

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA

INFLUENCIA DEL FACTOR DE METACESTODO DE
Taenia solium SOBRE LA MODULACION DE LA
RESPUESTA INMUNE *in vitro*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA: INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :

QFB. FABIAN JESUS ARECHAVALETA VELASCO

TUTOR: DR. JOSE L. MOLINARI SORIANO
COTUTOR: DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR

MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Juan Pedro Laclette San Roman
Secretario	Dra. Patricia Tato Zaldivar
Vocal	Dr. José Luis Molinari Soriano
Primer suplente	Dra. Ingeborg Becker Fauser
Segundo suplente	Dr. Jorge Tay Zavala

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. José Luis Molinari Soriano, en el Departamento de Microbiología e Inmunología, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Tutor: Dr. José Luis Molinari Soriano.

Cotutor: Dra. Patricia Tato Zaldivar.

Sustentante: QFB. Fabián Jesús Arechavaleta Velasco.

En los campos de la observación, la oportunidad solo favorece a la mente que esta preparada.

Louis Pasteur.

A mis padres, por los consejos y el amor que me han dado en cada momento de mi vida.

A mi hermano Miguel, que comienza el difícil pero interesante camino de la investigación.

A Rebeca, por supuesto, con amor, por llenar mi vida de alegrías y experiencias nuevas.

A mis maestros y amigos, por lo mucho que me han enseñado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis Molinari Soriano y a la Dra. Patricia Tato Zaldivar, por su tiempo y asesoría para la culminación de este trabajo.

A Javier Márquez por su amistad, apoyo y consejos en los momentos difíciles que pasamos juntos.

A Emma Saavedra y María Elena Chanez por su amistad y ayuda durante mi estancia en el Instituto de Fisiología Celular.

A Irma y Tony por su comprensión en aquellos momentos de estudio que pasamos juntos.

A Lino por los momentos tan gratos que pasamos vacunando cerdos en Guerrero.

A la Lic. Pérez de la Mora y a Eva por ayudarme a resolver todos mis problemas administrativos durante la maestría.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	7
Objetivo general:.....	7
Objetivos particulares:.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Factor de metacésto	9
Determinación química.....	9
Cromatografía en Bio-Gel P6.....	10
Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).....	10
Transformación blastoide.....	10
Efecto del factor de metacésto en la viabilidad celular.....	11
Obtención de sobrenadantes de linfocitos cultivados en presencia de Con A y FM.....	12
Obtención de sobrenadantes de macrófagos cultivados en presencia de LPS, IFN- γ y FM.....	12
Experimentos de reconstitución y neutralización.....	13
Experimentos In Vivo.....	14
Determinación de la concentración de citocinas.....	14
IL-4, INF- γ y TNF- α	14
Interleucina 2 (IL-2).....	16
Análisis estadístico.....	17
RESULTADOS.....	18
Cromatografía en Bio-Gel P6.....	18
Determinación química.....	18
Transformación Blastoide.....	19
Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).....	20
Efecto del factor de metacésto sobre la viabilidad celular.....	20
Determinación de la concentración de citocinas.....	21
Interleucina 2 (IL-2).....	22
Interferón- γ (IFN- γ).....	25
Interleucina 4 (IL-4).....	27
Interleucina 10 (IL-10).....	30
Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α).....	31
Experimentos In vivo.....	33
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	40

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
ARN	Acido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
Con A	Concanavalina A
DMSO	Dimetilsulfóxido
FM	Factor de metacéctodo
HPLC	Cromatografía líquida de alta precisión
IFN- γ	Interferón gama
IL-	Interleucina
LCR	Líquido cefaloraquideo
LPS	Lipopolisacárido
mAb	Anticuerpo monoclonal
OPD	Ortofentilendiamina
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
rIL-	Interleucina recombinante
RPMI-C	RPMI completo
RPMI-I	RPMI incompleto
SFB	Suero fetal bovino
TCA	Acido tricloroacético
Th	Linfocito T cooperador
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral

Resumen: Influencia del factor de metacéstodo de *Taenia solium* sobre la modulación de la respuesta inmune *in vitro*.

Los objetivos del presente trabajo consistieron en: a) Conocer que subpoblación de células murinas T es deprimida por el factor de metacéstodo de *Taenia solium* (FM) y si esta depresión afecta la producción de citocinas y b) Conocer si el factor de metacéstodo afecta la producción de TNF- α en macrófagos.

Los resultados mostraron la capacidad del factor de metacéstodo para inhibir significativamente ($P < 0.05$) la proliferación tanto de linfocitos esplénicos obtenidos de ratones normales *in vitro* como de linfocitos de ratones previamente tratados con el FM y estimulados *in vitro* con concanavalina A. Así mismo, se encontró una disminución significativa ($P < 0.02$) de la concentración de citocinas (IL-2, IL-4 e INF- γ) en los sobrenadantes de los ensayos de proliferación de linfocitos y en los sobrenadantes de macrófagos (TNF- α) deprimidos por el FM *in vitro*, en comparación con la concentración de citocinas en sobrenadantes de linfocitos y macrófagos testigos. También se encontró disminuida significativamente ($P < 0.02$) la concentración de IL-4 y ligeramente pero no en forma significativa ($P > 0.05$), la de INF- γ en los sobrenadantes de las pruebas de proliferación de linfocitos obtenidos de ratones tratados con FM, en relación con sus testigos. Los experimentos de reconstitución con rIL-2 y rIL-4, son consistentes con que los linfocitos en presencia del FM disminuyen la liberación de citocinas, principalmente las involucradas como factores de crecimiento, ya que 85% y 71% de la proliferación fue recuperada al añadir las citocinas recombinantes.

La posibilidad de que el FM pudiera estar induciendo la síntesis de IL-10 producida por células Th2 y que esta citocina pudiera estar regulando la síntesis de citocinas de células Th1, no pudo ser contrastada totalmente, sin embargo, se usaron anticuerpos monoclonales anti-IL-10 para contrarrestar el posible efecto producido por esta citocina. Los resultados indicaron que los anticuerpos no evitaron la inhibición. Lo cual es una evidencia indirecta de

que el efecto observado no es debido a IL-10, pero sería importante detectar por un método directo la presencia de esta citocina, para estar seguros de que no está participando en la supresión inducida por el FM.

Los resultados descritos sobre los efectos producidos en dos células diferentes (linfocitos y macrófagos) por parte del FM, en cuanto a la liberación de diferentes citocinas, sugiere un mecanismo novedoso aún no descrito, por el cual, el FM pudiera estar inhibiendo la síntesis de proteínas de las células probadas, es decir, un mecanismo inespecífico que afecte esta función en cualquier célula y no necesariamente en subpoblaciones de células T.

INTRODUCCIÓN

Los parásitos inducen respuestas inmunes humorales y celulares en sus huéspedes. Sin embargo, debido a la complejidad de sus componentes químicos durante los distintos estadios que pasan en sus ciclos biológicos, la inmunidad que inducen es generalmente específica de fase, es decir, la protección puede estar dirigida contra la fase infectiva del parásito, la de establecimiento, la inductora de patologías asociadas o la relacionada con la transmisión del parásito. En el caso de la inmunidad contra la fase infectiva (p.e. esporozoitos de *Plasmodium sp.*) existe la ventaja de bloquear la infección completamente. En contraste, la inmunidad hacia parásitos establecidos (p.e. merozoitos de *Plasmodium sp.*) puede mantener el control de la infección además de ser estimulada continuamente por la misma infección. La protección contra antígenos asociados a patologías (p.e. microfilarias o huevecillos de *Schistosoma sp.*) está diseñada para prevenir cualquier enfermedad, sin embargo debe encontrarse regulada adecuadamente para evitar la exacerbación de la infección. Por último la inmunidad dirigida contra las formas transmisibles (p.e. estados sexuales de *Plasmodium sp.* o microfilaria) permite bloquear la continuidad del ciclo biológico del parásito, reduciendo así su transmisión (Kwiatkowski, 1992; Long, 1993; Scott y Sher, 1993).

La inmunidad contra céstodos depende del huésped en que se encuentren los parásitos, ya que éstos hacen contacto con los tejidos del huésped durante su ciclo biológico. El grado de la respuesta inmune está determinada por tres factores: a) La naturaleza de tejido invadido, b) La relación huésped-parásito y c) La fase de desarrollo del céstodo (Smyth y McManus, 1989).

La respuesta inmune que induce el céstodo adulto ha sido estudiada en su mayoría con *Hymenolepis sp.* utilizando modelos animales. En ratas se ha observado la presencia de IgG e IgE en el tegumento de *Hymenolepis diminuta*, mientras que en el ratón se

encontraron inmunoglobulinas de diferentes isotipos como IgG, IgM e IgA (Smyth y McManus, 1989). En el caso de *Schistosoma* sp. Capron y Dessaint (1985) y Capron (1992) observaron que los mecanismos inespecíficos de defensa incluyen el aumento de células NK y la activación del complemento por la vía alterna, mientras que la citotoxicidad mediada por anticuerpos es el mecanismo inmune mas importante. Estudios de citotoxicidad *in vitro* mostraron que los macrófagos, eosinófilos y plaquetas son las celulares efectoras y los experimentos de transferencia pasiva *in vivo* determinaron que los componentes humorales son la IgE y las subclases anafilácticas de IgG (Capron y Dessaint, 1985). Por otro lado, las inmunoglobulinas contra la fase de metacéstodo de *Taenia* sp. parecen no tener un papel importante, por ejemplo, Musoke y Williams (1976) utilizando ratas infectadas con *Taenia taeniaeformis* no encontraron un daño mediado por anticuerpos. En cuanto a la respuesta celular en cisticercosis por *Taenia solium*, sabemos que el parásito induce estados de inmunosupresión de linfocitos T en sangre periférica (Molinari, et al. 1987), principalmente de T cooperadores, en cerdos naturalmente cisticercosos (Tato, et al. 1987), y por las respuestas deprimidas de linfocitos de cerdos parasitados cuando son estimulados con Con A (Molinari, et al. 1993). Los pocos estudios en que se ha descrito la reacción inflamatoria causada por el metacéstodo de *Taenia solium*, coinciden con la presencia de eosinófilos degranulados y en íntimo contacto con la superficie del parásito, y consideran que es la célula determinante para la iniciación del proceso destructivo del metacéstodo (Willms, et al. 1980; Willms, et al. 1982; Molinari, et al. 1983; Molinari, et al. 1986; Aluja y Vargas, 1988). Finalmente, las oncosferas pueden ser eliminadas por diversos mecanismos, por ejemplo se ha observado una destrucción de oncosferas *in vitro* mediada por suero de pacientes cisticercosos y complemento (Molinari, et al. 1993). Por otro lado, la presencia de IgA específicas para oncosferas de *Taenia taeniaeformis* en secreciones gástricas de ratones infectados indica que la respuesta humoral es importante para neutralizar esta fase del parásito. (Smyth y McManus, 1989).

