

300627
2



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**“ANALISIS DE LA RESPUESTA DE PROLIFERACION
CELULAR DE PACIENTES CON NEUROCYSTICERCOSIS Y
OBTENCION DE LINEAS DE LINFOCITOS T ANTIGENO -
ESPECIFICAS”**

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

PRESENTA

MONICA HERNANDEZ MONDRAGON

ASESORA DE TESIS
DRA. MA. DOLORES CORREA BELTRAN

MEXICO, D.F.

273257
2000



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.

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la **Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán** y con la asesoría de la **M. en C. Ma. Edith Medina Escutia** y la **M. en C. Zoila Morales López** en el **Departamento de Biotecnología del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Dr. Manuel Martínez Báez (INDRE, SSa)**, en colaboración con el **Dr. Jefferson Proaño** de la **Unidad de Investigaciones Neurológicas del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI**.

El trabajo fue apoyado por el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** en el programa de financiamiento a la investigación, dentro del **proyecto No. 1387/M9507** titulado "Análisis de la respuesta inmune celular y la relación Th1/Th2 en la Neurocisticercosis humana".

A Dios y a María,

a mi Papá y a mi Mamá,

a mis hermanas Claudia, Jéssica y Mariana,

a Lobsang,

a TODA mi Familia, pero sobre todo a Bertha, Aída, mi Abuela, Con,
mi abuelita Tere y mis abuelitos Trino y Raúl.

¡ Gracias por estar, de verdad los quiero mucho !

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad La Salle,

a todos mis maestros, compañeros
y gente linda que conocí durante mi estancia en la Escuela,

a Lola, Zoila y Edith,

a todo el Departamento de Biotecnología del I.N.D.R.E.,
sobre todo a Yola y a Ame,

al Centro Médico Nacional Siglo XXI, al Hospital de la Mujer,
al Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M. y al CONACYT,

a mis sinodales Lupita Morales, José Antonio García,
Ma. Dolores Correa, Enrique Calderón y Mariano Ramírez,

a mis amigas Dina, Cris, Caro y Marisol.

Con todo mi cariño y respeto.

RESUMEN

CAPÍTULO I.

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

| | |
|---|----|
| 1.1. Morfología y ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> | 1 |
| 1.2. Manifestaciones clínicas | 5 |
| 1.3. Tratamiento | 5 |
| 1.4. Diagnóstico | 5 |
| 1.5. Epidemiología | 6 |
| 1.6. Relación hospedero-parásito | 7 |
| 1.6.1. La respuesta inmune | 7 |
| 1.6.1.1. La respuesta de la fase aguda | 8 |
| 1.6.1.2. Activación de los linfocitos T cooperadores | 8 |
| 1.6.1.2.1. Activación de los linfocitos ThP | 9 |
| 1.6.1.2.2. Activación de los linfocitos Th0 | 10 |
| 1.6.1.2.3. Diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2 | 10 |
| 1.6.1.3. Mecanismos efectores de la inmunidad | 12 |
| 1.6.1.3.1. Inmunidad mediada por células | 12 |
| 1.6.1.3.2. Inmunidad mediada por anticuerpos | 14 |
| 1.7. Respuesta inmunológica en la cisticercosis | 15 |
| 1.8. Antígeno B | 17 |

CAPÍTULO II.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

| | |
|--------------------|----|
| 2.1. Justificación | 18 |
|--------------------|----|

| | |
|----------------|----|
| 2.2. Objetivos | 19 |
|----------------|----|

CAPÍTULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

| | |
|---|----|
| 3.1. Grupo de estudio | 20 |
| 3.2. Métodos | 20 |
| 3.2.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica | 20 |
| 3.2.2. Ensayos de proliferación celular | 21 |
| 3.2.3. Generación de líneas celulares linfoblastoides por transformación con el virus de Epstein-Barr | 23 |
| 3.2.4. Producción de líneas celulares antígeno-específicas | 23 |

CAPÍTULO IV.

RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 4.1. Ensayos de proliferación celular | 24 |
| 4.2. Producción de líneas de linfocitos T antígeno-específicas | 32 |
| 4.3. Análisis estadístico de resultados | 33 |

CAPÍTULO V.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

| | |
|-------------------|----|
| 5.1. Discusión | 34 |
| 5.2. Conclusiones | 37 |

| | |
|---------------------|----|
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |
|---------------------|----|

Las infecciones parasitarias generalmente tienden a ser crónicas, por lo que el hospedero presenta cambios inmunopatológicos que dependen de la magnitud y duración de la infección.

Los linfocitos T y B son las células antígeno-específicas del sistema inmune, por lo que requieren de la estimulación del antígeno para su activación, es decir, para que ocurra una respuesta específica a patógenos o sustancias extrañas se requiere que los receptores de estas células reconozcan al antígeno. La respuesta inmune comienza con la activación de los linfocitos T cooperadores, éstos progresan de células precursoras que nunca habían sido activadas por un epítipo a células activadas que secretan factores solubles denominados interleucinas. La inmunidad y la patología se controlan mediante estas interleucinas, ya que regulan la amplitud y la duración de las respuestas inflamatorias inmunitarias, tienen múltiples efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de numerosos tipos celulares y controlan la diferenciación de los linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1), que promueven las manifestaciones de la inmunidad mediada por células, o de tipo 2 (Th2), que estimulan la inmunidad mediada por anticuerpos.

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el metacéstodo de *Taenia solium* que afecta particularmente al hombre y al cerdo. El estudio de la respuesta inmunológica en esta parasitosis se ha enfocado al análisis de la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos.

Para evaluar la cinética de respuesta proliferativa de las células de pacientes con neurocisticercosis (NCC) se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica y se realizaron análisis de proliferación celular ante un estímulo con un

extracto crudo (EC) del cisticerco, un antígeno puro (AgB) y un mitógeno no específico, encontrando que la respuesta inmune celular de los pacientes con NCC no se encuentra deprimida y que además responden específicamente ante el estímulo con el EC del cisticerco de la *Taenia solium*.

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria, causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, este parásito afecta particularmente al ser humano y al cerdo.

Este padecimiento es conocido desde la antigüedad, probablemente los primeros testimonios que lo relacionan con el hombre se remontan a la época bíblica donde Moisés, por instrucciones médicas de los egipcios, dictó leyes sanitarias de protección contra la carne de animales infectados con "piedras" perjudiciales para la salud. En Grecia, Aristóteles observó el parásito en la lengua del cerdo, describiéndola como semejante al granizo. No fue sino hasta 1558 cuando Yessner y Rumbler encontraron al parásito en el ser humano (revisado en 52).

El cisticerco en el ser humano se localiza principalmente en el sistema nervioso central y los síntomas que presentan los pacientes son diversos. Se cree que la heterogeneidad se debe a que se pueden encontrar cisticercos vivos y/o calcificados, y la reacción inflamatoria puede variar entre hospederos y entre parásitos del mismo hospedero (13).

1.1. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*.

Taenia solium, llamada comúnmente solitaria, es un céstodo hermafrodita, de la familia *Taeniidae*. Se desarrolla naturalmente en el intestino delgado del ser humano después de que éste ingiere carne de cerdo mal cocida infectada con el cisticerco. Este parásito tiene cuerpo aplanado y alargado que mide de 4.0 a 6.0 metros y consta de 3 partes: escólex (cabeza), cuello y estróbilo. El escólex mide aproximadamente 1 mm de diámetro, en él se encuentra el ganglio nervioso del parásito; presenta 4 ventosas musculares como órganos de fijación y un rostelo con una doble corona de ganchos. Continúa con el cuello que es delgado, corto y

no segmentado. El estróbilo presenta una serie de segmentos llamados proglótidos; puede presentar tres tipos de proglótidos: inmaduros, maduros y grávidos, estos últimos pueden contener hasta 50,000 huevecillos. Los proglótidos grávidos se desprenden del gusano adulto y salen junto con las heces del hospedero. Los huevecillos son liberados al ambiente, donde pueden sobrevivir durante varios meses, pudiendo de esta forma ser ingeridos por el hombre o por el cerdo. Los huevecillos inmaduros se encuentran rodeados por una membrana hialina llamada vitelo, que rodea al embrióforo, éste consta de una serie de bloques proteicos que se encuentran unidos entre sí por una proteína cementante. En la parte interna se encuentra la membrana oncosferal, que cubre a la oncosfera o embrión hexacanto (34). *FIGURA 1.1.*

Cuando el cerdo o el ser humano ingieren los huevecillos, al llegar al estómago éstos quedan bajo la acción de las enzimas gástricas. Éstas rompen a la proteína cementante y a la membrana oncosferal, liberándose así el embrión hexacanto, el cual se adhiere y penetra la pared intestinal hasta llegar al torrente circulatorio o linfático. El embrión hexacanto llega al músculo, al tejido subcutáneo, al ojo o al sistema nervioso, y después de perder su membrana, se desarrolla hasta formar el cisticerco (60). *FIGURA 1.1.*

Los cisticercos son blancos y ovoides, miden aproximadamente 5 x 10 mm. Cada cisticerco está compuesto por una pared que contiene un fluido vesicular y el escólex invaginado, ya se distinguen el rostelo, la corona de ganchos y las cuatro ventosas. *FIGURA 1.1.*

