencia, parece que no es el único elemento requerido para reducir significativamente el número de parásitos circulantes o incluso para la eliminación del mismo, tal vez se requiera de múltiples componentes tanto de la respuesta inmune innata como adquirida para lograrlo.

Por el contrario, al hacer la coinfección a las ocho y doce semanas, con un ambiente de citocinas con predominantemente de tipo Th2, generado por la presencia de *T. crassiceps*, la parasitemia se incrementó significativamente, lo cual está en concordancia con la interpretación inicial dada: el microambiente de citocinas tipo Th2, generado en respuesta a la infección por *T. crassiceps*, modificó la susceptibilidad a la infección subsecuente por *T. cruzi*. Los bajos niveles de IFN- γ e IL-2 iniciales se asociaron a una mayor susceptibilidad a *T. cruzi*. Esto pudo observarse cuando se hizo la coinfección a las ocho semanas, pero resultó más impresionante cuando la coinfección se realizó a las 12 semanas, en el momento en que el ambiente inmune generado por la presencia previa de *T. crassiceps* estaba francamente polarizado hacia una respuesta de tipo Th2.

Por otro lado, los resultados que se discuten más adelante de cómo influye el ambiente inmune generado por *T. crassiceps* sobre la inmunología de *T. cruzi* también apoyan la posibilidad de que el ambiente de citocinas generado por *T. crassiceps* participó en la alteración de la respuesta inmune a *T. cruzi*, tanto en las coinfecciones tempranas como en las tardías. Para hacer más sencilla la discusión de éstos datos, se

retomaron y agruparon los resultados de citocinas, tratando de resumirlos de alguna manera práctica en la tabla 2 incluida en esta sección.

ESTADO INMUNOLOGICO EN LAS COINFECCIONES *T. crassiceps-T. cruzi*.

Una vez que se observó que la infección previa con *T. crassiceps* modificó la susceptibilidad a *T. cruzi*, se procedió a estudiar cómo influía el ambiente inmune generado inicialmente por *T. crassiceps* sobre la evolución posterior de la respuesta inmune a *T. cruzi*. Como controles se utilizaron ratones infectados únicamente con *T. cruzi*. A Ambos grupos, controles y coinfectados, se les midió la producción de anticuerpos específicos a *T. cruzi* de los subtipos IgG1, IgG2a e IgG2b, se les extrajeron linfocitos de bazo y se probó su capacidad para proliferar y para producir citocinas tras la estimulación *in vitro* con Ag soluble de *T. cruzi*. y Con A .

La respuesta inmune de los ratones Balb/c infectados únicamente con *T. cruzi* (cepa Ninoa) son resultados adicionales por demás interesantes. Se obtuvieron datos que concuerdan con otros reportes inmunológicos sobre la infección aguda con *T. cruzi*, en otros modelos murinos y con diferentes cepas del parásito (Bradley et al., 1995 ; Kierzenbaum et al., 1994 ; Zhang y Tarleton, 1996). Con esta cepa de *T. cruzi* se encontró que los linfocitos de los ratones infectados presentaron una proliferación celular disminuida, los niveles de IL-2 inicial también se encontraron disminuidos y tendían a disminuir más conforme la infección se hacia crónica. Se observó también una producción de IFN- γ elevada y sostenida, no se observó incremento en los niveles de IL-4 al inicio de la infección, pero sí en etapas tardías de la misma, sin que hubieran bajado los niveles de IFN- γ . El patrón de producción de IL-10 fue diferente al de IL-4, ya que la IL-10 se detectó ligeramente incrementada en etapas tempranas de la infección con una tendencia a incrementarse conforme el tiempo de la infección era mayor. Por otro lado, se encontraron anticuerpos específicos después de 10 días de infección, cuando la parasitemia empezaba a tener títulos ligeramente altos, estos anticuerpos alcanzaron el título máximo después de 60 días de la infección, persistiendo en la fase crónica (> de 60 días, datos no mostrados). La distribución de los isotipos, fue en todos los casos igual , con niveles de IgG2a por arriba de IgG2b e IgG1.

Los resultados de citocinas observados en la infección de *T. cruzi* parecen ser una evidencia de que las respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 no son totalmente excluyentes una de la otra, debido a que se detectaron niveles altos de IFN- γ e IL-12 en presencia de IL-10 e IL-4, así estos resultados muestran que las respuestas inmunes de tipo Th1 y Th2 pueden coexistir, al menos durante algún tiempo, en este caso hasta el día 60 de la infección por *T. cruzi*.