Los parásitos poseen una relación poco usual y privilegiada con el sistema inmune de sus huéspedes, que les permite sobrevivir por largos periodos, lo cual es central en el

mantenimiento de sus ciclos biológicos. Las consecuencias inmunológicas de la longevidad de los parásitos son muy importantes. Para sobrevivir en un medio ambiente hostil, los parásitos han tenido que desarrollar mecanismos para evadir o controlar las respuestas inmunes del huésped, como: la variación antigénica, evasión del sistema de complemento, inhibición de las funciones de las células efectoras, entre otros (Scott y Sher, 1993). Por otro lado, la estimulación antigénica prolongada que ocurre en los parasitismos crónicos, tiene consecuencias inmunoregulatorias importantes, como la carencia de respuestas inmunes específicas o de respuestas generalizadas del individuo parasitado. La inmunoregulación es también central para el entendimiento de la inmunopatología observada en las enfermedades parasitarias, por ejemplo, en la schistosomiasis murina ocurre una respuesta mediada por células Th1 durante las primeras semanas de la infección, mientras que en fases más avanzadas, la respuesta inmune se caracteriza por la actividad de células Th2. (Stadecker y Flores-Villanueva, 1994). En otra parasitosis, en la que se ha reportado inmunoregulación por el parásito, es en la infección por *Trichinella spiralis*, puesto que la expulsión de éste en ciertas cepas de ratones está asociada a la actividad de células Th1, mientras que la permanencia del mismo se asocia a células Th2 (Scott y Sher, 1993).

Las citocinas juegan un papel preponderante en la inmunoregulación durante las infecciones parasitarias, por ejemplo interleucinas como IL-4, IL-10 y TGF- β regulan o inhiben la activación de los macrófagos durante infecciones intracelulares con *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* y en infecciones extracelulares con *Schistosoma mansoni* (Reed y Scott, 1993; Scott y Sher, 1993; Subauste y Remington, 1993).

Se ha propuesto que los productos de excreción y secreción de helmintos contribuyen a las estrategias de evasión inmune de los parásitos a través de mecanismos como: la liberación de moléculas de superficie unidas o no a ligandos, o a células del

huésped; la alteración de macrófagos, linfocitos y granulocitos (Lightowlers y Rickard, 1988); la modulación del complemento por la paramiosina que se une a C'1q (Lacette, et al. 1992) o la teniastatina, que inhibe la acción del factor D de la vía alterna del complemento (Leid, et al. 1984) y la alteración de otras respuestas inflamatorias del huésped.

En lo que se refiere a supresión de funciones de linfocitos, Dessaint, et al. (1977) han reportado factores liberados por *Schistosoma mansoni*, los cuales son inhibidores de la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos, son termoestables, dializables y de bajo peso molecular (500-1,000 Da). Yin Foo, et al. (1983) encontraron un factor inmunosupresor producido por microfilarias de *Onchocerca gibsoni* que también es termoestable, dializable y de peso molecular menor de 10,000 Da. Por otro lado, Burger, et al. (1986) y Letonja, et al. (1987) han encontrado que productos de excreción y secreción de *Taenia taeniaeformis* inhiben la función de linfocitos *in vitro* a través de la inducción de poblaciones de células supresoras. En estudios realizados con metacéstodos de *Taenia solium*, Willms, et al. (1980) observaron supresión de la incorporación de timidina (³H) en linfocitos espléncicos obtenidos de ratones implantados intraperitonealmente con metacéstodos de *Taenia solium*. Esta supresión está descrita en cerdos infectados naturalmente por Molinari, et al. (1987), quienes observaron una correlación inversa entre la inmunosupresión de linfocitos T y B y el número de metacéstodos implantados, es decir, conforme aumentaba el número de metacéstodos en un cerdo parasitado, menor el número de linfocitos T y B, además se ha reportado disminuida la incorporación de timidina (³H) en linfocitos obtenidos de sangre periférica de cerdos naturalmente cisticercosos (Molinari, et al. 1993).

Hipotéticamente se había considerado que los linfocitos CD8⁺ (citotóxicos) realizaban funciones reguladoras mientras que, los linfocitos CD4⁺ (cooperadores) funciones efectoras. Sin embargo, este concepto ha cambiado desde el reciente hallazgo de

que existen diferentes subpoblaciones de células T que se diferencian por el patrón de citocinas que producen y que ha sentado bases importantes para el entendimiento de las múltiples funciones de estas células (Mosmann, et al. 1986; Sher y Coffman, 1992).

Hay evidencia substancial de que las respuestas de protección o cronicidad en ratones infectados con *Leishmania major* representan el desarrollo de respuestas Th1 y Th2 respectivamente. Por ejemplo, los linfocitos CD4⁺ de ratones Balb/c con infección crónica por *Leishmania sp.* contienen niveles significativos de ARNm para IL-4 (Th2) pero poco ARNm para interferón- γ (Th1), mientras que células de ratones de una cepa resistente (C57/BL6) contienen niveles más altos de ARNm para interferón γ (IFN- γ) pero poco ARNm para IL-4 (Heinzel, et al. 1989, 1991). De tal forma, que los ratones que eliminan la infección tienen una fuerte respuesta de células Th1 y los que presentan enfermedad crónica tienen una fuerte respuesta de células Th2 (Sher y Coffman, 1992). Parece existir una regulación cruzada entre las poblaciones, ya que la presencia de IFN- γ no permite la activación de linfocitos Th2, mientras que la producción de IL-10 por Th2 suprime la activación de Th1 (Cox y Liew, 1992). Resultados más recientes muestran que ratones susceptibles y deficientes del gene de IL-4 siguen padeciendo la enfermedad, lo cual indica que la presencia de IL-4 *in vivo* no es el único factor determinante para la susceptibilidad contra la enfermedad (Noben-Trauth, et al. 1996).

En infecciones de ratones con otros helmintos como *Schistosoma mansoni* o *Nippostrongylus brasiliensis*, también se ha observado esta diferencia en la producción de citocinas por las subpoblaciones de células T cooperadoras. Estos estudios han revelado que hay altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 (Th2) en ausencia de producción apreciable de IL-2 e IFN- γ (Th1). Proporciones similares de citocinas se han observado cuando las células son estimuladas con mitógenos, lo cual sugiere que hay una alteración generalizada en la función de los linfocitos en los animales infectados (Finkelman, et al. 1991).

Se ha reportado que el metacéstodo de *Taenia solium* libera *in vitro* una sustancia termoestable, dializable y de bajo peso molecular (<3.500 Da). Los análisis sugieren que es un ribonucleopéptido, ya que tiene un pico máximo de absorbancia a 249 nm, contiene ribosa unida a pirimidina (Massart y Hoste, 1947) y cuando es sometida a digestión con ARNasa pierde su actividad biológica, mientras que cuando es digerida con tripsina la mejora. Este factor deprime la respuesta inmune en ratones a la vacunación contra fiebre tifoidea murina (Molinari, et al. 1989), e *in vitro* inhibe la incorporación de timidina tritiada en linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (Molinari, et al. 1990) y murinos estimulados con Concanavalina A (Tato, et al. 1995).

Finalmente, Tato, et al. (1995) encontraron que la célula que participa en la supresión de la incorporación de timidina (³H) es el linfocito T, ya que al cocultivar linfocitos tratados con el factor y linfocitos frescos en presencia de Con A, se indujo supresión de las respuestas proliferativas al mitógeno, mientras que, al cocultivar células adherentes tratadas y linfocitos frescos no se observó depresión de la respuesta a Con A. Sin embargo, todavía no se tiene información sobre la subpoblación de linfocitos que es afectada por este factor de metacéstodo y si promueve o inhibe la producción de citocinas que pudieran estar modulando la respuesta del huésped.

OBJETIVOS

Objetivo general:

1. Determinar que subpoblación de células murinas T es afectada por el factor de metacéstodo y si esta actividad altera la producción de citocinas *in vitro* e *in vivo*.
2. Determinar si el factor de metacéstodo afecta la producción de TNF- α en macrófagos *in vitro*.

Objetivos particulares:

1. Determinar la concentración de interleucina 2 (IL-2), interferón-gama (IFN- γ), interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos pre-incubados con factor de metacéstodo y estimulados con Con A.
2. Determinar la concentración del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) en sobrenadantes de cultivos de macrófagos pre-incubados con factor de metacéstodo y estimulados con lipopolisacárido (LPS) e interferón-gama (IFN- γ).
3. Caracterizar si la adición de interleucina 2 recombinante (rIL-2) exógena, interleucina 4 recombinante (rIL-4) exógena e interferón-gama recombinante (rIFN- γ) exógeno (experimento de dosis respuesta) a linfocitos deprimidos por el factor de metacéstodo, revierte la supresión celular (reconstitución).
4. Caracterizar si la adición de un anticuerpo monoclonal anti-interleucina 10 (mAb anti-IL-10, experimento de dosis respuesta) a linfocitos deprimidos por el factor de metacéstodo, revierte la supresión celular (reconstitución).