Accidentalmente el ser humano puede actuar como hospedero intermediario del metacéstodo de *T. solium* (47) debido a la ingestión de huevecillos en la comida o en el agua contaminada por heces humanas (60). *FIGURA 1.1.*

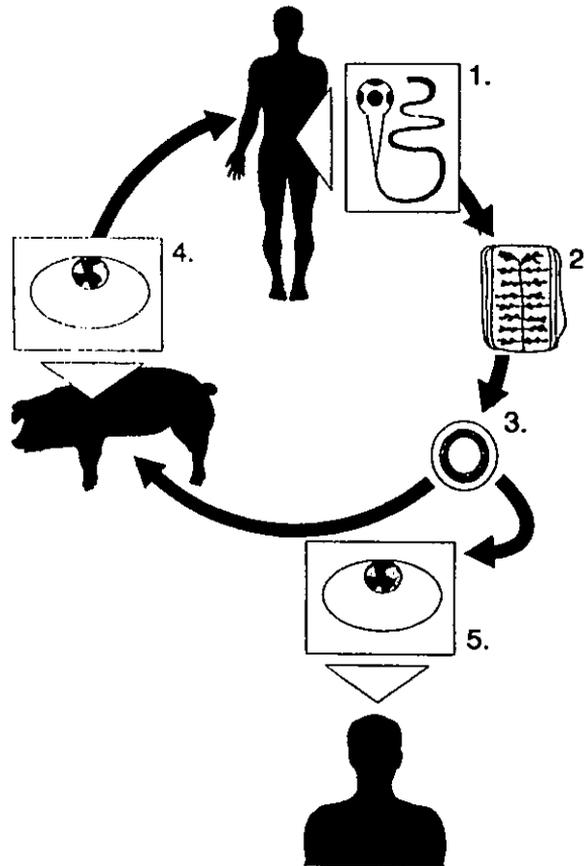


FIGURA 1.1. Ciclo de vida de *Taenia solium* : 1=Adulto, 2=Proglótido grávido, 3=Huevos, 4=Cisticerco en el cerdo, 5=Cisticerco en el humano.

La presencia de cisticercos en el sistema nervioso central (SNC), conocida como neurocisticercosis (NCC) es la patología más seria y el hecho de que éstos se localicen en un sitio inmunológicamente privilegiado, les permite sobrevivir por muchos años (19).

La localización de los cisticercos en el SNC puede ser el parénquima, el espacio subaracnoideo o los ventrículos. Los síntomas de la patología no son específicos y varían de acuerdo al número de cisticercos presentes, a su localización y al estado evolutivo del parásito (17). En el ser humano pueden encontrarse cisticercos en diferentes estados de desarrollo: juveniles, maduros o viejos; intactos, degenerados o muertos. Los cisticercos intactos provocan una reacción inflamatoria leve, los rodea una membrana de tejido conectivo que está formada por células epiteliales, fibras de colágena y una ligera infiltración celular, en donde predominan células plasmáticas y eosinófilos (60). La membrana de tejido conectivo permite el paso de nutrientes, metabolitos y materiales inmunogénicos. Los cisticercos degenerados o muertos causan una reacción inflamatoria más severa, ocurre una respuesta granulomatosa compuesta por células plasmáticas, linfocitos, eosinófilos y macrófagos que rodean al cisticerco y posteriormente las células del hospedero calcifican al remanente del parásito (60).

1.2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

Algunos casos de NCC humana son asintomáticos y sólo son identificados en necropsias. Los casos sintomáticos pueden presentar una amplia variedad de manifestaciones clínicas, los principales signos que caracterizan la sintomatología de la NCC son crisis convulsivas, cefalea, hipertensión endocraneana y alteraciones psiquiátricas. La presencia de cisticercos intracraneales se asocia frecuentemente con vómito, cefalea y trastornos visuales. Estos síntomas pueden presentarse solos o en combinación (42, 55).

1.3. TRATAMIENTO.

Anteriormente la intervención quirúrgica era el único tratamiento disponible contra la NCC y hasta hace pocos años, únicamente se trataban los síntomas (37). Con el desarrollo de drogas cestocidas, se abrió la posibilidad de tratar la enfermedad en forma no invasiva, actualmente se cuenta con dos medicamentos de administración oral disponibles en el mercado: el albendazol y el praziquantel (16, 48). Se han sugerido diferentes esquemas de dosificación con el empleo concomitante o no de corticoesteroides (42, 60).

1.4. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico clínico debe apoyarse con estudios de imágenes como la tomografía computada y la resonancia magnética (60). Estos métodos permiten identificar casos quísticos sin necesidad de intervenciones quirúrgicas, pero desafortunadamente son inaccesibles para la mayoría de la población debido a su alto costo. Por lo anterior, desde hace varias décadas se han estandarizado

métodos inmunológicos para identificar la presencia de anticuerpos contra el cisticerco en el suero y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con NCC (18, 50). Sin embargo, los anticuerpos únicamente indican que el sistema inmune del hospedero ha tenido contacto con el parásito y no necesariamente indican que se trate de una infección activa (7). Actualmente se realizan métodos para buscar antígenos del cisticerco en el LCR o materia fecal de pacientes con cisticercosis. La presencia de estos antígenos indica que se trata de una infección activa y se puede dar seguimiento al tratamiento médico adecuado (9).

1.5. EPIDEMIOLOGÍA.

La taeniosis y la cisticercosis son problemas de salud pública que prevalecen en áreas urbanas, pero especialmente en rurales, y se asocian a la crianza de cerdos en malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza (53).

La NCC se trata de una enfermedad endémica no solamente en países en desarrollo, también ocurre en países desarrollados con alta afluencia de inmigrantes de áreas endémicas (17). Una de las áreas que particularmente afecta es Latinoamérica, dentro de la cual, México y Brasil son los países que informan las frecuencias más altas (49, 53).

Los primeros estudios para conocer la frecuencia de neurocisticercosis se realizaron en hospitales mediante necropsias. En los estudios hospitalarios, México informó frecuencias de hasta 8.6% de los hospitalizados, y en las series de necropsias, se ha reportado una prevalencia de alrededor del 2%. Actualmente, las estadísticas oficiales informan un promedio anual de 500 casos de cisticercosis, con una tasa nacional cruda de 0.6 por cada 100,000 habitantes. No existen diferencias por sexo y el grupo más afectado es el de 15 a 44 años de

edad, que representa al grupo de edad económicamente activa, lo que trae consigo incapacidad para desarrollar actividades normales y productivas, teniendo consecuencias económicas para la familia y la sociedad (53). Conforme a la distribución de casos registrados de taeniosis/cisticercosis humana y porcina en México, 15 estados (47%) del territorio nacional se ubican bajo emergencia epidemiológica, se identifica que los casos de cisticercosis en humanos y porcinos son focales y están relacionados con la presencia de portadores de *Taenia solium* (40, 53).

1.6. RELACIÓN HOSPEDERO - PARÁSITO.

1.6.1. LA RESPUESTA INMUNE.

La respuesta a la invasión parasitaria comienza con una reacción inespecífica de los tejidos del hospedero al estímulo mecánico o bioquímico representado por el parásito (respuesta de la fase aguda). Esta respuesta juega un papel muy importante en la destrucción de los parásitos y en el inicio de la respuesta inmune específica que empieza con la activación de los linfocitos T cooperadores (Th) y la diferenciación de éstos en linfocitos de tipo 1 o de tipo 2 (14). Éstos estimulan el desarrollo de los mecanismos efectores de la inmunidad mediada por células o por anticuerpos. El parásito presenta diferentes mecanismos para evadir el ataque del hospedero (39) mientras se mantiene en equilibrio la relación hospedero - parásito (5). Finalmente la respuesta inmune llega a una etapa de resolución con la eliminación del parásito o la muerte del hospedero.

1.6.1.1. LA RESPUESTA DE LA FASE AGUDA.

La respuesta de la fase aguda es una reacción del hospedero a los cambios en su homeostasis fisiológica, por la invasión de un parásito. Puede ser que el parásito sea lo suficientemente grande como para ocasionar daño mecánico a los tejidos o que sus secreciones y excreciones produzcan cambios bioquímicos. Se caracteriza porque los macrófagos y otras células reaccionan produciendo citocinas que promueven la producción de moléculas de adherencia intracelular de los endotelios, inducen una permeabilidad vascular aumentada, atraen neutrófilos, monocitos, macrófagos, basófilos y eosinófilos, provocan la multiplicación y activación de los linfocitos y de las células asesinas naturales. El parásito se rodea de un infiltrado inflamatorio rico en células fagocitarias (neutrófilos y macrófagos), citotóxicas (células asesinas naturales), factores plasmáticos (complemento y anticuerpos) y células inmunes (células presentadoras de antígeno y linfocitos). Esta reacción temprana e inespecífica se denomina respuesta de la fase aguda (4, 30).

1.6.1.2. ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T COOPERADORES (Th).