Por otro lado, cabe hacer notar que la presencia de niveles altos y constantes de IFN- γ con niveles bajos de IL-2 son una evidencia de que la producción de estas dos citocinas podría regularse independientemente una de la otra.

Estos datos obtenidos de los animales infectados únicamente con *T. cruzi* se utilizaron para comparar los mismos parámetros cuantificados en los grupos de coinfectados. Así, pudo observarse que la producción de anticuerpos específicos a *T. cruzi*, la respuesta proliferativa y la producción de IL-2 e IL-10, presentaron un patrón similar al del grupo control. Sin embargo, la respuesta proliferativa a Con-A y Ag, y la producción de IL-2 fueron marcadamente disminuidas tanto en las coinfecciones tempranas como en las tardías. Los niveles de IL-10 no fueron substancialmente diferentes a los observados en los ratones infectados con *T. cruzi*. El hecho de que no se hayan encontrado diferencias significativas, en estos parámetros, parece indicar que éstos no son en general los responsables de los cambios observados en la respuesta inmune a *T. cruzi* en las coinfecciones tempranas y mucho menos en las coinfecciones tardías, donde el incremento del número de parásitos fue del 100%.

Por otro lado, el IFN- γ sí parece tener una participación importante sobre los cambios en la susceptibilidad a *T. cruzi*. Ya que la producción de IFN- γ en etapas tempranas de coinfección, donde hubo un menor número de tripanosomas en circulación se observó un nivel alto y sostenido de esta citocina. En cambio, en las coinfecciones tardías, cuando la susceptibilidad a *T. cruzi* fue mayor, se observaron bajos niveles de IFN- γ en el día 60, en respuesta a Con A, mientras que, en respuesta al Ag de *T. cruzi* no se observó producción específica de esta citocina en ningún momento (fig. 6B). Lo cual sugiere que el IFN- γ juega un papel importante en el control de la parasitemia por *T. cruzi*. Resultó un fenómeno interesante que la producción de IFN- γ en respuesta a Con A, tanto en el grupo control como en las coinfecciones tempranas, estaba disminuida en el día 27, sin embargo, esta aparente caída puede explicarse si se considera que coincide con el mayor número de parásitos observado en circulación, esta observación refuerza la idea de que la producción de IFN- γ parece ser importante para controlar el desarrollo de *T. cruzi* (Tarleton, 1991; Zhang and Tarleton, 1996; Christoph H et al., 1998).

En lo que se refiere a la producción de IL-4 cabe destacar que los animales coinfectados en etapas tempranas no produjeron IL-4 en respuesta a Con A, sin embargo sí hubo una producción específica de esta citocina. Lo que sugiere que en las coinfecciones tempranas no se logró mantener del todo polarizada la respuesta inmune de tipo Th1, como se hubiera esperado debido a la presencia previa de *T. crassiceps*. Es decir, las células de los ratones coinfectados en etapas tempranas produjeron IFN- γ pero también produjeron IL-4 en respuesta a antígeno específico.

En coinfecciones tempranas, la presencia elevada y constante de IFN- γ pudo influir en el retraso del inicio de la parasitemia de *T. cruzi*, pero la producción de IL-4 específica pudo reflejarse en la escasa protección que se dio en estos grupos. Esto aunado a que a pesar del microambiente de citocinas de tipo Th1 inducido por la presencia de *T. crassiceps*, no se observó un incremento significativo de IFN- γ con respecto a los sólo infectados con *T. cruzi*, por lo que tal vez la producción de IFN- γ fue insuficiente para lograr la resolución de la infección con *T. cruzi*.

Por otro lado, cabe destacar que las células, estimuladas con Con A, de los animales coinfectados en etapas tardías tuvieron un incremento significativo en la producción de IL-4. Así los niveles altos de IL-4 y los niveles bajos de IFN- γ observados en estos grupos, permiten especular sobre las razones del incremento en el número de parásitos observado. Niveles altos de IL-4 y disminuidos de IFN- γ correlacionan perfectamente con la idea de que una respuesta inmune de tipo Th2 podría ser facilitadora para *T. cruzi*.

Esto está apoyado por evidencias claras que indican que las citocinas de tipo Th2, sobre todo la IL-4 parece ser un potente modulador de la actividad de los macrófagos. La IL-4 es capaz de regular negativamente la capacidad inflamatoria y la capacidad citotóxica de los mismos, al parecer porque se reduce la producción de óxido nítrico (NO) de los macrófagos activados (Oswald et al., 1992).