5. Determinar la concentración de interferón-gama (IFN- γ) e interleucina 4 (IL-4) en sobrenadantes de cultivos de linfocitos de ratones inoculados con factor de metacéstodo y estimulados *in vitro* con Concanavalina A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Factor de metacéstodo

Cerdos cisticercosos infectados naturalmente, de 5 a 6 meses de edad fueron adquiridos en poblados del municipio de Iguala, Guerrero, zona endémica de cisticercosis porcina. Se trasladaron al Instituto de Fisiología Celular y se sacrificaron. La obtención del factor de metacéstodo (FM) se realizó según el método descrito por Jato, et al. (1995), los metacéstodos se diseccionaron de la carne de cerdo y se colocaron en 500 ml de agua desionizada estéril durante 6 hrs a temperatura ambiente. Al término de este tiempo se centrifugaron a 10,000 g en una centrifuga Sorval RC 5B plus (DuPont. Instruments) durante 15 min. El sobrenadante se liofilizó y se resuspendió en 5 ml de agua desionizada, se dializó a 4°C, contra 100 ml de agua en un tubo de diálisis que excluye moléculas menores de 3,500 Da (Spectrum Medical Industries, Inc.). Al cabo de 12 hrs el material fuera de la bolsa de diálisis se liofilizó y almacenó a -20°C, hasta su uso.

Determinación química

Con el fin de cuantificar el FM que se iba a utilizar en cada experimento, se realizó la determinación química de ribosa por medio de la prueba de orcinol (Ashwell, G. 1957), la cual consistió en realizar diluciones de la muestra problema en donde la concentración final fue de 500 µg y 250 µg peso seco. De estas diluciones se tomaron 0.5 ml, los cuales se adicionaron a 1.5 ml de ácido tricloroacético (TCA; Merck) al 5% y se colocaron en baño María durante 15 minutos. Los tubos se retiraron del baño María y se centrifugaron con la finalidad de eliminar proteínas desnaturalizadas. A 1 ml del sobrenadante se le adicionaron 2 ml de una solución que contenía 50 mg de FeCl₃ en 100 ml de HCl 12 N y 40 mg de orcinol (Sigma Chemical, Co.) por cada 10 ml y se colocaron en baño María durante 15 minutos más. Finalmente se enfriaron durante 5 minutos y se estimó la absorbancia a 670 nm en un espectrofotómetro (Ultraspec II, LKB Biochrom).

Cromatografía en Bio-Gel P6

Lotes de 100 mg de peso seco del FM se resuspendieron en 2.0 ml de agua desionizada y se separaron a través de una columna de Bio-Gel P6 (70 x 0.9 cm; Bio-Rad). El material se eluyó con agua desionizada, y la salida del material se detectó con una unidad óptica a 280 nm con un detector ISCO UA5. Se colectaron fracciones de 3 ml. La absorbancia de cada fracción se determinó a 260 y 280 nm. Las fracciones de cada pico se mezclaron, liofilizaron y almacenaron a -20°C

Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

Utilizando un equipo de análisis HPLC (CKB Broma, modelo 2140) y siguiendo el método descrito por Wehr (1980), se analizaron muestras del pico 1 a concentraciones de 10 µg de ribosa/100 µl de agua. Las muestras se cargaron en una columna de fase reversa de C18 (Dynamax-300A, Rainin) (10 mm x 25 cm), el material se detectó a una longitud de onda de 256 nm, el volumen total en cada análisis duró 30 minutos, para la elución se usó un gradiente lineal cuyos amortiguadores fueron: A) Tris 0.1M y B) Tris 0.1 M y NaCl 1.0 M.

Transformación blastoide

Para realizar los ensayos de transformación blastoide se siguió el protocolo descrito por Tato, et al. (1995). Se obtuvieron los bazos de los ratones en condiciones asépticas y se colocaron en cajas petri que contenían 20 ml de RPMI 1640 incompleto (RPMI-1, Gibco, BRL), se perfundieron cuidadosamente con el medio utilizando una jeringa de 10 ml, para la obtención de una suspensión celular.

Las células se centrifugaron a 400 g en una centrifuga CRU-5000 (Damon/IEC) durante 10 minutos y el botón celular se resuspendió en RPMI 1640 complementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, BRL) y una mezcla de penicilina 100 µg/ml y estreptomicina 25 µg/ml (Gibco, BRL) (RPMI-C), a una concentración de 5×10^6 células/ml. Utilizando una placa de cultivo de 96 pozos (Costar, Co.) se colocaron 5×10^4 células en 100 µl/pozo, 100 µl de RPMI-C conteniendo Concanavalina A (5 µg/ml; Sigma Chemical, Co.) y 20 µl conteniendo 10 µg de FM. Se incluyeron testigos y blancos.

Los cultivos se incubaron en una estufa Forma Scientific modelo 3158 durante 72 hrs a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. A las 48 hrs se agregó 1 µCi de timidina tritiada con una actividad específica de 74 Gbq/mmol (ICN Biomedicals, Inc.) a cada pozo. Diecisiete horas después del marcaje, las células se cosecharon en papel filtro (Whatman, 934-AH) y lavaron por medio de un cosechador múltiple (Nunc, Denmark). Los discos de papel filtro se dejaron secar y se colocaron en viales (Kimble Glass Inc.) que contenían 8 ml de líquido de centelleo (Tato, et al. 1995). La cantidad de radioactividad se midió en un contador de centelleo Packard Tri-carb 300.

Efecto del factor de metacésto en la viabilidad celular

La viabilidad de las células esplénicas de ratón se estimó incubando 100 µl de una suspensión celular de bazo de ratón que contenía 5×10^6 células/ml en presencia de 20 µl de diferentes concentraciones del FM o píce 1 (10 o 20 µg de ribosa) en RPMI-C. Se incubó durante 48 hrs a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y después se determinó la viabilidad celular por exclusión de azul tripano (Sigma Chemical, Co.).

Obtención de sobrenadantes de linfocitos cultivados en presencia de Con A y FM.

Se utilizó una placa de cultivo de 24 pozos (Costar, Co.) en donde se colocó 1 ml de la suspensión celular obtenida para los experimentos de transformación blastoide (5×10^6 células/ml), 100 μ l de RPMI-C conteniendo 5 μ g/ml de Concanavalina A y 100 μ g de FM en 100 μ l de RPMI-C a cada pozo.

Los cultivos se incubaron durante 72 hrs a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂, las células se cosecharon mediante centrifugación a 400 g durante 10 minutos, el sobrenadante se recuperó y se almacenó a -70°C hasta su uso posterior en la determinación de citocinas.

Para determinar la concentración de IL-2 se utilizaron células CHL-2, por lo que los sobrenadantes tuvieron que ser dializados para eliminar cualquier remanente de FM. El sobrenadante se dializó contra 50 ml de agua a 4°C en un tubo que excluye moléculas menores de 3,500 Da. Se esterilizó por filtración a través de una membrana Milliporo de 0.22 μ m de poro y se almacenó a -70°C hasta su uso posterior.

Obtención de sobrenadantes de macrófagos cultivados en presencia de LPS, IFN- γ y FM.

Los macrófagos utilizados para el estudio del efecto del FM fueron de una línea celular denominada IC-21 (obsequiada amablemente por el Dr. Vianney Ortiz, CMN Siglo XXI, I.M.S.S.). Las células se mantuvieron en medio RPMI-C, se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂ y cuando se observó confluencia, las células se separaron de la caja utilizando una solución de tripsina al 0.05% y EDTA-4Na 0.53 mM (tripsina-EDTA), se lavaron una vez utilizando RPMI-I y finalmente se volvieron a sembrar en cajas de 75 cm² usando medio fresco.

Para obtener los sobrenadantes se utilizó una placa de cultivo de 24 pozos donde se colocaron los macrófagos a crecer en RPMI-C y una vez que hubo confluencia se les agregó 100 µg de FM disueltos en 0.1 ml y se incubaron por 24 hrs. Al término de este tiempo se lavaron con RPMI-F a 37°C, para evitar que los macrófagos se despegaran de la caja. Posteriormente se agregó 1 ml de RPMI-C conteniendo 10 ng/ml de LPS (Sigma Chemical, Co.) y 100 U/ml rIFN-γ, se dejaron incuban por 24 hrs más y finalmente se obtuvo el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur. (Ralph, et al. 1992).

Experimentos de reconstitución y neutralización

En los experimentos de reconstitución se agregaron 5×10^5 células en 100 µl de la suspensión celular, 20 µl que contenían 10 µg de FM y 100 µl de RPMI-C conteniendo las siguientes dosis de interleucinas y concanavalina A (5 µg/ml; Sigma Chemical, Co.) en cada pozo. Interleucina-2 recombinante murina (rIL-2; Genzyme Diagnostics) 10 y 100 U/ml, interleucina-4 recombinante murina (rIL-4; Sigma Chemical, Co.) 12 y 120 U/ml e interferón-γ recombinante murino (rIFN-γ; Pharmingen) 1, 5, 10 y 20 ng/ml (Cuadro 1).

En el ensayo de neutralización con anticuerpo monoclonal anti-IL-10, se agregaron 5×10^5 células en 100 µl de la suspensión celular, 100 µl/pozo de RPMI-C conteniendo 2 o 4 µg/ml del anticuerpo monoclonal anti-IL-10 de ratón (mAb anti-IL-10, mAb JES5-2A5; Pharmingen; Harlow y Lane, 1988) y concanavalina A (5 µg/ml; Sigma Chemical, Co.) (cuadro 1).

Cuadro 1. Concentración de citocinas y de anticuerpo monoclonal anti-IL-10 utilizadas durante los experimentos de reconstitución y neutralización en ensayos de proliferación de linfocitos tratados con el FM.