La respuesta inmune comienza con la activación de los linfocitos T cooperadores (Th) que pueden ser identificados por la presencia de una molécula en su superficie conocida como proteína CD4. Durante esta fase, los linfocitos T cooperadores progresan de células precursoras (ThP), que nunca habían sido activadas por un epítipo, a células activadas (Th0); éstas secretan citocinas y pueden estimular tanto a la inmunidad mediada por células como a la inmunidad mediada por anticuerpos. Las células activadas se diferencian hacia linfocitos T cooperadores de tipo 1 (Th1), que secretan citocinas asociadas con la inflamación y promueven las manifestaciones de la inmunidad mediada por células, o de tipo

2 (Th2), que producen citocinas que ayudan a proliferar y diferenciar a las células B y estimulan la inmunidad mediada por anticuerpos (8, 14, 45).

1.6.1.2.1. Activación de los linfocitos ThP.

Muchos de los macrófagos reclutados durante la respuesta de la fase aguda actúan como células presentadoras de antígeno (CPA). Estas células ingieren al parásito completo o sus proteínas y las digieren en pequeños fragmentos (epítomos) en sus lisosomas. Aquellos epítomos afines a las proteínas de histocompatibilidad de clase II se combinan con ellas, el complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) migra a la superficie de la CPA. Cuando este complejo encuentra a un linfocito Th con un receptor de células T (RCT), éste se une al MHC-II. Las proteínas CD3 y CD4 que rodean al RCT estabilizan la unión y ayudan a la transmisión de señales al interior del linfocito. Estos contactos activan a la CPA, pero no son suficientes para activar al linfocito Th, éste aún necesita de la acción de las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6) producidas por la CPA activada, y de la unión de la proteína de superficie B7 de la CPA con la proteína de superficie CD28 del linfocito; entonces el linfocito Th es activado. La activación de una célula implica que la célula incremente capacidades previas o adquiera nuevas. En el caso de la CPA, la activación significa que esta célula empiece a secretar IL-1, IL-6 e IL-12. La IL-1 contribuye a la activación de los linfocitos Th, estimula la actividad de los macrófagos, células asesinas naturales, mastocitos, linfocitos B y contribuye a la respuesta de la fase aguda. La IL-6 contribuye a la activación de los linfocitos Th, promueve la proliferación y diferenciación de linfocitos B y proteínas de la fase aguda. La IL-12 estimula la actividad de las células asesinas naturales y es una señal importante para el desarrollo de Th1, las condiciones que inducen Th2 causan decremento de la señal de la IL-12, permitiendo la temprana estabilidad de Th2 (29).

Al activarse las células ThP producen IL-2 y el receptor para la IL-2 en su superficie. La unión de la IL-2 con sus receptores estimula la multiplicación de las células ThP y su diferenciación hacia linfocitos Th activados.

1.6.1.2.2. Activación de los linfocitos Th0.

Si el parásito sobrevive a la respuesta inespecífica, sus antígenos pueden estimular nuevamente a los linfocitos Th0 que ya habían experimentado este contacto como linfocitos ThP. Esta vez, los linfocitos Th0 producen ILs 2, 3, 4, 5, 9 y 10 e interferón-gamma (IFN- γ). La IL-2 y el IFN- γ estimulan la proliferación y activación de macrófagos, linfocitos y células asesinas naturales. El IFN- γ , además, activa a los linfocitos T citotóxicos. Todas estas células se consideran elementos efectores de la inmunidad mediada por células. La IL-3 estimula la hematopoyesis. Las ILs 4, 5 y 9 estimulan la producción de anticuerpos, eosinófilos y mastocitos, que se consideran elementos efectores de la inmunidad humoral. El IFN- γ y la IL-10, además, son elementos de balance: el primero promueve el desarrollo de las células Th1, junto con la IL-12 (29), y el segundo el de las células Th2. La activación de las células Th0 parece ser un paso intermediario de organización de la respuesta inmune y el primer ataque específico contra el parásito.

1.6.1.2.3. Diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2.

Las células Th1 producen IL-2, IFN- γ y factor necrosante de tumores- β (TNF- β) que son activadoras de la inmunidad mediada por células (macrófagos, linfocitos T citotóxicos, células asesinas naturales) e inhibidoras de la inmunidad humoral. Las células Th2 producen ILs 4, 5, 6, 9, 10 y 13 que son activadoras de la

inmunidad humoral (linfocitos B, IgM, IgG, IgE, IgA, mastocitos y eosinófilos) e inhibitoras de la inmunidad mediada por células. Ambos tipos de linfocitos producen también IL-3, que mantiene el reclutamiento de células hematopoyéticas durante la respuesta inmune (45). No se sabe cuáles son los factores que determinan la diferenciación de los linfocitos Th0 (24). Aunque hay algunos factores que tienen alguna influencia en la predominancia de una respuesta de células Th1 o Th2 (8, 29). En ratones, parece haber un factor genético que influye en la selección de la respuesta. Por ejemplo, algunas cepas de ratones (BALB/c) responden a un parásito (*Leishmania*) predominantemente con proliferación de células Th1, mientras que otras cepas (C57BL/6) responden al mismo parásito con proliferación de células Th2 (25, 41). El estímulo antigénico parece jugar un papel importante en la selección. Por ejemplo, en ratones, los adultos de *Schistosoma mansoni* inducen respuesta Th1, mientras que la postura de huevos desencadena respuesta Th2 (15).

Las CPA también parecen jugar un papel importante en la diferenciación, ya que producen IL-10, que inhibe la secreción de IFN- γ e IL-12, y esta última promueve la secreción de IFN- γ . Por otra parte, las CPA que procesan antígenos inductores de alergias tienden a estimular la formación de linfocitos Th2 (que producen la IL-4 necesaria para la producción IgE) (6). La ingestión de protozoos completos (parasitismo intracelular) comúnmente resulta en una respuesta inmune mediada por células, que es generada por los linfocitos Th1, mientras que la ingestión de antígenos solubles (parasitismo extracelular) resulta en una respuesta de anticuerpos, que es generada por los linfocitos Th2 .

1.6.1.3. MECANISMOS EFECTORES DE LA INMUNIDAD (3).

Los mecanismos efectores de la inmunidad son la inmunidad mediada por células y inmunidad mediada por anticuerpos.

1.6.1.3.1. *Inmunidad mediada por células.*

La producción de IFN- γ , IL-2 y TNF por los linfocitos Th1 estimula el desarrollo de cuatro mecanismos efectores de la inmunidad mediada por células: producción de células asesinas naturales (NK), producción de macrófagos activados (M ϕ), producción de células efectoras de la inmunidad mediada por células dependiente de anticuerpos (eosinófilos) y producción de linfocitos T citotóxicos.

Citotoxicidad mediada por NK.- Las células asesinas naturales son linfocitos grandes y granulares que no poseen los marcadores característicos de células T o B. Su actividad se incrementa con IFN- γ o IL-2. Las células NK pueden destruir algunas células autólogas defectuosas sin activación previa, por contacto y lisis similares a las observadas con los linfocitos T citotóxicos. Las células NK parecen proveer protección inespecífica mientras se desarrollan las respuestas específicas por células T citotóxicas.

Inmunidad mediada por macrófagos activados.- Es la inmunidad mediada por macrófagos que fagocitan y destruyen al patógeno y que, a veces, dañan la estructura de los tejidos del hospedero. Los anticuerpos específicos contra el patógeno y algunos factores del complemento activado (C3b, C4b) facilitan la fijación de los macrófagos sobre el parásito (opsonización) y la fagocitosis. Mediante el estallido respiratorio, los macrófagos forman radicales de oxígeno y nitrógeno altamente oxidantes con capacidad para alterar las proteínas, lípidos y

ácidos nucleicos de las células en su proximidad.

Inmunidad mediada por linfocitos T citotóxicos.- Los linfocitos T citotóxicos (Tc) comúnmente se identifican por la presencia de la proteína CD8 en sus membranas externas. Estas células están especializadas para responder a las infecciones intracelulares y a los tumores. A menudo un parásito intracelular interfiere con el metabolismo de la célula hospedero y la dirige a sintetizar epítomos que no estaban presentes en el organismo previamente. Estos epítomos se unen dentro de la célula a las proteínas de histocompatibilidad de clase I y forman MHC-I que se expresan en la superficie de la célula parasitada. Cuando este complejo encuentra un linfocito Tc precursor, se unen y, con la asistencia de otras citocinas producidas por los Th1, activan al linfocito Tc. Como consecuencia de esta activación, el linfocito Tc produce receptores para la IL-2 y la combinación subsecuente con esta interleucina induce la multiplicación y la diferenciación del linfocito Tc hacia una célula efectora. Cuando los RCT de estos linfocitos efectores se combinan de nuevo con el MHC-I sobre una célula parasitada, los linfocitos liberan proteínas perforadoras (perforinas) y TNF.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos.- En contraste con las células NK, los macrófagos y los linfocitos Tc, que destruyen a los parásitos o a las células parasitadas sin la ayuda de anticuerpos, existen otras células que poseen una toxicidad potencial contra los parásitos, pero que necesitan de la ayuda de anticuerpos para entrar en contacto con los parásitos o las células parasitadas. Todas estas células poseen en sus membranas externas receptores para la porción caudal (Fc) de las inmunoglobulinas (Igs). A través de estos receptores, las células efectoras se adhieren a los parásitos que están recubiertos con sus anticuerpos específicos, y descargan sustancias letales para el parásito.