La producción de NO por macrófagos puede tener importantes implicaciones para la resistencia a infecciones parasitarias, puesto que ha sido implicado como un factor crucial en la muerte de muchos parásitos intracelulares (Doherty et al., 1993). Por otro lado se sabe que existe un alto grado de correlación entre niveles altos de IFN- γ y la producción de óxido nítrico (NO) por macrófagos (Migliorini y colaboradores 1991). Además, se sabe que en la infección por *T. cruzi* los macrófagos activados por el IFN- γ son la fuente principal de óxido nítrico, el cual es producido durante la fase aguda de la infección y se le ha reconocido actividad citotóxica en contra del tripanosoma. Se ha observado que en ratones infectados con *T. cruzi* el tratamiento con inhibidores de óxido nítrico sintetasas exacerba la infección (Christoph H et al. 1998). La determinación de óxido nítrico en los sobrenadantes utilizados para la cuantificación de citocinas de los grupos de coinfectados concuerdan con los niveles de IFN- γ encontrados en los diferentes grupos; en las coinfecciones tempranas los niveles de NO no fueron diferentes a los detectados en los cultivos celulares de los ratones infectados únicamente con *T. cruzi*. En cambio, en las coinfecciones tardías se detectó una disminución estadísticamente significativa de NO en el día 60. Los niveles bajos de NO aunados a los niveles disminuidos de IL-12 y de IFN- γ (Tabla 2) observados en las infecciones tardías podría ser una razón más para explicar el mayor número de tripanosomas encontrados en circulación en estos animales.

Tabla 2.- Resultados esquematizados de la producción de citocinas por células de bazo provenientes de los diferentes grupos experimentales.

Con A	Días de infec.	IL-2	IL-12	IFN- γ	IL-10	IL-4	Balance
Infección <i>T. cruzi</i>	0	XXX	XXX	XX	XX	X	<u>Th1</u> Th2
	9	XX	XX	XXXXX	XXX	XX	
	27	X	X	XXX	X	XXX	
	60	X	XXXX	XXXX	XX	XX	
Coinfec.. 2-4 sem.	0	XXX	XXX	XX	XX	X	<u>Th1</u> Th2
	9	--	X	XXXX	XXXX	X	
	27	X	XX	XXX	XX	X	
	60	--	XXX	XXXX	XX	X	
Coinfec. 8-12 sem	0	XXX	XXX	XX	XX	X	Th1 <u>Th2</u>
	9	--	XXX	XXXX	XXX	XXXX	
	27	X	XX	XXX	X	XXX	
	60	--	--	XX	XX	XXXXX	
Ag <i>T. cruzi</i>	Días de infec.	IL-2	IL-12	IFN- γ	IL-10	IL-4	Balance
Infección <i>T. cruzi</i>	0	--	ND	--	--	--	<u>Th1</u> Th2
	9	--	ND	--	X	--	
	27	--	ND	XXXX	XX	--	
	60	--	ND	XXX	XXXX	XXXX	
Coinfec. 2-4 sem.	0	--	ND	--	--	--	<u>Th1</u> Th2
	9	--	ND	XXX	--	XX	
	27	--	ND	XXXXX	XXX	X	
	60	--	ND	XXXX	XXXX	XXXX	
Coinfec. 8-12 sem	0	--	ND	--	--	--	Th1 <u>Th2</u>
	9	--	ND	--	--	--	
	27	--	ND	X	XXX	--	
	60	--	ND	X	XXX	X	

Retomando todos nuestros resultados (tabla 2), parece claro entonces, que el aumento en la susceptibilidad en los ratones infectados con *T. cruzi*, 8 y 12 semanas después de una infección previa con *T. crassiceps*, coincide más con una insuficiente producción de citocinas tipo Th1 que con un claro predominio de una respuesta inmune tipo Th2.