Cítocina o Anticuerpo	Concentraciones			
	rIL-2	1.0 U/pozo		10 U/ pozo
rIL-4	1.2 U/pozo		12 U/ pozo	
rIFN-γ	0.1 ng/ pozo	0.5 ng/ pozo	1.0 ng/ pozo	2.0 ng/ pozo
mAb-anti-IL-10	0.2 µg/pozo		0.4 µg/pozo	

Los cultivos se incubaron durante 72 hrs a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. A las 48 hrs se agregó 1 µCi de timidina tritiada a cada pozo. Diecisiete horas después del marcaje, las células se cosecharon en papel filtro (Whatman, 934-A11) y lavaron por medio de un cosechador múltiple. Los discos de papel filtro se dejaron secar y se colocaron en viales que contenían 8 ml de líquido de centelleo (Tato, et al. 1995). La cantidad de radioactividad se midió en un contador de centelleo Packard Tri-carb 300.

Experimentas *In Vivo*

Se utilizaron ratones BALB/c singénicos de nuestro bioterio, con un peso de 18 a 20 g. Se les inoculó 100 µg de FM por vía i.p. cada 4 días durante 12 días. Se incluyeron testigos inoculados con 0.1 ml de salina isotónica.

Se obtuvieron células de bazo de cada ratón para realizar un ensayo de transformación blastoide con el propósito de obtener sobrenadantes y poder determinar la concentración de citocinas en estas células.

Determinación de la concentración de citocinas

IL-4, INF-γ y TNF-α

Las citocinas IL-4, INF-γ y TNF-α se determinaron por medio de inmunoensayo enzimático (prueba de ELISA), bajo el principio de doble anticuerpo. Para la determinación de IL-4 se utilizaron anticuerpos comprados a Pharmingen (mAb anti-IL-4 BVD4-1D11 y Ab policlonal biotilado anti-IL-4 BVD6-24G2), mientras que para INF-γ y TNF-α se utilizaron estuches completos comprados a Genzyme (Intertest-γ y Factor-Test-X, Genzyme, Diagnostics).

Se siguió el método descrito por Harlow y Lane (1988) que consiste brevemente en:

1. Diluir el anticuerpo de captura (monoclonal) a una concentración de 4 µg/ml en amortiguador de bicarbonato de sodio, pH 8.2. Agregar 50 µl de dicha solución a una placa de ELISA de 96 pozos (Nunc, Denmark) e incubar toda la noche a 4°C.
2. Lavar la placa dos veces con amortiguador salino de fosfatos y 0.05 % de Tween 20 (PBS-Tween 0.05%).
3. Bloquear la placa agregando 200 µl/pozo de una solución de PBS-Albúmina sérica bovina (Sigma Chemical, Co.) al 3 % (PBS-BSA 3%) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente y lavar 4 veces con PBS-Tween 0.05%.
4. Añadir 100 µl/pozo de los estándares y muestras diluidas en PBS-BSA 3%, incubar toda la noche a 4°C y lavar 4 veces con PBS-Tween 0.05%.
5. Diluir el segundo anticuerpo (anticuerpo biotinilado o anticuerpo policlonal) a una concentración de 4 µg/ml en PBS-BSA 3%, agregar 100 µl/pozo e incubar por 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar la placa 6 veces y agregar 100 µl de la dilución del tercer anticuerpo (anticuerpo peroxidado) o de la estreptavidina peroxidada, según sea el caso e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavar 8 veces con PBS-Tween 0.05%, añadir 250 µl/pozo de la solución del sustrato e incubar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que se observe la reacción.
8. Detener la reacción con ácido sulfúrico 2.5 M y leer la absorbancia a 450 nm de longitud de onda para IFN-γ y TNF-α y a 490 nm para IL-4.

Cuadro 2. Reactivos de ELISA utilizados para las determinaciones de las diferentes citocinas

Citocina	1 ^{er} Ab.	2 ^{do} Ab.	3 ^{er} reactivo	Sustrato	D.O. (nm)
IL-4	Rata mAb anti-IL-4 IgG ₂	Rata Ab anti-IL-4 IgG ₁ biotinilado	Estreptavidina peroxidada*	OPD*	490
IFN- γ	Hámster mAb anti- IFN- γ de ratón	Cabra Ab policlonal anti- IFN- γ de ratón	Burro Ab policlonal anti- cabra peroxidado	metanol, DMSO y glicerol*	450
TNF- α	Hámster mAb anti- TNF- α de ratón	Cabra Ab policlonal anti- TNF- α de ratón peroxidado	-----	TMB en metanol, DMSO y glicerol	450

- * Estreptavidina peroxidada (Pierce), OPD: ortofenilendiamina (Sigma Chemical, Co), TMB: tetrametilbenzidina (Genzyme, Diagnostics), DMSO: dimetilsulfóxido (Genzyme, Diagnostics)

Interleucina 2 (IL-2)

Esta interleucina se determinó utilizando una línea celular denominada CTLL-2 donada por el Dr. Rafael Saavedra (IB, U.N.A.M.). Esta línea proviene de células esplénicas de ratón desarrolladas en presencia de factores de crecimiento, ocasionando una transformación espontánea a la dependencia de IL-2 o IL-4. Estas células se mantuvieron en cultivo y una vez crecidas se utilizaron para el bioensayo.

Para mantenerlas en cultivo se sembraron en cajas de 75 cm² con 25 ml de RPMI-C y 1 U/ml de rIL-2. Una vez que se obtuvo una concentración de 1×10^6 células/ml se diluyeron en una proporción de 1:10.

Para cuantificar la concentración de IL-2 se recolectaron células en fase de crecimiento (2 días después de la dilución) y se lavaron dos veces con RPMI-1 sin rIL-2. Los lavados se realizaron por centrifugación a $335 \times g$ durante 8 minutos, agregando 30 ml de RPMI-1. Después se resuspendieron en 10 ml de RPMI-C y se sembraron en cajas de 24 pozos (Costar, Co.) se incubaron durante 2 hrs a $37^{\circ}C$ y 5% de CO_2 , se lavaron dos veces más y el sedimento se resuspendió a una concentración final de 1×10^5 células/ml.

De la suspensión anterior se sembraron 100 μ l/pozo en una caja de 96 pozos y a cada pozo se le agregaron 100 μ l de los sobrenadantes dializados de linfocitos o bien 100 μ l de RPMI-C y diferentes concentraciones de rIL-2 (1.5, 3.1, 6.3, 12.5, 25 U/ml) para obtener una curva estándar, además, se agregaron 1.5 ng/ml de un anticuerpo anti-IL-4 (rata mAb anti-IL-4 murina, Genzyme, Diagnostics) a cada pozo, con la finalidad de bloquear el efecto de esta interleucina. Las células se incubaron a $37^{\circ}C$ y 5% de CO_2 , se le agregó 0.5 μ Ci de timidina tritada a las 24 hrs y se cosecharon a las 48 hrs. La radioactividad se midió en un contador de centelleo Packard Tri-carb 300. Se incluyeron testigos y blancos (Gillis, et al. 1978).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables experimentales se realizó usando un programa estadístico "Sigma Stat para windows. Statistical Software. Versión 1.0" (Jandel Corporation), en el cual se hicieron las pruebas de t o ANOVA. En dichas pruebas el límite máximo permitido del valor alfa (α) fue de 0.05 y el valor expresado como p es la significancia expresada en cada caso.

RESULTADOS

Cromatografía en Bio-Gel P6

El cromatograma mostró dos picos (1 y 2), el material eluido se detectó usando longitudes de onda de 260 y 280 nm (Fig. 1).

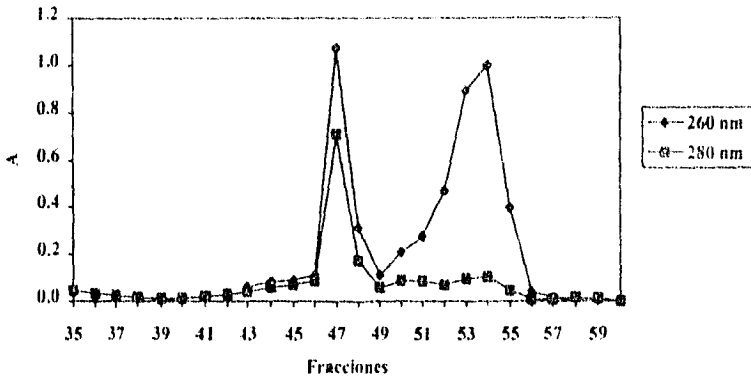


Fig. 1. Cromatograma del extracto crudo del factor de metacéstrodo en una columna de Bio-Gel P6. La elución se realizó con agua desionizada estéril, se recolectaron fracciones de 3 ml.

Determinación química

Se realizó la determinación química de extracto crudo del FM, detectándose la presencia de ribosa a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, mientras que los picos de la cromatografía en Bio-Gel P6 contenían 13 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Transformación Blastóide

Con el objeto de comprobar la actividad del extracto crudo del factor de metacéstodo así como la del pico 1 (fracciones 46-48, Bio-Gel P6), se procedió a efectuar una prueba de transformación blastóide con células esplénicas murinas.

Estos experimentos mostraron una disminución en la incorporación de timidina (^3H) como respuesta a la presencia del extracto crudo y del pico 1 en los cultivos correspondientes. El efecto supresor tanto del factor crudo como del material purificado, mostró ser dosis dependiente (Fig. 2 y Fig. 3).

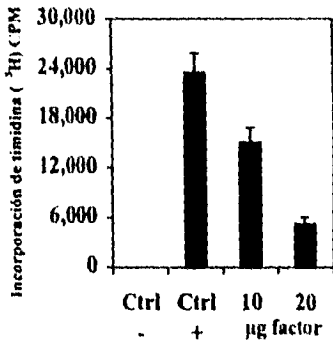


Fig. 2. Efecto del extracto crudo del factor de metacéstodo sobre la proliferación de linfocitos estimulados con Con A. Las barras representan la media \pm DS. $p=0.0065$ Ctrl (+) vs 10 y $p=0.0002$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de *t*.