1.6.1.3.2. Inmunidad mediada por anticuerpos.

Producción de anticuerpos.- La activación de los linfocitos B es tan compleja como la activación de los linfocitos Th0. Los linfocitos B reactivos poseen en sus membranas externas subunidades de IgM con especificidad por diversos epítomos. La alta afinidad de estas moléculas las hace efectivas para capturar antígenos de la circulación, aunque estos se encuentren en baja concentración. Una vez que el antígeno ha sido captado por la IgM, es endocitado por el linfocito y digerido en sus epítomos constitutivos. Las ILs 2, 4 y 5, con la asistencia de la IL-1 de los macrófagos, son esenciales para iniciar y mantener la proliferación de los linfocitos B. Éstas actúan sobre los linfocitos B y los diferencian hacia la formación de plasmocitos que secretan diferentes Igs: las ILs 2, 4, 5 y 6 estimulan la producción de IgM; la IL-6 y el IFN- γ estimulan la producción de IgG; la IL-4 promueve la producción de IgE y la IL-5 favorece la producción de la IgA.

Características de los mecanismos efectores de la inmunidad humoral.-

Ocupación de espacios.- Un anticuerpo dirigido contra el receptor de un parásito, o de una toxina, o de una enzima, se combina e impide que se una con sus receptores correspondientes. Así, el anticuerpo evita que el parásito penetre a la célula hospedera, que la toxina ejerza su acción tóxica o que la enzima actúe sobre su sustrato.

Unión de elementos.- Ocurre cuando el anticuerpo actúa como un puente entre los elementos que se unen. La unión de elementos actúa para producir aglutinación de los parásitos o aproximación entre el parásito y las células antiparasitarias. La aglutinación consiste en la unión de numerosas partículas

antigénicas en una red, mediante anticuerpos unidos a los epítopos de las partículas. La aglutinación de parásitos impide su difusión en el hospedero y mantiene la infección localizada; también interfiere con la orientación espacial del parásito, de manera que dificulta su combinación con los receptores de la célula hospedera. La precipitación de moléculas tóxicas previene su difusión en el organismo y facilita su fagocitosis (3).

1.7. RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN LA CISTICERCOSIS.

El hospedero intermediario del cisticerco, ya sea el cerdo o el ser humano, presenta tanto respuesta inmune celular como respuesta inmune humoral ante el estímulo con el parásito.

Se ha demostrado la presencia de IgG porcina en la superficie de los cisticercos (63) y varias clases de inmunoglobulinas y C3b en la superficie de los cisticercos obtenidos de seres humanos (10). Se ha estudiado la presencia de anticuerpos específicos en suero, LCR y saliva de pacientes con cisticercosis para estandarizar métodos de diagnóstico. Se ha encontrado que la IgG es predominante (23), también se han encontrado IgM, IgA e IgE (22). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que el parásito es susceptible al ataque de los anticuerpos y del complemento (11). Sin embargo existe la hipótesis de que el parásito se une a las inmunoglobulinas con el receptor Fc, las endocita y las emplea como fuente de proteínas (1, 62).

También se ha descrito una reacción inflamatoria compuesta por varios tipos celulares, principalmente eosinófilos, macrófagos y granulocitos, así como también linfocitos, células asesinas naturales y células plasmáticas, lo que sugiere la producción de anticuerpos y de citocinas a nivel local (51). La

intensidad y el tipo de respuesta inmune parece estar asociada con la viabilidad del parásito y su localización anatómica (49). Hay modelos experimentales que sugieren que la infección activa está asociada con una respuesta de tipo Th2, mientras que la presencia de parásitos calcificados están relacionados con una respuesta inflamatoria de tipo Th1 (61).

Se sugiere también que el cisticerco ha desarrollado mecanismos de evasión mientras la relación hospedero parásito está en equilibrio, como la presencia de un receptor para la fracción Fc del las inmunoglobulinas (10); el AgB o paramiosina que inhibe a la vía clásica de la cascada del complemento (32, 33, 35, 36); la presencia de una glicoproteína (taeniaestatina) que inhibe tanto a la vía clásica como a la vía alterna de activación del complemento (39, 61, 62); la inducción de la síntesis y liberación de prostaglandina E₂, la cual juega un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria del hospedero (51, 61) y la producción de una sustancia lábil que daña a los eosinófilos cercanos y permite a los cisticercos mantenerse libres de este ataque (40). Estas son algunas de las hipótesis que existen con respecto a la evasión de la respuesta inmune.

En cuanto al tipo de citocinas secretadas, se ha demostrado que se producen IL-1 e IL-6 en LCR de pacientes con NCC que presentan reacción inflamatoria, pero se desconoce si esta reacción es antígeno-específica (46); otros estudios indican que predomina la producción de IL-12 y que en cambio no pudo detectarse IL-4 por lo que se cree que la respuesta celular es del tipo Th1 (49); mientras que otros han encontrado IL-5 y eotaxina en pacientes con NCC (21).

1.8. ANTÍGENO B.

El antígeno B (AgB) es una proteína de 100 kDa inmunodominante en la cisticercosis humana y porcina y desempeña un papel muy importante en la relación hospedero-parásito. El AgB y la paramiosina del tremátodo *Schistosoma mansoni* (S_{pm}) son altamente inmunogénicas, poseen pesos moleculares y puntos isoeléctricos similares y son sensibles a las proteasas endógenas del extracto crudo de ambos parásitos. Tienen una homología de secuencia muy alta, por lo que se considera que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (T_{pm}). La paramiosina se ha convertido en candidata para la vacunación contra infecciones helmínticas (32, 59).

2.1. JUSTIFICACIÓN.

La inmunidad mediada por células es importante en infecciones parasitarias. La estimulación con antígenos del parásito, puede inducir una expansión clonal de células T parásito-específicas, las cuales pueden actuar mediante una acción citotóxica o mediante efectos indirectos sobre otras células como las NK o sobre los linfocitos B productores de anticuerpos. El análisis de la respuesta citotóxica o proliferativa de los cultivos de células T estimuladas con antígenos del parásito permite determinar los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, identificar las partes del sistema inmune que confieren inmunidad y estudiar los mecanismos que emplean los parásitos para evadir al sistema inmune (2).

El estudio de la respuesta inmunológica en la cisticercosis humana por *Taenia solium* se ha enfocado al análisis de la respuesta inmunológica mediada por anticuerpos, por ser ésta la base del inmunodiagnóstico. Algunos estudios han demostrado que los pacientes con neurocisticercosis presentan anticuerpos específicos contra el parásito. Se han caracterizado las clases de inmunoglobulinas presentes en el suero y los antígenos del parásito que estos anticuerpos reconocen (revisado en 44).

Aunque la respuesta inmunológica celular en esta parasitosis no ha sido muy estudiada, algunos trabajos muestran que la respuesta de proliferación de linfocitos podría estar deprimida ante el estímulo con mitógenos (13, 27, 43), pero no se ha analizado la capacidad proliferativa de las células ante un estímulo antígeno-específico.

Debido a la información que pueden proveer las clonas de linfocitos T parásito-específicas acerca de los mecanismos efectores de la inmunidad mediada por células, se pretende producir líneas de linfocitos T parásito-específicas para que a partir de éstas se obtengan las clonas.

Estos estudios permitirán determinar los diferentes antígenos que participan en la estimulación de los linfocitos T activados durante la infección con el cisticerco de *Taenia solium*. Esto puede ser relevante para el desarrollo de posibles vacunas o estímulos inmunoproliféricos.

2.2. OBJETIVOS.

- Evaluar la capacidad de la respuesta inmune celular de pacientes con NCC ante el estímulo con un extracto crudo (EC) del cisticerco de *Taenia solium*, un antígeno puro (AgB) y tres fracciones de este antígeno que corresponden a la porción amino, región central y porción carboxilo.
- Obtener líneas de linfocitos T antígeno-específicas a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con NCC.

3.1. GRUPO DE ESTUDIO.

El grupo de estudio fue de 34 pacientes con NCC activa, comprobada por diagnóstico de imagen y serológico y que no recibieron tratamiento ni corticoesteroides previo al estudio. Se estudiaron además, 34 individuos aparentemente sanos, de género y edad similares como grupo testigo. La relación de estos pacientes según edad, género y diagnóstico clínico se muestra en la *TABLA 3.1.*

3.2. MÉTODOS.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes con NCC y de los individuos sanos; estas células se dividieron en tres grupos diferentes para: llevar a cabo los ensayos de proliferación celular, crear una fuente de células presentadoras de antígeno y obtener líneas de linfocitos T antígeno-específicas.

3.2.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC).

Se tomó muestra de sangre venosa periférica empleando heparina como anticoagulante. La sangre se diluyó 1 : 2 con solución balanceada de Hanks (GIBCO). Las PBMC se purificaron mediante centrifugación a través de un gradiente de linfocol e histopaque (SIGMA). Posteriormente se aspiró con una pipeta Pasteur la fracción de células que forman un anillo blanco sobre la interfase. Este paquete de células se resuspendió en Hanks y se centrifugó a 400 g durante 5 minutos. Este proceso se repitió 3 veces más. Las PBMC obtenidas se resuspendieron en medio RPMI 1640 (GIBCO) enriquecido con suero fetal

bovino (HY-CLONE) al 15%, 200 mM de L-glutamina (GIBCO), 50 mM de β -mercaptoetanol (GIBCO), 100 U/mL de penicilina (GIBCO), 100 μ g/mL de estreptomycin (GIBCO), 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (GIBCO) y 1% antimicoplasma anti-PPLO (GIBCO). Se tomó una fracción de la suspensión celular y se verificó la viabilidad por exclusión de Azul de Tripano (GIBCO) al 0.04% en solución salina de fosfatos pH 7.4 (PBS).