Las claras diferencias observadas en el número de parásitos de *T. cruzi* en las coinfecciones hechas a las 8-12 semanas en la susceptibilidad a *T. cruzi* están en función del tiempo de desarrollo de la infección inicial de *T. crassiceps*, por lo cual podría argumentarse que estas variaciones en la susceptibilidad pueden estar relacionadas a otros mecanismos inducidos por la infección persistente del céstodo, además del claro cambio en el microambiente de citocinas. Algunas posibilidades podrían ser, que la presencia crónica de *T. crassiceps* puede ser potencialmente desgastante para el huésped, y la inhibición de la proliferación celular y la baja producción de IL-2 e IFN- γ específicos observados en estos casos podrían deberse a una posible inmunosupresión generalizada, o bien a un posible factor hipotético producido por el céstodo podría actuar

sobre el tripanosoma y estimular a éste para un mayor crecimiento, o bien a la posibilidad de que las variaciones en la susceptibilidad observadas pudieran deberse a estados de desnutrición severa. Sin embargo, existen varios argumentos en contra de lo anterior, como son, que no se observó pérdida de peso, linfopenia o anemia en los ratones crónicamente parasitados por lo que la desnutrición severa puede descartarse, en cuanto a la inmunosupresión, se puede decir que hubo producción elevada de anticuerpos específicos, así como de ciertas citocinas como IL-10 e IL-4, por lo que esta posibilidad pierde fuerza. Esto último contrasta con lo que sucede en otras coinfecciones, en donde como una consecuencia de la infección por VIH (Rosenthal et al., 1996) se observa un aumento en la incidencia de otras enfermedades, esto sí puede explicarse por la inmunosupresión concomitante inducida por el virus. Con respecto a un posible "factor" liberado por el cisticerco y que facilite el crecimiento de *T. cruzi*, queda en duda, sin embargo si esto fuera relevante entonces el incremento en la parasitemia debería haberse observado desde las coinfecciones tempranas. Por último una posibilidad más es que los ratones crónicamente infectados pudieran considerarse en estado de estrés por la presencia constante del parásito, lo cual podría generar un aumento en los niveles de glucocorticoides y estos a su vez inducir una inhibición de la respuesta inmune. Sin embargo, como se explicó arriba, no existe tal inmunosupresión.

Por todo lo anterior, es importante entonces remarcar que los resultados de este trabajo indican que no es necesario que exista una inmunosupresión para que aumente en el huésped la susceptibilidad a otro patógeno, sino que basta la capacidad que tiene una infección inicial de influir sobre la producción de citocinas (de tipo Th1 ó Th2) para que se modifique la resistencia o susceptibilidad, así como la respuesta inmune generada a un reto antigénico subsecuente. En tal caso la modificación de la capacidad inmune de un individuo crónicamente infectado, como sucede en los países y en las poblaciones en donde las infecciones por helmintos son frecuentes, podría tener repercusiones epidemiológicas trascendentes e incluso podría representar un problema de salud pública más importante que el reconocido hasta ahora.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de este trabajo de tesis se puede concluir lo siguiente :

- La infección aguda con *Trypanosoma cruzi* (cepa Ninoa) en ratones Balb/c se caracteriza por una proliferación celular disminuida, niveles bajos de IL-2, niveles elevados y constantes de IFN- γ , y producción tardía de IL-4.
- La infección aguda con *Trypanosoma cruzi* es un ejemplo de que pueden coexistir, al menos por algún tiempo, los dos tipos de respuestas (Th1/Th2), y que no son excluyentes una de la otra como ha sido dogmatizado.
- La presencia de un parásito no relacionado (*T. crassiceps*, helminto) modifica la susceptibilidad a la infección posterior por *T. cruzi*.
- La coinfección con *T. cruzi* en etapas tempranas, 2-4 semanas después de la infección de *T. crassiceps*, provoca un retraso en el inicio de la parasitemia.
- La coinfección con *T. cruzi* en etapas tardías, 8-12 semanas después de la infección de *T. crassiceps*, provoca un aumento significativo en la susceptibilidad a *T. cruzi*.
- Los cambios inmunológicos generados por la infección crónica por *T. crassiceps* modifican la respuesta inmune en contra de *T. cruzi* : la coinfección a las 8-12 semanas genera una respuesta inmune específica diferente a la de la coinfección a las 2-4 semanas, fundamentalmente con niveles disminuidos de IL-12, de IFN- γ y de óxido nítrico.
- Si la respuesta inmune tipo Th1 es la protectora en contra de *T. cruzi* queda aún por definirse.
- Los mecanismos que generan el incremento en la susceptibilidad a *T. cruzi* durante las coinfecciones tardías no están del todo establecidos, pero es obvia la participación del microambiente de citocinas establecido previamente : una respuesta inmune de tipo Th2 (bajos niveles de IFN- γ y altos de IL-4) facilita la infección por *T. cruzi*.
- Los niveles de anticuerpos de los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b fueron independientes del incremento de la susceptibilidad observada en las coinfecciones tardías.
- El microambiente de citocinas presente *in vivo* es un factor determinante para el tipo de respuesta inmune que se montará en contra de diferentes microorganismos.
- La principal implicación de estos hallazgos es que las infecciones crónicas por helmintos podrían afectar de manera significativa la capacidad de respuesta de los individuos en contra de otros patógenos.