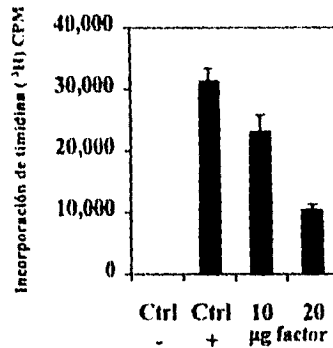


Fig. 3. Efecto del pico 1 (Bio-Gel P6), sobre la proliferación de linfocitos estimulados con Con A. Las barras representan la media \pm DS. $p=0.0121$ Ctrl (+) vs 10 y $p<0.0001$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de *t*.

Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC)

Habiendo comprobado que el pico 1 posee la actividad supresora, se procedió a determinar la pureza del material, realizándose un análisis cromatográfico por HPLC. El análisis confirmó la presencia de un solo componente que se eluyó a los 4.48 minutos (Fig. 4).

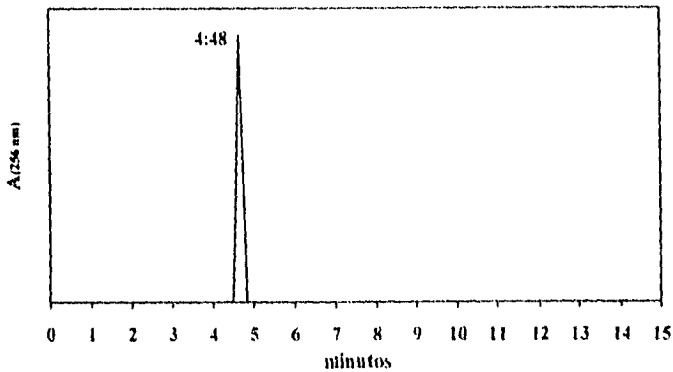


Fig. 4. El análisis cromatográfico del pico 1 en HPLC, mostró un solo pico a los 4:48 minutos. La cromatografía se realizó en una columna de C18, utilizando un gradiente lineal cuyos amortiguadores fueron: A) Tris 0.1M y B) Tris 0.1M y NaCl 1.0M durante 30 minutos.

Efecto del factor de metacésto sobre la viabilidad celular

Debido a que la disminución en la incorporación de timidina (^3H), que se observó en los experimentos de transformación blastoide podría deberse a muerte celular y no a supresión, se realizó un estudio para determinar si el FM afectaba la viabilidad celular. Los resultados mostraron que durante 48 hrs con dosis de 10 y 20 μg del FM solo hubo una mortalidad del 7 y 13 % respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Viabilidad de células de bazo de ratón cultivadas durante 48 hrs en presencia de diferentes dosis del factor de metacétodo.

Dosis (μg) de FM	Viabilidad (%)
0	100
10	93
20	87

Determinación de la concentración de citocinas

Para la proliferación de los linfocitos se requiere la presencia de citocinas que ellos mismos producen en respuesta a una estimulación con un mitógeno (Liles y Van Voorhis, 1995), por lo que el siguiente paso era investigar si en la supresión observada en los linfocitos tratados con FM se encontraba alterada la producción de alguna citocina, al comparar su concentración con aquella de los linfocitos testigos cultivados en las mismas condiciones sin FM.

Para estimar la concentración de IL-2, IL-4 e IFN- γ se realizó la determinación de la concentración de dichas citocinas en sobrenadantes de linfocitos tratados con 10 μ g del factor de metacétodo, en pruebas de transformación blastoide y para determinar si la disminución en la concentración de dichas citocinas era la responsable del efecto supresor, se realizaron pruebas de transformación blastoide agregándolas de manera exógena.

Para caracterizar si el efecto observado se debía a la presencia de IL-10 se hizo un ensayo de neutralización contra la citocina, durante una prueba de transformación blastoide en presencia de FM.

Interleucina 2 (IL-2)

En la prueba de proliferación de linfocitos para obtener sobrenadantes, se observó que la supresión es dosis dependiente del FM. La diferencia de incorporación de timidina (^3H) fue significativa para todas las dosis en relación a las pruebas con linfocitos testigos (Fig. 5).

Los resultados de la determinación de IL-2 en sobrenadantes de cultivos de linfocitos en presencia del FM (10 y 20 $\mu\text{g}/\text{pozo}$), mostraron una concentración de IL-2 significativamente disminuida respecto de los testigos ($p=0.0001$) (Fig. 6).

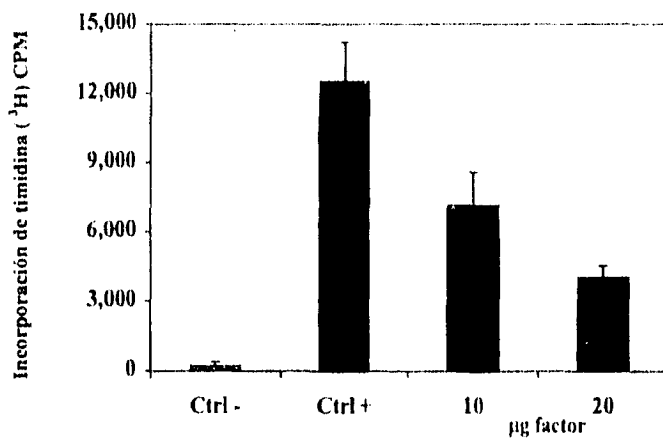


Fig. 5. Efecto del factor de metacéctodo en la proliferación de linfocitos estimulados con Con A. Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS. $p=0.0294$ Ctrl (-) vs 10 y $p=0.0029$ Ctrl (-) vs 20 utilizando una prueba de t .

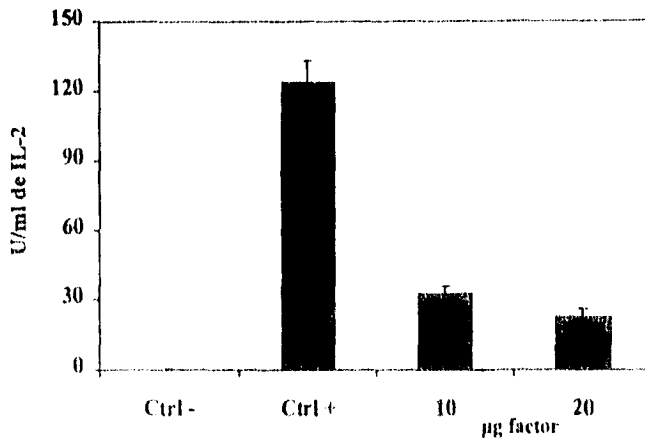


Fig. 6. Producción de IL-2 en sobrenadantes de linfocitos estimulados con Con A en presencia del factor metacéstodo. Las barras representan la media de 3 experimentos \pm D.S. $p=0.0001$ Ctrl (+) vs 10 y $p=0.0001$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de t .

En virtud de que los linfocitos tratados con el factor de metacéstodo sufrieron una supresión en su proliferación y una reducción en la producción de IL-2, se ensayó la adición de rIL-2 exógena para probar si ésta reconstituía la proliferación de las células.

Los resultados de este experimento mostraron que la proliferación afectada en los linfocitos tratados con FM se pudo restituir hasta en un 85 % con la adición de 100 U/ml de rIL-2, la restitución mostró ser dependiente de la dosis (Cuadro 4 y Fig. 7).

Cuadro 4. Reconstitución de la proliferación de linfocitos estimulados con Con A y suprimidos con FM (10 µg) en presencia de diferentes concentraciones de rIL-2.

rIL-2 (U/ml)	Con A media (CPM) \pm D.S.	Con A + FM (10 µg) media (CPM) \pm D.S.	Porcentaje de Reconstitución
0	13,815 \pm 1,498 ^a	3,951 \pm 1,633 ^b	29
10	9,352 \pm 2,687 ^a	7,068 \pm 1,184 ^c	51
100	13,930 \pm 3,255 ^a	11,727 \pm 2,255 ^d	85

(a) No se encontraron diferencias significativas entre 0 y las 2 dosis de rIL-2 de los testigos (ANOVA); $p=0.0015$ en (a) vs (b), $p=0.0023$ en (a) vs (c) y $p=0.0604$ en (a) vs (d) utilizando una prueba de t .

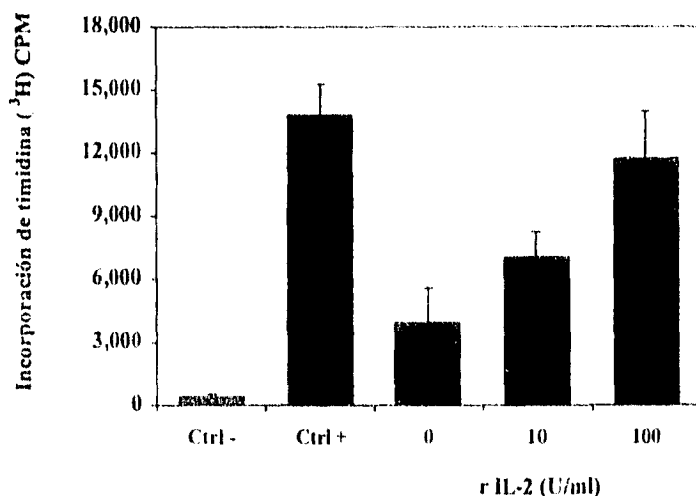


Fig. 7. Reconstitución de la respuesta proliferativa por adición de rIL-2 en cultivos de linfocitos estimulados con Con A en presencia de 10 µg del factor de metacéstono. Las barras representan la media de 3 experimentos ± DS y el Ctrl (+) es sin rIL-2 $p=0.0015$ Ctrl (+) vs 0, $p=0.0023$ Ctrl (+) vs 10 y $p=0.0604$ Ctrl (+) vs 100 utilizando una prueba de *t*.

Los análisis estadísticos no mostraron una diferencia significativa entre las diferentes dosis de rIL-2 de los grupos testigos, mientras que entre los linfocitos tratados con FM y el grupo testigo se encontró una diferencia significativa, con excepción de la dosis de 100 U/ml de rIL-2. Los valores de *p* para las dosis de 0 y 10 U/ml de rIL-2 fueron $p=0.0015$ y $p=0.0023$ respectivamente, mientras que la dosis de 100 U/ml tuvo un valor de $p=0.0604$.