3.2.2. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se colocaron 3×10^5 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos fondo plano (CORNING) y los ensayos se realizaron por quintuplicado. Las células se incubaron con las siguientes variantes: células sin estímulo (testigo), extracto crudo del cisticerco (EC) a 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL; concanavalina A (Con-A) a 5 μ g/mL; AgB a 5 μ g/mL, fracción amino del AgB (F1) a 3.5 μ g/mL, fracción central del AgB (F2) a 3.5 μ g/mL y fracción carboxilo del AgB (F3) a 3.5 μ g/mL. El tiempo de incubación fue de 96 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. A cada uno de los pozos se agregó 1 μ Ci de (³H)-timidina y se incubaron durante 18 horas bajo las mismas condiciones. Estas células ya marcadas se cosecharon sobre filtros de fibra de vidrio. Los filtros se secaron a temperatura ambiente y se colocaron en los viales correspondientes para medir la incorporación de la marca radiactiva, se agregó el líquido de centelleo. Se obtuvieron los valores de cuentas por minuto (cpm) de la radiactividad. Se obtuvo la media de los quintuplicados de cada una de las variantes y los índices de proliferación celular se obtuvieron dividiendo las cpm problema sobre las cpm testigo (20, 26, 28).

TABLA 3.1. Relación de los pacientes estudiados según edad, género y diagnóstico clínico.

| CASO No. | EDAD (años) | GÉNERO | DIAGNÓSTICO |
|----------|-------------|-----------|---|
| 1 | 55 | Masculino | NC subaracnoideo múltiple |
| 2 | 25 | Masculino | NC parenquimatoso múltiple |
| 3 | 33 | Masculino | NC parenquimatoso múltiple |
| 4 | 35 | Masculino | NC subaracnoideo múltiple |
| 5 | 31 | Masculino | NC IV ventrículo subaracnoideo múltiple |
| 6 | 32 | Masculino | NC parenq. y subaracnoideo múltiple |
| 7 | 43 | Femenino | NC subaracnoideo múltiple |
| 8 | 51 | Masculino | NC subaracnoideo múltiple |
| 9 | 49 | Masculino | NC parenq. y subaracnoideo múltiple |
| 10 | 37 | Femenino | NC parenq. y subaracnoideo múltiple |
| 11 | 28 | Femenino | NC IV ventrículo múltiple |
| 12 | 29 | Masculino | NC parenq. y subaracnoideo múltiple |
| 13 | 49 | Femenino | NC IV ventrículo único |
| 14 | 38 | Masculino | NC IV ventrículo múltiple |
| 15 | 30 | Masculino | NC IV ventrículo único |
| 16 | 29 | Femenino | NC parenquimatoso único |
| 17 | 37 | Masculino | NC IV ventrículo y subarac. múltiple |
| 18 | 29 | Masculino | NC IV ventrículo múltiple |
| 19 | 47 | Masculino | NC parenq. y subaracnoideo múltiple |
| 20 | 27 | Femenino | NC IV ventrículo y subarac. múltiple |
| 21 | 47 | Masculino | NC parenquimatoso múltiple |
| 22 | 44 | Masculino | NC subaracnoideo múltiple |
| 23 | 20 | Masculino | NC parenq., subarac., IV ventrículo |
| 24 | 59 | Femenino | NC parenq. y subaracnoideo múltiple |
| 25 | 31 | Masculino | NC subaracnoideo múltiple |
| 26 | 46 | Femenino | NC IV ventrículo múltiple |
| 27 | 63 | Femenino | NC subaracnoideo múltiple |
| 28 | 16 | Masculino | NC IV ventrículo múltiple |
| 29 | 32 | Femenino | NC IV ventrículo múltiple |
| 30 | 29 | Masculino | NC parenq. y IV ventrículo múltiple |
| 31 | 63 | Femenino | NC subaracnoideo múltiple |
| 32 | 43 | Masculino | NC parenq. y IV ventrículo múltiple |
| 33 | 36 | Femenino | NC subaracnoideo múltiple |
| 34 | 40 | Masculino | NC subaracnoideo único |

3.2.3. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES LINFOBLASTOIDES POR TRANSFORMACIÓN CON EL VIRUS DE EPSTEIN-BARR (VEB).

Se utilizó el sobrenadante de la línea celular MCV5 (de Marmoset) productora del Virus de Epstein-Barr (VEB) para infectar a los linfocitos B de los pacientes con neurocisticercosis para emplearlas como CPAs. Aproximadamente 5×10^6 PBMC se resuspendieron en 1 mL del sobrenadante de las células productoras del VEB. A estas células se les agregó 1 mL de medio RPMI enriquecido y se cultivaron en placas de 24 pozos durante 24 horas a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Las células se lavaron 3 veces con Hanks y se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El paquete celular obtenido se resuspendió en 2 mL de RPMI enriquecido y 0.2 mL de Ciclosporina-A a una concentración de 10 µg/mL y estas células se incubaron durante 5 días bajo las mismas condiciones. Se lavaron con Hanks y se dejaron cultivando con medio RPMI enriquecido hasta que se observó la formación de clones. Las clones formadas se transfirieron a botellas de 25 cm³ para su crecimiento (54).

3.2.4. PRODUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES ANTÍGENO-ESPECÍFICAS.

Una fracción de las PBMC obtenidas se cultivaron en medio RPMI enriquecido en presencia del EC del cisticerco de *Taenia solium*, de IL-2 recombinante y de células B autólogas transformadas con el VEB e irradiadas con una bomba de cobalto. Estos cultivos se reestimularon cada 15 días con IL-2, el antígeno y las células presentadoras.

4.1. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR.

Se analizó la capacidad de la respuesta celular *in vitro* de pacientes con NCC y de individuos aparentemente sanos, mediante ensayos de proliferación ante el estímulo con un mitógeno (Con A), el antígeno homólogo (EC del cisticerco), un antígeno purificado (AgB) y tres fracciones de este antígeno: la fracción amino, la región central y la fracción carboxilo.

Ambos grupos de estudio, pacientes con NCC e individuos sanos, respondieron ante el estímulo con el mitógeno Concanavalina A (FIGURA 4.1.).

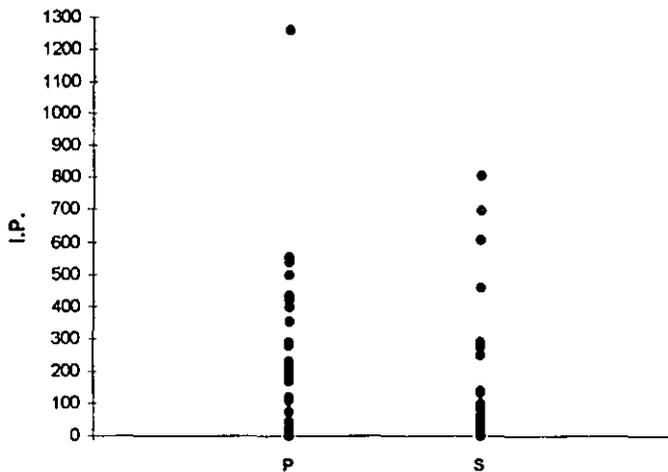


FIGURA 4.1. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC (P) y de individuos sanos (S) ante el estímulo con el mitógeno ConA.

La proliferación celular con el EC del cisticerco de *Taenia solium* fue mayor en el grupo de pacientes con NCC que en el grupo de individuos aparentemente sanos (FIGURA 4.2.).

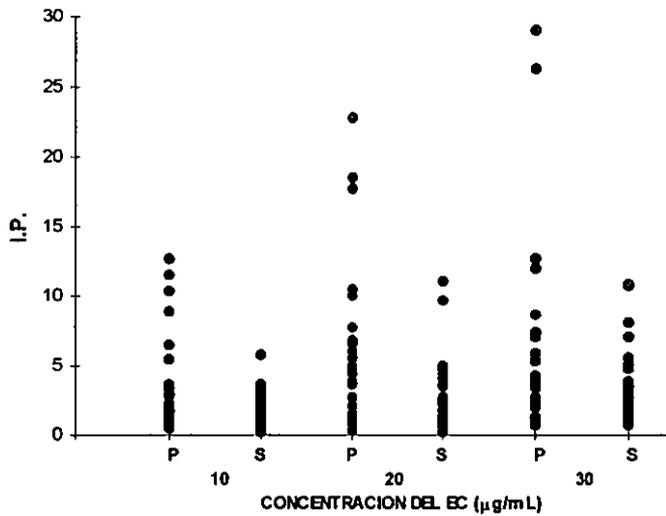


FIGURA 4.2. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC (P) y de individuos sanos (S) ante el estímulo con el EC del cisticerco de *T. solium*.

Ante el estímulo con el antígeno purificado (AgB) y las tres fracciones de éste (F1=región amino, F2=región central y F3=región carboxilo), hay una respuesta similar en ambos grupos de estudio (FIGURA 4.3.).