REFERENCIAS

1. Abbas A.K., Burstein H.J., Bogen S.A. (1993). Determinants of helper T cell-dependent antibody production. *Semin Immunol.* 5(6): 441-47.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (1994). *Cellular and molecular Immunology*. Second edition, De. W. B. Saunders Co.; pag 4.
3. Actor J.K., Mutsunori S., Kullberg M., Buller R.M., Sher A., and Berzofsky J.A. (1993). Helminth infection results in decreased virus-specific CD8+ cytotoxic-cell and Th1 cytokine responses as well as delayed virus clearance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 948-952.
4. Afonso L.C.C., Scharon T.M., Vieira L.Q., Wysocka M., Trinchieri G. and Scott P. (1994). The adjuvant effect of Interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science.* 263: 235-237.
5. Bancroft A.J., Else K.J. and Grecis R.K. (1994) Low-level infection with trichuris muris significantly affects the polarization of the CD4 response. *Eur. J. Immunol* 24 : 3113-3118.
6. Bradley L.M., Yoshimoto K., and Swain S. (1995). The cytokines IL-4, IFN- γ , and IL-12 regulate the development of subsets of memory effector helper T cells in vitro. *J. Immunol.* 155 :1713-1724.
7. Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt OH (1992). Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257: 539-542.
8. Bojalil R., Terrazas L.I., Govezenky T., Sciutto E., and Larralde C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol* 179 :384-389.
9. Cardillo F., Voltarelli J., Reed S.G., and Silva J. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection by mice gamma interferon and Interleukin 10: Role of NK cells, *Infect. Immun.* 64:128-134.
10. Chaturvedi P. Yu Q., Southwood S., Sett A., Singh B.(1996). Peptide analogs with different affinities for MHC alter the cytokine profile of T helper cells. *Int Immunol* 8 : 745-755
11. Christop H. Köhler G. Müller U., Mossman H., Schaub G.A., and Brombacher F., (1998). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect. Immun.* 66:1208-1215
12. Churning J. (1997). Common host antigens in laboratory rats infected with the metacestodes of *Taenia crassiceps*. *J. Helminthol.* 51 : 215-220.
13. Chen Y., Kuchroo V. K., Inobel J., Hafler D.A, Weiner H.L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance : suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265 : 1237-1240.

14. Chen Y., Inobe J., Marks R., Gonnella P., Kuchoroo V.K., Weiner H.L. (1995). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*, 376 : 177-180.
15. Clerici M., and Shearer G.M. (1993). A Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14 : 107-111.
16. Constant S., Pfeiffer C., Woodard A., Pasqualini T., Bottomly K. (1995). Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 1995, 182 : 1591-1596.
17. Curry A.J., Else K.J., Jones F., Bancroft A., Grecis R. And Dunne D.W. (1995). Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. *J. Exp. Med.* 181:769-774.
18. De-Magistris MT, Alexander J, Coggeshall M, Altman A, Gaete FCA, Grey HM, Sette A (1992). Antigen analog-major histocompatibility complexes act as antagonists of the T cell receptor. *Cell*, 68 : 625-634.
19. D' Imperio Lima M.R., Joskowics M., Coutinho A., Kipnis T. and Eisen H. (1985). Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* 15: 201-203.
20. Doherty T.M., Kastelein R., Menon S., Andrade S., and Coffman R.L. (1993). Modulation of murine macrophages functions by IL-13. *J Immunol.* 151: 7151-7160
21. Dubey Caroline, Croft Michael and Swain S.L. (1996). Naive and effector CD4 T cells differ in their requirements for T cell receptor versus costimulatory signals. *Immunol.* 157: 3280
22. Else, K.J. and P.K. Grecis (1991). Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunol.* 72: 508-513.
23. Evavold BD, Allen PM (1991). Separation of IL-4 production from Th cell proliferation by an altered T cell receptor ligand. *Science*, 252 : 1308-1310.
24. Finkelman F.D. (1995). Relationship among antigen presentation, cytokines, immune deviation, and autoimmune disease. *J. Exp. Med.* 182:279-282.
25. Finkelman F.D., Shea-Donohue T., Goldhill J., Sullivan C., Morris S., Madden K.B., Gause W.C. and Urban J.F. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes : lessons from studies with rodent models. *Ann. Rev. Immunol* 15 : 505-533.
26. Fiorentino D.F. Zlotnik, Vieira P. Mosmann T.R., Howard M., Moore K.M., O'Garra A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 146:34, 44-51.
27. Gajewski T.F., Schell SR and Fitch F. W. (1990). Evidence implicating utilization of different T cell receptor-associated signaling pathways by Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.*, 144: 4110 .