Interferón- γ (IFN- γ)

En un nuevo ensayo de proliferación de linfocitos se observó que el factor de metacéstdo produjo una supresión dosis dependiente de la proliferación de los linfocitos (Fig. 8).

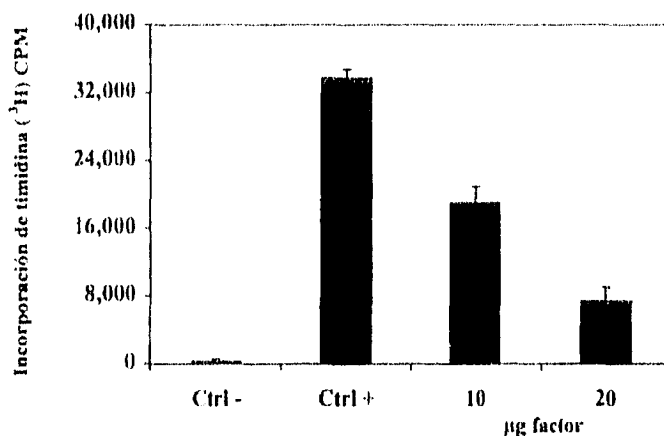


Fig. 8. Efecto del factor de metacéstdo en la proliferación de linfocitos estimulados con Con A. Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS. $p=0.0002$ Ctrl (+) vs 10, y $p=0.0001$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de t .

Se observó que la concentración de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos anteriores también estaba disminuida (Fig. 9). La diferencia de la concentración de IFN- γ entre los sobrenadantes de los grupos tratados con el factor de metacéstdo y el testigo fue evidente. La diferencia fue estadísticamente significativa entre los valores de las medias del grupo testigo y aquellos de los tratados con FM. Los valores de significancia fueron de $p=0.0013$ para los experimentos con 10 μ g de FM y $p=0.0004$ para aquellos con 20 μ g.

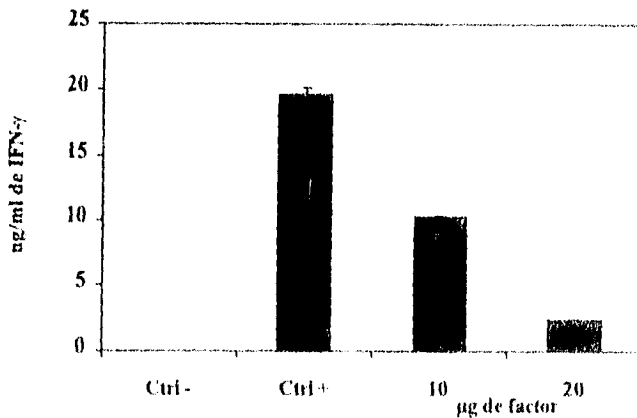


Fig. 9. Producción de IFN- γ en sobrenadantes de linfocitos estimulados con Con A en presencia del factor de metacéctodo. Las barras representan la media de 3 experimentos \pm D.S. $p < 0.0013$ Ctrl (+) vs 10 y $p < 0.0004$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de t .

En el experimento de reconstitución con IFN- γ no se logró restituir la proliferación de linfocitos estimulados con Con A en presencia del factor de metacéctodo, con las dosis utilizadas de rIFN- γ (Cuadro 5 y Fig. 10). El análisis estadístico no mostró una diferencia significativa entre las diferentes dosis de rIFN- γ de los grupos testigos, pero mostró una diferencia significativa entre el grupo testigo y cada uno de los grupos problema.

Cuadro 5. Ensayo de reconstitución en la proliferación de linfocitos estimulados con Con A y suprimidos con FM (10 μ g) en presencia de diferentes concentraciones de rIFN- γ .

rIFN- γ (ng/ml)	Con A media (CPM) \pm D.S.	Con A + FM (10 μ g) media (CPM) \pm D.S.	Porcentaje de Reconstitución
0	14,380 \pm 2,918 ^a	6,867 \pm 789 ^b	48
1	15,622 \pm 3,027 ^a	6,706 \pm 398 ^c	47
5	10,816 \pm 506 ^a	5,895 \pm 1,050 ^d	41
10	9,311 \pm 178 ^a	4,324 \pm 1,091 ^e	30
20	13,930 \pm 240 ^a	5,874 \pm 745 ^f	41

(a) No se encontraron diferencias significativas entre 0 y las 4 dosis de rIFN- γ en los testigos (ANOVA); $p < 0.05$ en (a) vs (b), (a) vs (c), (a) vs (d), (a) vs (e) y (a) vs (f) utilizando una prueba de t .

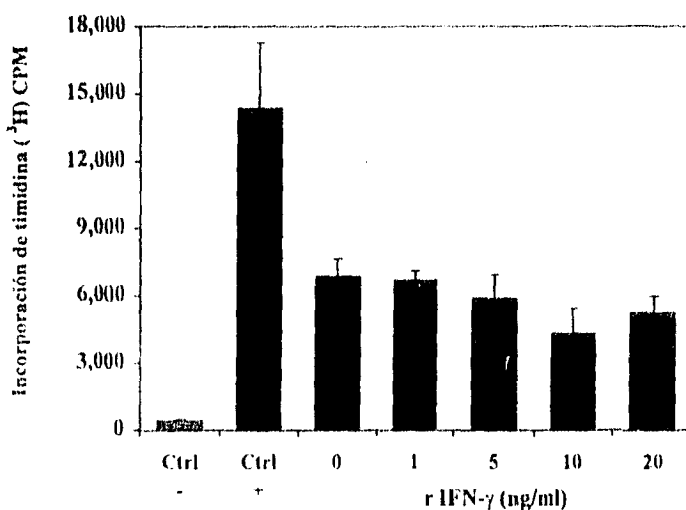


Fig. 10. Reconstitución de la respuesta proliferativa por la adición de rIFN- γ en cultivos de linfocitos estimulados con Con A en presencia de 10 μg del factor de metacéstono. Las barras representan la media de 3 experimentos: DS y el Ctrl (-) es sin rIFN- γ . $p < 0.05$ en todos los casos utilizando una prueba de t .

Interleucina 4 (IL-4)

Con el objeto de saber si la disminución observada en la producción de IL-2 e IFN- γ , se debía a una supresión generalizada o bien a un aumento en la producción de citocinas propias de células Th2, las cuales pudieran estar modulando la expresión de citocinas de Th1, se procedió a determinar la concentración de IL-4 e IL-10.

Se determinó la concentración de IL-4 en los mismos sobrenadantes obtenidos para la determinación de la concentración de IL-2 (Fig. 5), los resultados mostraron que la IL-4 se encontró disminuida al igual que IL-2 e IFN- γ como se puede observar en la fig. 11. La diferencia en la concentración de IL-4 observada en los sobrenadantes con respecto al

control fué clara, el análisis por medio de una prueba de *t* mostró que la diferencia fue significativa con un valor de $p=0.001$ para 10 μg y $p=0.004$ para 20 μg del factor de metacéstono.

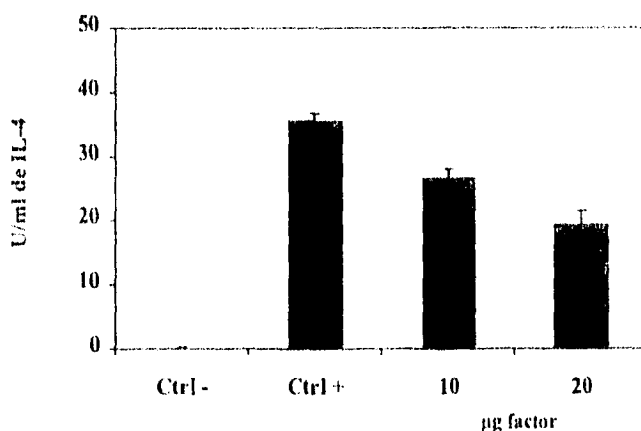


Fig. 11. Producción de IL-4 de sobrenadantes de linfocitos estimulados con Con A en presencia del factor metacéstono. Las barras representan la media de 3 experimentos : DS, $p=0.0010$ Ctrl (+) vs 10, y $p=0.0040$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de *t*

Debido a que IL-4, al igual que IL-2, es un factor de crecimiento para células T, procedimos a probar si la citocina recombinante era capaz de revertir el efecto supresor del factor de metacéstono en un ensayo de proliferación. En la figura 12 y el cuadro 6 se muestran los resultados de dicho ensayo, en donde se observa que rIL-4 reconstituyó en 71% la proliferación celular con la dosis más alta (120 U/ml), aunque no con la misma eficiencia que rIL-2. La prueba de ANOVA entre las diferentes dosis de rIL-4 de los grupos testigos no mostraron una diferencia significativa, mientras que la prueba de *t* mostró una diferencia significativa entre los cultivos tratados con 0 y 12 U/ml y su testigo con un valor de $p=0.02$ y $p=0.04$ respectivamente.

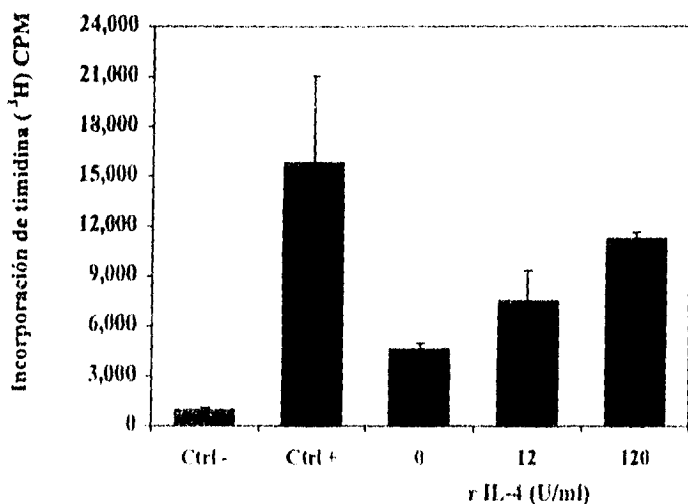


Fig. 12. Efecto de diferentes concentraciones de rIL-4 sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con Con A en presencia de 10 µg del factor de macrófagos. Las barras representan la media de 3 experimentos ± D.S. y el Ctrl (+) es sin rIL-4. $p=0.02$ Ctrl (+) vs 0, $p=0.04$ Ctrl (+) vs 12 y $p=0.2074$ Ctrl (+) vs 120 utilizando una prueba de t .