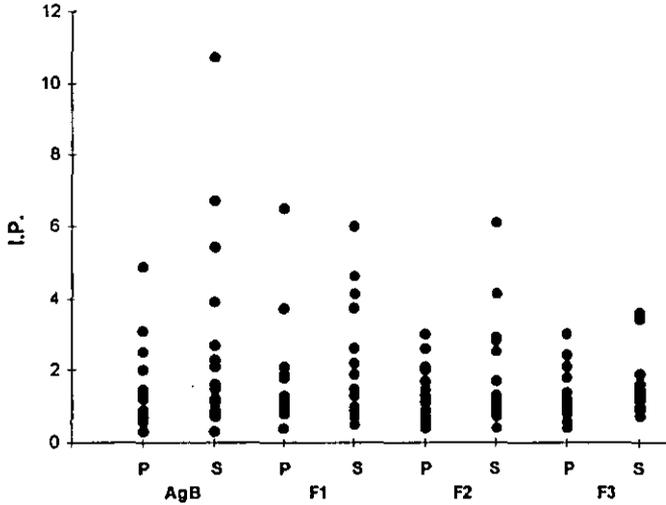


FIGURA 4.3. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC (P) y de individuos sanos (S) ante el estímulo con el AgB completo o las fracciones amino (F1), central (F2) o carboxilo (F3) de éste.

Del total de pacientes estudiados, el 67% corresponde a individuos del sexo masculino y el 33% a individuos del sexo femenino. Ambos grupos de estudio respondieron de manera similar ante los diferentes estímulos, no importando el género del paciente (FIGURAS 4.4. y 4.5.).

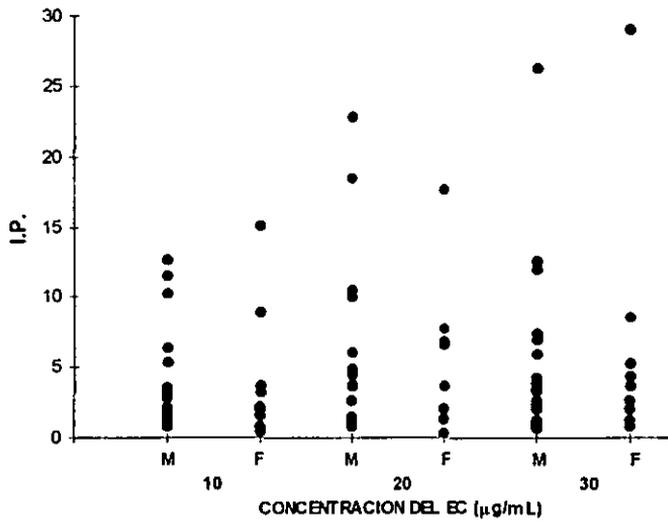


FIGURA 4.4. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC agrupados por género (M=Masculino, F=Femenino) ante el estímulo con el EC del cisticerco de *T. solium*.

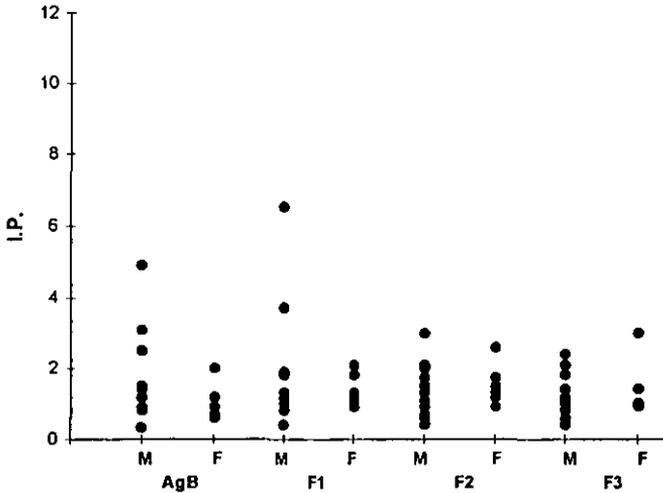


FIGURA 4.5. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC agrupados por género (M=Masculino, F=Femenino) ante el estímulo con el AgB completo o las fracciones amino (F1), central (F2) o carboxito (F3) de éste.

Del total de pacientes estudiados, el 85% presentó cisticercosis múltiple y el 15% cisticercosis única. Ambos grupos de estudio respondieron a los estímulos con el EC, pero el grupo de pacientes con NCC única no respondió ante el estímulo con el AgB ni sus fracciones (FIGURAS 4.6. y 4.7.).

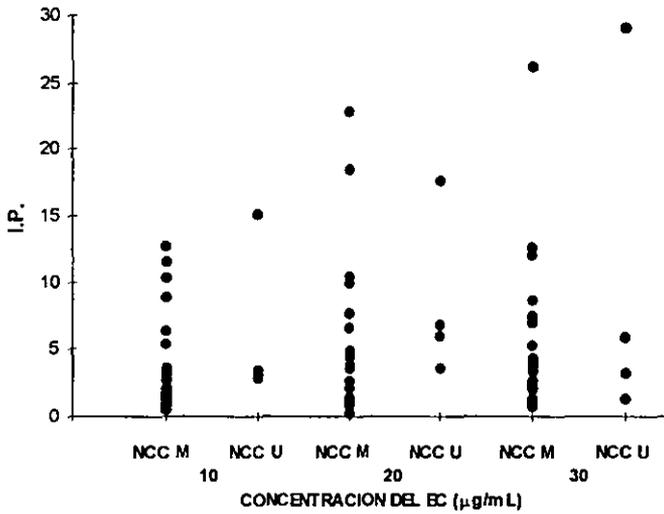


FIGURA 4.6. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC agrupados por número de cisticercos presentes (M=Múltiple, U=Único) ante el estímulo con el EC del cisticercos de *T. solium*.

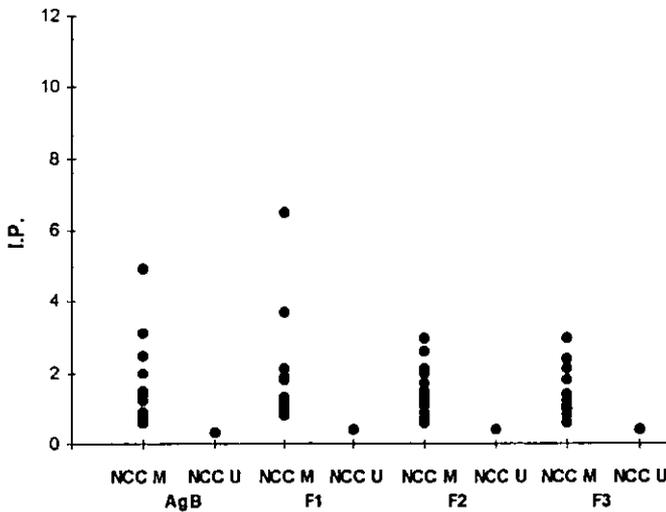


FIGURA 4.7. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC agrupados por número de cisticercos presentes (M=Múltiple, F=Único) ante el estímulo con el AgB completo o las fracciones amino (F1), central (F2) o carboxilo (F3) de éste.

Clasificando al grupo de pacientes según la localización de los cisticercos, se encontró que el 14% presentó cisticercosis parenquimatosa, el 29% cisticercosis subaracnoidea, el 25% cisticercosis en el IV ventrículo y el 32% cisticercosis múltiple. No se asocia una respuesta de proliferación mayor dependiendo de la localización de los cisticercos (FIGURAS 4.8. y 4.9.).

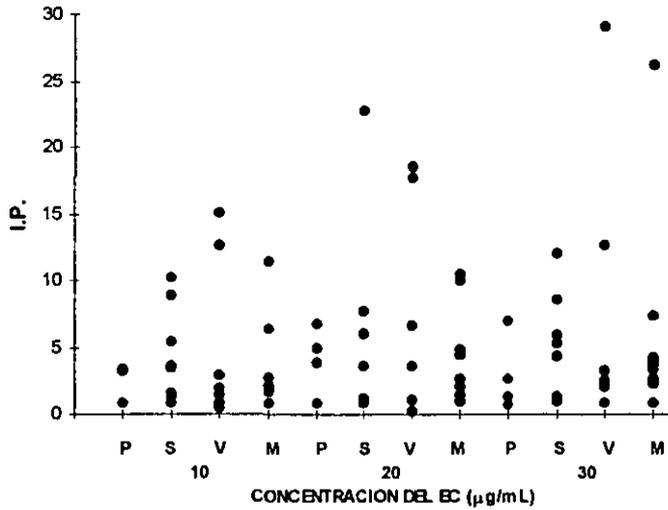


FIGURA 4.8. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC agrupados por localización de cisticercos presentes (P=Parenquimatoso, S=Subaracnoideo, V=IV Ventriculo, M=Mixto) ante el estímulo con el EC del cisticercos de *T. solium*.