28. Gajewski F.T., Pinna M, Wong T., and Fitch W.F. (1991) Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J. Immunol*, 146: 1750-1758.
29. Gajewski T.F., Lancki W.D., Risa Stack and Fitch F. W. (1994). Anergy of TH0 helper T lymphocytes induces downregulation of Th1 characteristics and a transition to a Th2-like phenotype. *J. Experim. Med.* 179: 481-491.
30. Gause W. C., Mitro V., Via C., Linsley P., Urban J. F. and Greenwald J. (1997). Do effector and memory cells also need B7 ligand costimulatory signals? *J Immunol.*, 159 : 1055-1058.
31. Gessner A., Blum H, Rollingoff M. (1993). Differential regulation of IL-9 expression after infection with *leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunol*, 189:419-435.
32. Good A., and Miller K., (1976). Depression of immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infect. Immun.* 14 :449-456.
33. Goodman J.W. and Sercarz F.E. (1983). The complexity of structure involved in T-cell activation. *Ann. Rev. Immunol.*, 1:465-498.
34. Golden and Tarleton (1991). *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp. Parasitol.* 72: 391-402.
35. Gorczyns M. R., (1995). Regulation of IFN- γ and IL-10 Synthesis *in vivo*, as well as continuous Antigen Exposure, is Associated with Tolerance to murine Skin Allografts. *Cell. Immunol* 160 : 224-231.
36. Grecis, R.K., L. Huntner, and K.J. Else. (1991). Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: Activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunol*, 74: 329-332.
37. Harding C.V. and Unanue E.R. (1986). Cellular mechanisms of antigen processing and the function of class I and Class II major histocompatibility complex molecules by DNA mediated gene transfer. *Ann. Rev. Immunol.* 4:281-316.
38. Harding F.A., McArthur J.G., Gross J.A., Raulet D.H. and Allison J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356: 607
39. Hermanek J., Goyal P.K., Wakelin D. (1993). Lymphocyte, antibody and cytokine responses during concurrent infections between helminths that selectively promote T-helper-1 or T-helper-2 activity. *Parasite Immunol.* 16: 111-117.
40. Hosken N.A., Shibuya K., Heath A.W., Murphy K.M., O'Garra A.O. (1995). The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor α β -transgenic mouse. *J Exp Med* 182 : 1579-1584.

41. Hölscher C., Köhler G., Müller U., Mossmann H, Schaub G A. and Brombacher F. (1998). Defective nitric oxide Effector Functions Lead to Extreme Susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-Infected mice deficient in gamma Interferon receptor or inducible Nitric Oxide synthase. *Infect. Immun.* P 1208-1215.
42. Hunter C.A., Slifer T., and Araujo F. (1996). Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. *Infect. Immun.* 64 : 2381-2386.
43. Kamogawa Y., Minasi L.R., Carding S.R., Bottomly K., and Flavell R.A. (1993). The relationship of IL-4 and IFN γ -producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. *Cell.* 75:985-995.
44. Kemp M., Kurtzhals J.A., Kharazmi A., Theander T.G. (1993). Interferon gamma and interleukin-4 in human *Leishmania donovani* infection. *Immunol. Cell Biology.* 71:583-587.
45. Kierzenbaum H., Mejia Lopez H., and Szein M.B. (1994). Inhibition of *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. *Immunol.* 82:462-467.
46. Kullberg M.C., Berzofsky J.A., Jankovic D.L., Barbieri S, Williams M.E., Perlmann P, Sher A, Troye-Blomberg T. (1996). T-cell derived IL-3 induces the production of IL-4 by non-B non-T cells to amplify the Th2-cytokine response to a non-parasite antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol* 156:1482-1489.
47. Kullberg M.C., Pearce E.J. Hieny S.E., Sher A., Berzofsky J.A. (1992). Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. *J. Immunol.* 148: 3264-3270.
48. Kuchroo V.K., Das M.P., Brown J.A., Ranger A.M., Zamvil S.S., Sobel R.A., Weiner H.L. Nabavi N. and Glimcher L.H. (1995). B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell* 80: 707-715
49. Kumar V., Bhardwaj V., Soares L., Alexander J., Sette A., Sercarz E (1995). Major histocompatibility complex binding affinity of an antigenic determinant is crucial for the differential secretion of interleukin 4/5 or interferon gamma by T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 : 9510-9514.
50. Larralde C., Sciutto E., Huerta L., Terrazas L. I., Fragoso G., Trueba L., Iemus D., Lomeli C., Tapia G., Montoya R. M., Diaz M.L. and Govezensky T., (1989). Experimental Cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leindensia* 57(2) 131-134.
51. Larralde C., Padilla A. Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepulveda J., (1992) Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud pública Mex.* 314 :197-210
52. Lawrence R.A., Allen J.E., Gregory W.F., Kopf M., Maizels R.M. (1995). Infection of IL-4-deficient mice with parasitic nematode *Brugia malayi* demonstrates that host resistance is not dependent on a T helper 2-dominated immune response. *J Immunol.* 154: 5995-6001.