Cuadro 6. Reconstitución de la proliferación de linfocitos estimulados con Con A y suprimidos con FM (10 µg) en presencia de diferentes concentraciones de rIL-4.

rIL-4 (U/ml)	Con A media (CPM) ± D.S.	Con A + FM (10 µg) media (CPM) ± D.S.	Porcentaje de Reconstitución
0	15,806 ± 5,239 ^a	4,616 ± 350 ^b	29
12	18,279 ± 5,388 ^a	7,498 ± 1,812 ^c	47
120	18,146 ± 4,902 ^a	11,249 ± 378 ^d	71

(a) No se encontraron diferencias significativas entre 0 y las 2 dosis de rIL-4 en los testigos (ANOVA); $p=0.02$ en (a) vs (b), $p=0.04$ en (a) vs (c) y $p=0.2074$ en (a) vs (d) utilizando una prueba de t .

Interleucina 10 (IL-10)

IL-10 es una citocina pleiotrópica que funciona como un modulador importante de la respuesta inmune y de las funciones de células inmunológicas como la inhibición de reactivos intermediarios de oxígeno y nitrógeno en macrófagos, el incremento de la expresión de moléculas clase II del MHC en linfocitos B pequeños y la supresión en la proliferación de linfocitos T en presencia de células presentadoras de antígeno. Esta citocina es capaz de inhibir funciones efectoras de macrófagos, así como bloquear la síntesis de citocinas por parte los linfocitos T u otra población celular (Moore, et al. 1993). Debido a que la IL-10 es capaz de inhibir la síntesis de otras citocinas se decidió determinar la presencia de ésta en cultivos de células estimuladas con Con A en presencia de 10 µg del factor. Con este fin, se realizaron ensayos de neutralización por medio de un anticuerpo monoclonal anti-IL-10 en los ensayos de transformación blastoide en presencia del factor. En el cuadro 7 y la figura 13 se muestran los resultados en donde se observa que ninguna de las dosis de este anticuerpo fue capaz de revertir el efecto supresor del factor de metacéstono sobre los linfocitos cultivados.

Cuadro 7. Ensayo de reconstitución en la proliferación de linfocitos estimulados con Con A en presencia de diferentes concentraciones de α -IL-10 y 10 µg del factor de metacéstono

α -IL-10 (µg/ml)	Con A media (CPM) \pm D.S.	Factor (10 µg) media (CPM) \pm D.S.
0	8,145 \pm 1,079 ^a	4,644 \pm 291 ^b
2	9,250 \pm 3,676 ^a	4,728 \pm 203 ^c
4	8,843 \pm 1,418 ^a	5,394 \pm 414 ^d

(a) No se encontraron diferencias significativas entre 0 y las 2 dosis de α -IL-10 en los testigos (ANCOVA), $p < 0.05$ en (a) vs (b), (a) vs (c) y (a) vs (d) utilizando una prueba de t .

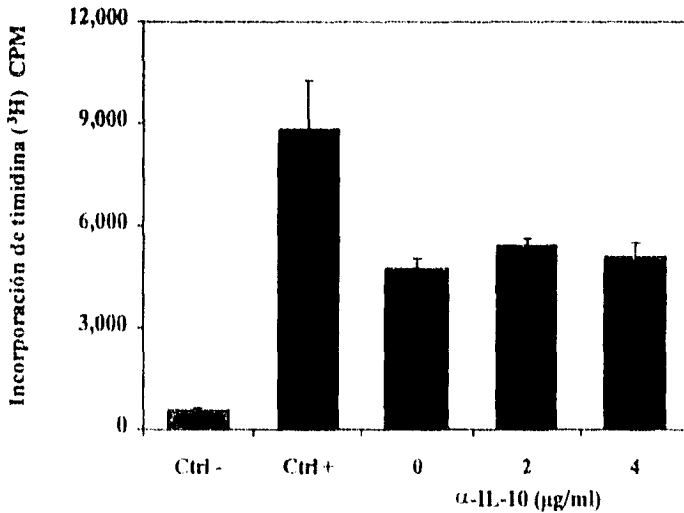


Fig. 13. Efecto de diferentes concentraciones de anticuerpo α -IL-10 sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con Con A en presencia de 10 μ g del factor de metacéstono. Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS y el Ctrl (-) es sin anti-IL-10. $p < 0.05$ en todos los casos utilizando una prueba de t .

El análisis de varianza (ANOVA) entre las diferentes dosis de α -IL-10 de los grupos testigos no mostró una diferencia significativa, mientras que la prueba de t mostró una diferencia significativa entre el control y los grupos con dosis de anticuerpos anti-IL-10 ($p < 0.05$).

Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

Considerando que la concentración de todas las citocinas estudiadas se encontraban disminuidas, se decidió estudiar el efecto del FM sobre la producción de una citocina, el TNF- α , que no es producida exclusivamente por linfocitos. Para esto se determinó la producción de TNF- α en una línea de macrófagos murinos IC-21 estimulada con LPS e IFN- γ en presencia o ausencia del factor de metacéstonos.

Los resultados mostraron que la liberación de TNF- α se encontró disminuida al igual que las otras citocinas (Fig. 14), mostrando una relación dosis dependiente con la concentración del FM. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa con un valor de $p=0.0212$ para la dosis de 10 μg y un valor de $p=0.0039$ para 20 μg del factor.

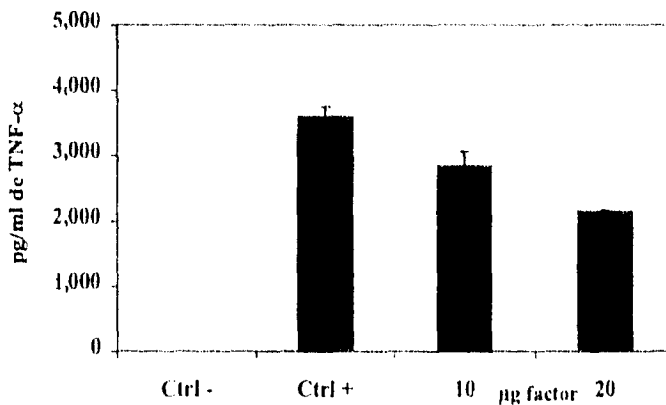


Fig. 14. Concentración de TNF- α en sobrenadantes de macrófagos, estimulados con rIFN- γ y LPS en presencia del factor de metacéctodo durante 48 hrs. Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS. $p=0.0212$ Ctrl (-) vs 10, y $p=0.0039$ Ctrl (+) vs 20 utilizando una prueba de t .

Experimentos *In vivo*

Con el fin de determinar si el FM afecta la producción de citocinas *in vivo*, se inocularon ratones BALB/c con factor de metacéstono (4 dosis de 100 µg de FM cada una), y con células esplénicas de estos animales se realizaron pruebas de transformación blastoide. Los resultados mostraron una disminución significativa de incorporación de timidina (^3H) entre linfocitos de ratones inoculados con el FM y linfocitos de ratones testigos ($p=0.0001$) (Fig. 15).

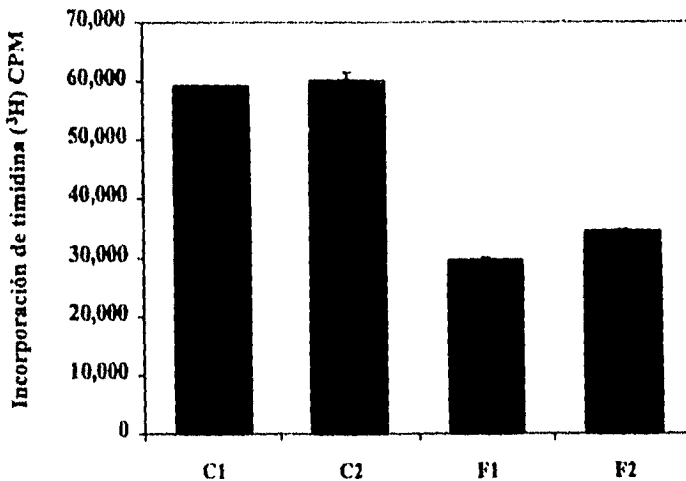


Fig. 15. Efecto del factor de metacéstono sobre la proliferación de células esplénicas de ratones inoculados con solución salina isotónica o con 100 µg del factor durante 12 días, las células se estimulan con Con A durante 48 hrs *in vitro*. Animales testigos (C) y animales con factor de metacéstono (F). Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS de cada animal. $p=0.0001$ C1 y C2 vs F1 y F2 utilizando una prueba de *t*.

De los cultivos de estas células se recuperaron los sobrenadantes, de los cuales se determinaron las concentraciones de IFN- γ e IL-4 (Fig. 16 y Fig. 17). Los resultados mostraron una disminución no significativa estadísticamente en el caso de IFN- γ . En cambio, la disminución de IL-4, tuvo una alta significancia ($p=0.0002$).

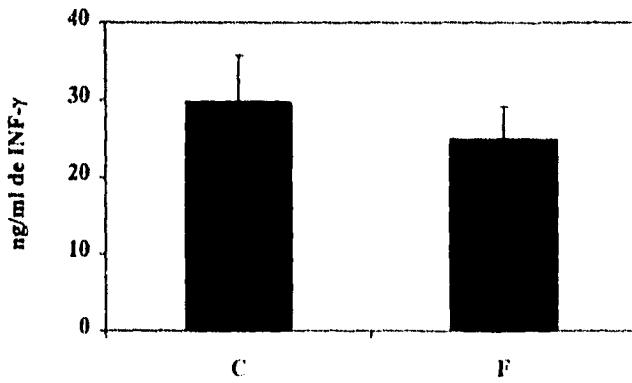


Fig. 16. Concentración de IFN- γ en sobrenadantes de linfocitos de animales inoculados con factor de metacéstodo. Animales testigo (C) y animales con factor (F). Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS. $p > 0.05$ C vs F utilizando una prueba de *t*.