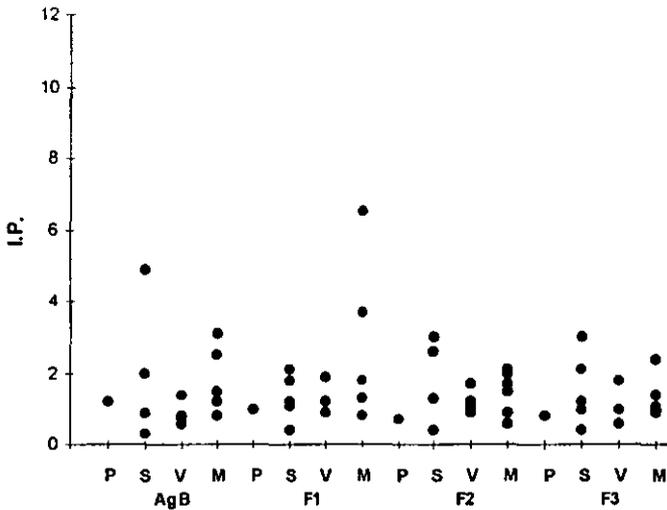


FIGURA 4.9. Respuesta de proliferación celular de pacientes con NCC agrupados por localización de cisticercos presentes (P=Parenquimatoso, S=Subaracnoideo, V=IV Ventrículo, M=Mixto) ante el estímulo con el AgB completo o las fracciones amino (F1), central (F2) o carboxilo (F3) de éste.

4.2. PRODUCCIÓN DE LÍNEAS DE LINFOCITOS T ANTÍGENO-ESPECÍFICAS.

De las PBMC obtenidas de pacientes con NCC se tomó una fracción para infectarlas con el VEB y emplearlas como CPAs y otra fracción para establecer la línea celular antígeno específica. No se lograron obtener suficientes células transformadas, por lo que no pudieron reestimularse las líneas celulares antígeno-específicas y éstas no proliferaron.

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS.

Se calculó la media, mediana, moda, varianza, desviación estándar, sesgo y curtosis de los índices de proliferación obtenidos y ninguna de las muestras presenta una distribución normal, por lo que se recurrió al análisis estadístico para métodos no paramétricos. Se realizó la prueba de rango para dos muestras (U de Mann-Whitney) y así determinar si entre cada grupo se observa una diferencia significativa de respuesta ante los diferentes estímulos.

El grupo de pacientes con NCC responde más que el grupo de individuos aparentemente sanos ante el estímulo con el Ag10 y con el Ag20 ($p < 0.05$). En cuanto a la respuesta ante el AgB y sus fracciones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el grupo testigo.

Al dividir el grupo de pacientes por género (masculino y femenino) no se encontraron diferencias en cuanto a la respuesta de proliferación celular, lo mismo que al clasificarlos según el tipo de cisticercosis (única o múltiple); aunque el grupo de pacientes con NCC única, no respondió ante el estímulo con el AgB, no se encontró diferencia estadísticamente significativa, debido al tamaño tan pequeño de la muestra.

Al clasificar a los pacientes según la localización de los cisticercos presentes no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, aparentemente no parece haber relación en cuanto a la localización y el índice de proliferación, ya que se muestra una respuesta muy heterogénea.

5.1. DISCUSIÓN.

No ha sido muy estudiada la participación de la inmunidad mediada por células y los mecanismos protectores en contra de la cisticercosis por *Taenia solium*. En el presente trabajo se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular para evaluar la capacidad de respuesta de pacientes con NCC ante el estímulo con un mitógeno específico para linfocitos T (Con A), el extracto crudo del cisticerco y un antígeno puro (AgB).

Estudios previos muestran que pacientes con NCC presentan una respuesta inmune celular deprimida ante el estímulo con mitógenos como PHA y Con A (13); se cree que este parásito causa daño genético en los linfocitos del hospedero, lo que retarda su proliferación (27); se ha aislado un factor de RNA del cisticerco de la *T. solium* que inhibe la proliferación de linfocitos humanos y murinos estimulados con mitógenos (43, 56); la taeniaestatina y otros factores aún no muy bien definidos, pueden interferir con la proliferación de los linfocitos y la función de los macrófagos, paralizando así la respuesta inmune celular (39). Por otro lado, se obtuvo una línea de linfocitos T murinos que responden de manera específica ante el estímulo con el EC del cisticerco de *T. solium* (44) y en estudios más recientes se ha encontrado que linfocitos murinos responden ante el estímulo con Con A y con el antígeno específico durante la etapa inicial de la infección con el metacéstodo de *T. crassiceps* (57) y fracciones recombinantes del AgB (59), a medida que la infección progresa, se inhibe de manera significativa la respuesta proliferativa ante el estímulo con Con A y el antígeno específico (57), aunque al incrementar el tiempo de cultivo de las células de ratones infectados en presencia de los fragmentos recombinantes del AgB, se obtuvo una proliferación mayor que la de los ratones control (59).

En el presente trabajo, al evaluar los índices de proliferación celular ante el estímulo con Con A, se encontró que tanto el grupo de pacientes con NCC como el grupo testigo, responden de manera similar, lo que indicaría que los pacientes con NCC no se encuentran inmunosuprimidos. Se está estudiando la síntesis de mRNA de PBMC del grupo de pacientes con NCC y se ha encontrado que la IL-2 está presente en el 58% de los casos, mientras que IFN- γ , IL-4 e IL-10 se encontraron en 11%, 10% y 14% respectivamente, únicamente el IFN- γ se incrementó en el grupo de pacientes comparándolo como el grupo testigo (12). La IL-2 presente podría estar induciendo la respuesta de los linfocitos T mediante un efecto sinérgico con el antígeno (sugerido en 44). El hecho de que el IFN- γ esté presente en el grupo de pacientes sugeriría que se trata de una respuesta del tipo Th1, al igual que en los linfocitos murinos durante la etapa inicial de la infección con *T. crassiceps* (57), aunque en este caso (pacientes con NCC activa) no sabemos en qué etapa se encuentra la parasitosis (podría ser crónica y asintomática).

Las PBMC responden de manera específica ante el estímulo con EC del cisticerco de *T. solium*, ya que se observa mayor respuesta en el grupo de pacientes que en el grupo testigo. No se encontró evidencia estadísticamente significativa para decir que el género, localización o el número de cisticercos presentes pueda alterar la capacidad de respuesta celular.

Al ser el antígeno B una proteína inmunodominante en la cisticercosis humana y porcina, se analizó la capacidad de respuesta de los pacientes con NCC ante este estímulo, también se consideró interesante el determinar cuáles son las regiones de esta molécula que interaccionan directamente con el sistema inmune, por lo que se evaluó la respuesta de proliferación celular ante el estímulo con las

diferentes fracciones de este antígeno: fracción amino, fracción central y fracción carboxilo. Algunos trabajos previos muestran que la expresión del AgB permite estudiar hacia qué regiones de la proteína se dirige la respuesta inmune humoral y celular del hospedero, así los anticuerpos reaccionan principalmente con el extremo carboxilo terminal, al unirse a este extremo, dejan libre la fracción amino para llevar a cabo su acción inhibitoria del complemento y así inhibir el desarrollo de la respuesta inflamatoria del hospedero (59).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la respuesta de proliferación celular ante el estímulo con el AgB y sus fracciones con respecto al grupo testigo, esto puede deberse a que es una paramiosina que se encuentra presente en otros helmintos (32) y el grupo de individuos sanos podría estar presentando una reacción cruzada.

El porcentaje de pacientes con NCC única es muy bajo, y el tamaño de muestra no nos permite generalizar, pero se encontró que este grupo no responde ante el estímulo con el AgB, puede ser que al tratarse de un antígeno puro, sea más difícil que pueda ser reconocido y responde menos que el grupo de pacientes con NCC múltiple ante el estímulo con el EC (58).

Aunque no es estadísticamente significativo, se observó que hay una respuesta celular preferencial contra el fragmento amino del AgB; en ensayos de proliferación celular de linfocitos T murinos, también se detectó cierta preferencia hacia esta región (59).

Para establecer las líneas de linfocitos T antígeno-específicas a partir de las PBMC de los pacientes con NCC se tuvieron diferentes inconvenientes de origen técnico, ya que resultó difícil lograr la infección de los linfocitos B con el VEB y no

se contaba con suficientes células transformadas para emplearlas como CPAs y reestimar las líneas T cada 15 días, por lo que éstas empezaron a morir o a contaminarse. Las líneas obtenidas no recibieron el número de estímulos sugerido y se prosiguió a criopreservarlas. Sería conveniente desarrollar un nuevo protocolo de estudio para trabajar con estas células, quizá fusionándolas y produciendo hibridomas.

5.2. CONCLUSIONES.

- Se evaluó la capacidad de respuesta celular de pacientes con NCC mediante ensayos de proliferación celular ante el estímulo con Con A, el extracto crudo del cisticerco y la paramiosina de la *T. solium*. Se encontró que esta respuesta no está inmunodeprimida en pacientes con NCC activa que no han recibido tratamiento para esta parasitosis.
- El grupo de pacientes estudiados responde específicamente ante el estímulo con el parásito, lo que es muy importante para desarrollar protocolos de estudio de epítomos dominantes del cisticerco que puedan inducir protección ante esta parasitosis y así poder desarrollar vacunas, métodos de diagnóstico o inmunoprolifáticos.