53. Lenschow D.J., Walunas T. L. and J. A. Bluestone (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. Annual Rev. Immunol. 14 : 233-258.
54. Liblau R.S., Singer S.M., and McDevitt H.O. (1995). Th1 and Th2 ^{CD4+} T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. Immunol. Today 16 : 35-38.
55. Lichtman A.H., Chin J., Schmidt J.A, and Abbas A.K. (1988). Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 9699.
56. Lindsay B., Nicholson and Vijay K Kuchroo (1996). Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. Curr Opin Immunol. 8 :837-842.
57. Louis J.A. (1993). Importance of the different T lymphocytes subsets in immunity of mice against an intracellular protozoan parasite: *Leishmania major*. Pathol Biol (Paris) 41 :812-816.
58. Maggi E., Parronchi P., Manetti R., Simonelli C., Piccinni M.P., Santoni F., et al. (1992) Reciprocal regulation effects of IFN- γ and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. J. Immunol. 148 : 2142-2147.
59. Magram J., Connaughton S.E., Rajeev R.W. et al. (1996). IL-12 deficient mice are defective in IFN- γ production and type 1 cytokine responses. Immunity. 4:471-481.
60. Magram J, Connaughton ES, Warriar RR, Carvajal DM Chang-you Wu, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faheerty DA and Gately MK (1996). IL-12- Deficient mice are defective in IFN- γ production and type cytokine responses. Immunity, Vol. 4, 471-481
61. Martin D.J., Slim J.G. Sole G.J., et al. (1995). CD4⁺ Lymphocyte count in African patients co-infected with HIV and Tuberculosis. JAIDS Hum . Retrovirol. 8:386-391.
62. Mc Arthur J.C. and Raulet D.H. (1993) J. Exp Med. 178: 1645
63. McKnight A.J. Perez V.L. Shea C.M. Gray G.S. and Abbas A.K. (1994) J. Immunol 152: 5220
64. Migliorini P., Corradin G. and Corradin S. B. (1991). Macrophage NO₂ - production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- γ . J. Immunol. Meth. 139; 107-114.
65. Mossman T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A. and Coffman RL. (1986). Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J. Immunol. 136: 2348-2358.
66. Mossman T. R. and Coffman R.L. (1987). Two types of mouse helper T-cell clone. Immunology Today. 8:223-226
67. Mossman T. R. and Coffman R.L. (1989). Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annu. Rev. Immunol. 7: 145