1. Ambrosio J., Landa A., Merchant M., Laclette J.P. (1994). Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Arch. Med. Res. 25: 325-330.
2. Baldwin C.L., Goddeeris B.M. and Morrison W.I. (1988). T-cell Clones in Immunoparasitology. Parasitol. Today 4: 40-45.
3. Barriga O. (1995). Una visión personal de las reacciones inmunes contra las infecciones parasitarias. Memorias XII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Santiago, Chile. pp. 119-129.
4. Baumann H., Gaudie J. (1994). The acute phase response. Immunol. Today 15: 74-80.
5. Binaghi R.A. (1993). The immunological aspects of parasitic diseases. Allerg. Immunol. 25: 205-206.
6. Brown W.C., Davis W.C., Rice-Ficht A. (1994). CD4+ T-cell clones obtained from cattle chronically infected with *Fasciola hepatica* and specific for adult worm antigen express both unrestricted and Th2 cytokine profiles. Infec. Immun. 62: 818-827.
7. Carpio A., Escobar A., Hauser W.A. (1998). Cysticercosis and epilepsy: a critical review. Epilepsia 39: 1025-1040.
8. Constant S.L., Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. Ann. Rev. Immunol. 15: 297-322.
9. Correa D. (1998). Los antígenos del cisticerco de *Taenia solium*: aspectos básicos y aplicación en el diagnóstico clínico y en estudios epidemiológicos. Tesis Doctoral. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH, UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas. 103 pp.
10. Correa D., Dalma D., Espinoza B., Plancarte A., Rabiela T., Madrazo I., Gorodezky C., Flisser A. (1985) Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. J. Parasitol. 71: 535-541.
11. Correa D., Laclette J.P., Rodríguez-Del-Rosal E., Merchant M., Flisser A. (1987). Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different

- naturally infected pigs. *J. Parasitol.* 73: 443-445.
12. Correa D., Medina-Escutia M.E. (1999). Host-parasite immune relationship in *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis in: *Taenia solium* taeniosis / cysticercosis edited by H.H. García / S.M. Martínez M.
13. Correa D., Tovar A., Espinoza B., Plancarte A. (1989). Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito. En: A. Flisser, F. Malagón (eds.) *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México.* Editorial Limusa. México. pp. 31-43.
14. Cox F.E.G., Liew E.Y. (1992). T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Parasitol. Today* 8: 371-375.
15. Curry A.J., Else K.J., Bancroft A., Grenis R.K., 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.
16. Davis L.E., Kornfeld M. (1991). Neurocysticercosis: neurologic, pathogenic, diagnostic and therapeutic aspects. *Eur. Neurol.* 31: 229-240.
17. Del Brutto O.H., Sotelo J. (1988). Neurocysticercosis: an update. *Rev. Infect. Dis.* 10: 1075-1087.
18. Del Brutto O.H., Wadia N.H., Dumas M., Cruz M., Tsang V.C. Schantz P.M. (1996). Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.* 142: 1-6.
19. Dixon H.B.F., Lipscomb F.M. (1961). Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. *Prion. Council Med. Res. Special Rep. Ser.* 229: 1-58.
20. Doolan D.L., Beck H.P., Good M.F. (1994). Evidence for limited activation of distinct CD4+ T cell subsets in response to the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in Papua New Guinea. *Parasite Immunol.* 16: 129-136.
21. Evans C.A.W., García H.H., Hartnell A., Gilman R.H., José P.J., Martínez M., Remick D.G., Williams T., Friedland J.S. (1998). Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect. Immun.* 66: 4522-

4525.

22. Flisser A., Espinoza B., Tovar A., Plancarte A., Correa D. (1986). Host-parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet. Parasitol.* 20: 95-102.
23. Flisser A., Woodhouse E., Larralde C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 27.
24. Golding B., Zaitseva M., Golding H. (1994). The potential for recruiting immune response toward type 1 or type 2 T-cell help. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 33-40.
25. Heinzl F.P., Schoenhaut D.S., Rerko R.M., Rosser L.E., Gately M.K. (1993). Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J. Exp. Med.* 177: 1505-1509.
26. Hermanek J., Goyal P.K. & Wakelin D. (1994). 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.
27. Herrera L.A., Santiago P., Rojas G., Salazar P.M., Tato P., Molinari J.L. Schiffmann D., Ostrosky-Wegman P. (1994). Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutat. Res.* 305: 223-228.
28. Hossiau F.A. Renauld J.C., Stevens M., Lehmann F., Lethe B., Coulie P.G., Van Schick J. (1993). Human T- cell lines and clones respond to IL-9 . *J. Immunol.* 150: 2634-2640.
29. Kenneth M.M. (1998). T lymphocyte differentiation in the periphery. *Cur. Op. Immunol.* 10: 226-232.
30. Koj A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317: 84-94.
31. Lacleste J.P. (1985). Componente de superficie en el metacéstodo de la *Taenia solium*. Tesis Doctoral. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de

- Posgrado del CCH, UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas. 126 pp.
32. Laclette J.P., Landa A., Arcos L., Willms K., Davis A.E., Shoemaker C.B. (1991). Paramyosin in the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Biochem. Parasit.* 44: 287-296.
 33. Laclette J.P., Merchant M., Willms K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 73: 121-129.
 34. Laclette J.P., Ornelas J., Merchant M., Willms K. (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.) *Cysticercosis: present stage of knowledge and perspective*. Academic Press, New York.
 35. Laclette J.P., Rodríguez M., Landa A., Arcos L., De Alba P., Mancilla R., Willms K. (1989). The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the Antigen B. *Acta Leiden* 57: 115-122.
 36. Laclette J.P., Shoemaker C.B., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., Bing D., Nicholson-Weller A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148: 124-128.
 37. Latovitzki N., Abrams G., Clark C., Mayeux R., Ascherl G., Sciarra D., (1978). Cerebral Cysticercosis. *Neurology* 28: 838-842
 38. Legaspi T. (1998). La taeniasis/cisticercosis humana y porcina. *Epidemiología (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. S.S.A.)* 15: 1-2.
 39. Leid R.W., Suquet C.M., Tanigoshi L. (1987). Parasite defense mechanisms for evasion of host attack; a review. *Vet. Parasitol.* 25: 147-162.
 40. Medina-Escutia M.E. (1992). Efecto de productos de cisticercos de *Taenia solium* sobre eosinófilos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 53 pp.
 41. Miralles D., Stoeckle M., McDermott D., Finkelman F., Murray H. (1994). Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62: 1058-1063.

42. Miranda A. (1993). Neurocysticercosis. *Am. Fam. Physician* 47: 1193-1197.
43. Molinari J.L., Tato P., Reynoso O.A., Cazares J.M. (1990). Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84: 205-208.
44. Morales-López Z. (1994). Producción de clonas de linfocitos T específicos contra el antígeno del cisticerco de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 56 pp.
45. Mosmann T.R., Coffman R.L. (1989). Th1 and Th2 cells: different pattern of lymphokines secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7: 145-173.
46. Ostrozky-Zeichner L., García-Mendoza E., Ríos C., Sotelo J. (1996). Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch. Med. Res.* 27: 513-517.
47. Pitella J.E. (1997). Neurocysticercosis. *Brain Pathol.* 7: 681-693.
48. Proaño J.V., Madrazo I., García L., García-Torres E., Correa D. (1997). Albendazole and praziquantel treatment in neurocysticercosis of the fourth ventricle. *J. Neurosurg.* 87: 29-33.
49. Restrepo B.I., Llaguno P., Sandoval M.A., Enciso J.A., Teale J.M. (1998). Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J. Neuroimmunol.* 89: 64-72.
50. Richards F., Schantz P.M. (1991). Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clin. Lab. Med.* 11: 1011-1028.
51. Robinson P., Atmar R.L., Lewis D.E. White A.C.Jr. (1997). Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infec. Immun.* 65: 2925-2931.
52. Salazar P.M. (1994). Cisticercosis. En: Tay Zavala J. *Microbiología y Parasitología Médicas*. Méndez Editores. México. 140-149 pp.
53. Sarti E. (1997). La taeniasis y la cisticercosis por *Taenia solium*. *Revista Salud Pública México* 39: 556-563.

54. Steinitz M., Klein G. (1977). EB virus induced B lymphocyte cell lines producing specific antibody. *Nature* 269: 420-422.
55. Tandon P.N. (1983). Cerebral cysticercosis. *Neurosurg. Rev.* 6: 119-127.
56. Tato P., Castro A.M., Rodríguez D., Soto R., Arechavaleta F., Molinari J.L. (1995). Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol. Res.* 81: 181-187.
57. Terrazas L., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. (1998). Shift from an early protective Th1-type response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84: 74-81.
58. Thussu A., Sehgal S., Sharma M., Lal V., Sawhney I.M., Prabhakar S. (1997). Comparison of cellular response in single and multiple lesion neurocysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91: 687-696.
59. Vázquez J. (1996). Distribución de epítopes para células T y B en el Antígeno B de *Taenia solium*. Tesis de Maestría. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH, UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas. 44 pp.
60. Webbe G. (1994). Human Cysticercosis: Parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. *Pharmacol. Ther.* 64: 175-200
61. White A.C.Jr., Robinson P., Kuhn R. (1997). *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem. Immunol.* 66: 209-230.
62. White A.C.Jr., Tato P., Molinari J.L. (1992). Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Agents Dis.* 1: 185-193.
63. Willms K., Acos L. (1977). *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immuno-enzyme technique. *Exp. Parasitol.* 43: 396-401.