68. Miralles G.D., Stoeckle M.Y., McDermontt, D.F. Finkelman I.D., Murray H.W. (1994). Th1 and TH2 cell associated cytokines in experimental visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62:1058-1063.
69. Nabors S.G., Nolan T., Croop W., Li J., and Farrell P.J. (1995). The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune response in (BALB/c x C57BL/6 F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol* 17: 569-579
70. Nicholson L.B., Geer J.M., Sobel R.A., Lees M.A., Kuchro V.K. (1995). An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents experimental autoimmune encephalo myelitis. *Immunity* 3: 397-405
71. Nicholson L.B. and Kuchroo V.K. (1996). Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr. Op. Immunol.* 8 : 837-842.
72. Nossai J.V. (1993). Life, death and the immune system. *Scientific American*
73. Oswaldo I.P., Gazzinelli R.I., Sher A., and James S.L. (1992). IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophages cytotoxic activity. *J. Immunol.* 148:3578
74. Pearlman E., Kazura W.J., Hazlett E.F., and Boom H.W. (1993). Modulation of murine cytokine responses to mycobacterial antigens by helminth-induced T helper 2 cell responses. *J. Immunol* 151: 4857-4864.
75. Pearce E.J., Reiner S.L. (1995). Induction of Th2 responses in infectious diseases. *Curr. Op. Immunol.* 7: 497-504.
76. Pond L., Wasson D.L., and Hayes C.E. (1989). Evidence for differential induction of helper T. cell subsets during *Trichinella spiralis* infection. *J. Immunol* 143: 4232-4237.
77. Pritchard D.I. (1995). The survival strategies of hookworms. *Parasitol Today.* 11: 255-259.
78. Ranke M.K., Scott D.E., Quigley L., Gray G.S., Abe R., June C.H. and Perrin P.J. (1995). *L. Clin. Invest.* 96 : 2195.
79. Reiner S.L., Zheng S., Wang Z., Stowring L., and Locksley R.M. (1994). *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection. *J. Exp. Med.* 179: 447-456.
80. Rosenthal E., Marty P., Poizat-Martin I., Reynes J., et al. (1996). Visceral Leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89: 159-162.
81. Sciutto E., Fragoso G., Díaz M.L., Valdés F., Lomet C. Govezensky T., Montoya R.M., and Larralde C., (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis : H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Research* 77 :243-246.
82. Scott P. (1991). IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous Leishmaniasis *J. Immunol* 147 :3149.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

83. Sloan-Lancaster J, Evavold Bd, Allen PM (1993). Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature*, 363 : 156-159.
84. Smilek D., Wraith DC, Hodgkinson S, Dwivedy S, Steinman L, McDevitt HO (1991). A single amino acid change in a myelin basic protein peptide confers the capacity to prevent rather than induce experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88 : 9633-9637
85. Silva J.S., Morrissey P.J., Grabstein K.H. Mohler K.M., Anderson D., and Reed S.G. (1992). Interleukin 10 and Interferon γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Exp. Med.* 175 : 169-174.
86. Spinella S., Milon G. and Hontebeyrie-Loulcowiez M. (1990). A CD4+ Th2 cell line Isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response *in vivo*. *Eur. J. Immunol* 20 :1045-1051.
87. Stevenson MM., and Tam F. (1993) Differential induction of helper T cell subsets during blood stage *Plasmodium chabaudi* as infection in resistant and susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.* 92 : 77-83.
88. Svetic A., Madden KB., Zhou X., Lu P., Katona I.M., Finkelman F.D. (1993). A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J. Immunol.* 150 : 3434-3441.
89. Tarleton R.L. (1991). Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 73 : 106-109.
90. Terrazas L.J., Bojalil R., Morales J., Govezensky T. and Larralde C. (1998). Shift from an early protective TH1, response to late permissive TH2 response to a murine extracellular parasite. *J. Parasitol.* 84: 74-81.
91. Torrico F., Heremans H., Rivera M.T., Van Marck E., Billiau A., and Carlier Y. (1991). Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J. Immunol.* 146 : 3626-3632.
92. Trinchieri G., (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions the bridge innate resistance and antigen specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251-276
93. Wraith DC, Smilek DE, Mitchell DJ, Steinman L, Mc Devitt HO (1989): Antigen recognition in autoimmune encephalomyelitis and the potential for peptide- mediated immunotherapy. *Cell* 59 : 247-255.
94. Wraith DC, McDevitt HO, Steinman L, Acha-Orbea H (1989). T cell recognition as the target for immune intervention in autoimmune disease. *Cell* 57 :709-715
95. Wauben MHM, Boog CJP, Van der Zee R, Joosten I, Schhief A, Van Eden W (1992). Disease inhibition by major histocompatibility complex binding peptide analogues of disease-associated epitopes : more than blocking alone. *J. Exp Med*; 176: 667-677
96. Wynn T.A., Jankovic D., Hieny S., Zioncheck K., Jardieu P., Cheever A.W., Sher, A. (1995). IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN- γ . *J. Immunol.* 154: 399-4009.

97. Zhang L. and Tarleton L. R. (1996) Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry : lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol.* 26:102-109.