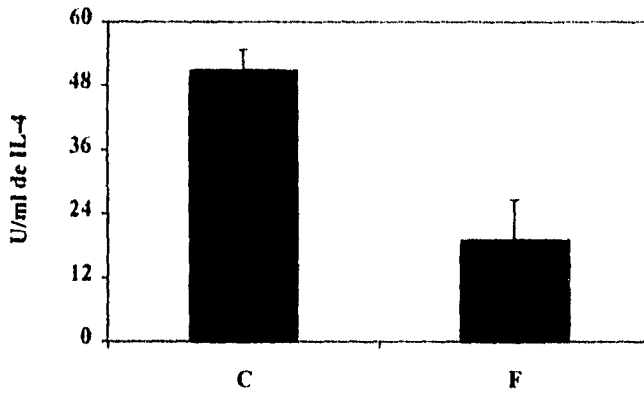


Fig. 17. Concentración de IL-4 en sobrenadantes de linfocitos de animales inoculados con factor de metacéstodo. Animales testigo (C) y animales con factor (F). Las barras representan la media de 3 experimentos \pm DS. $p = 0.0002$ C vs F utilizando una prueba de *t*.

DISCUSION

Los resultados del presente trabajo mostraron la capacidad del factor de metacéstodo para inhibir significativamente ($P < 0.05$) la proliferación, tanto de linfocitos espléncicos obtenidos de ratones normales, como de linfocitos de ratones previamente tratados con el FM y estimulados *in vitro* con concanavalina. Así mismo, se encontró una disminución significativa ($P < 0.02$) de la concentración de citocinas (IL-2, IL-4, IFN- γ y TNF- α) en los sobrenadantes de los ensayos de proliferación de linfocitos y ensayos con macrófagos deprimidos por el FM *in vitro*, en comparación con la concentración de citocinas en los sobrenadantes de linfocitos y macrófagos testigos. También se encontró disminuida significativamente ($P < 0.02$) la concentración de IL-4 y ligera pero no significativa ($P > 0.05$) la de IFN- γ en los sobrenadantes de las pruebas de proliferación de linfocitos obtenidos de ratones tratados con FM, en relación con sus testigos.

En los trabajos previos al presente (Molinari, et al. 1989; Molinari, et al. 1990; Tato, et al. 1995) se reportó el aislamiento del FM y se observó su capacidad para suprimir la incorporación de timidina tritiada por linfocitos humanos y murinos estimulados con fitohemaglutinina y concanavalina respectivamente. Recientemente, (Tato, et al. 1996) encontraron que el FM inhibió la reacción inflamatoria alrededor de metacéstodos de *Taenia solium* implantados subcutáneamente en ratones, además de la disminución en las respuestas humoral y celular hacia antígenos del mismo metacéstodo, que indujo el FM en esos animales.

La hipótesis central de estos trabajos gira sobre el papel del FM en la inmunosupresión reportada en neurocisticercosis humana y porcina. Ridaura (1987) observó ausencia de inflamación alrededor de metacéstodos en pacientes asintomáticos e inmunodeprimidos. Del Brutto y Sotelo (1988) observaron una relación entre la ausencia de sintomatología y la falta de inflamación en LCR en enfermos con neurocisticercosis. Otros investigadores han observado que cuando los parásitos están bien preservados y

probablemente vivos, ellos están rodeados muy a menudo por una discreta reacción inflamatoria (Márquez, 1971; Rabiela, et al. 1882; Escobar, 1983; Villagrán, et al. 1988). En un estudio de 450 casos de neurocisticercosis entre personal militar que regresó de una estancia en la India, Dixon y Lipscomb (1961), concluyeron que clínicamente la neurocisticercosis sigue un prolongado periodo asintomático antes de la aparición de la sintomatología (de 4 a 5 años).

En estudios de cisticercosis porcina se ha observado una discreta reacción inflamatoria alrededor de los parásitos (Herrández-Jaúregui, et al. 1973; Willms, et al. 1980) y a veces ausencia de inflamación (Aluja y Vargas, 1988). Por otro lado, se ha observado una estrecha relación entre la alta viabilidad de los metacéstodos obtenidos de cerdos jóvenes naturalmente cisticercosos, el estado de inmunodepresión y la discreta reacción inflamatoria alrededor de ellos, la cual se puede comparar con la intensa reacción granulomatosa observada alrededor de los metacéstodos de cerdos inmunizados con antígenos del mismo metacéstodo de *T. solium* e infectados experimentalmente con huevos de este parásito o de cerdos naturalmente cisticercosos e inmunizados (Molinari, et al. 1983a; Molinari, et al. 1983b; Molinari, et al. 1985; Molinari, et al. 1993).

Con todas estas observaciones se puede establecer una tríada de signos como denominador común en la neurocisticercosis humana: un cuadro asintomático, parásitos presumiblemente viables y la ausencia o presencia de una discreta inflamación alrededor de los metacéstodos. En contraste, la aparición y establecimiento de un cuadro clínico, concomitante con el desarrollo de un proceso granulomatosa alrededor de los parásitos cuando éstos están degenerados, sugiere que el metacéstodo de *T. solium* mientras está viable en los tejidos de sus huéspedes, debe estar produciendo sustancias que inhiben funciones inmunes por parte del huésped en contra del parásito. Se ha descrito que metacéstodos de *Taenia sp.* escapan a la destrucción mediada por complemento, al producir polisacáridos sulfatados que activan y consumen complemento (Hammerberg y Williams, 1978), taeniaestatina que inhibe las vías clásica y alterna del complemento (Suquet, et al. 1984) y paramiosina que inhibe C1q (Laclette, et al. 1992). En otras investigaciones, se ha

observado que la proliferación de linfocitos estimulada por mitógeno y la producción de interleucina 2 (IL-2), son marcadamente disminuidas en presencia de taeniaestatina y en infecciones con *T. taeniaeformis* o *T. crassiceps* (Leid, et al. 1984; Leid, et al. 1986; Burger, et al. 1986; Sciutto, et al. 1995).

Los resultados descritos aquí sobre los efectos producidos en dos células diferentes (linfocitos y macrófagos) por parte del FM, en cuanto a la determinación de un parámetro. la liberación de diferentes citocinas, que en particular unas (IL-2 e INF- γ) son producidas por una subpoblación de células T denominadas Th1 y otras (IL-4 e IL-10) son producidas por una subpoblación denominada Th2, y por otro lado, el TNF- α producido por macrófagos, sugiere un mecanismo novedoso, aún no descrito, por el cual, el FM inhiba la síntesis de proteínas de las células probadas. Un mecanismo inespecífico que afecte esta función en cualquier célula, no que solo afecte una subpoblación de células T y que este efecto a su vez conduzca a una inmunosupresión por inmunomodulación, como ocurre durante la schistosomiasis donde los eosinófilos del granuloma producen el péptido intestinal vasoactivo (VIP), que inhibe la proliferación y la producción de IL-2 de linfocitos *in vitro* (Metwali, et al. 1993) o bien, como se ha reportado para *Echinococcus multilocularis* que en presencia de protoescolices los linfocitos disminuyen su proliferación, su producción de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 cuando son estimulados con Con A (Kizaki, et al. 1993). En otras parasitosis también se ha observado que los macrófagos o los productos de éstas ocasionan una disminución en la proliferación o producción de IL-2 posterior a la infección con *Leishmania tropica* (Scott y Farrell, 1981) *Trypanosoma cruzi* (Kierszenbaum, 1982) o *Brugia pahangi* (Lammie y Katz, 1983).

El hallazgo de que IL-4 e INF- γ están también disminuidas en linfocitos provenientes de ratones tratados con FM, refuerza la idea de que el FM está inhibiendo de manera inespecífica a células T, tanto a las de tipo Th1 como a las de Th2, en particular su síntesis de proteínas. Los resultados reportados en el presente trabajo nos permite formular

la hipótesis de que el FM podría estar inhibiendo la síntesis de proteínas, por lo que tendríamos que diseñar un camino metodológico que nos permitiera dilucidar en primer término, si el FM inhibe la síntesis de proteínas y en segundo, si es a nivel de transcripción o de traducción.

Los experimentos de reconstitución con rIL-2 y rIL-4, son consistentes de que linfocitos en presencia del FM disminuyen la liberación de citocinas, principalmente las involucradas como factores de crecimiento. La reconstitución no alcanzó el 100 %, con rIL-2 se alcanzó un 85 %, lo que sugiere que otras proteínas pudieran estar también inhibidas en su síntesis y pudieran ser necesarias para alcanzar el nivel de proliferación como el de los linfocitos testigos.

La disminución en la liberación de TNF- α a partir de una línea de macrófagos, al ser estimulada con LPS e IFN- γ en presencia del FM, sugiere que la ausencia de ésta y otras citocinas proinflamatorias, sean las responsables de la inhibición de la inflamación observada alrededor de metacístodos de *Taenia solium* (Tato, et al. en 1996).

La posibilidad de que el FM pudiera estar induciendo la síntesis de IL-10 producida por células Th2 y que esta citocina regulara la síntesis de citocinas de células Th1, como sucede en la infección por *Leishmania sp.*, *Nippostrongylus brasiliensis* o *Schistosoma mansoni* (Mosmann y Moore, 1991; Moore, et al. 1993), resulta improbable ya que el experimento de neutralización indicó la ausencia esta citocina. Además, la disminución en la respuesta humoral murina hacia antígenos del mismo metacístodo (Tato, et al. 1996) correlaciona claramente con la ausencia de IL-10 (Liles y Van Voorhis, 1995).

La mayor parte del conocimiento sobre la relación huésped-parásito en la cisticercosis de *T. solium* aún está por dilucidarse, sin embargo uno de los problemas que deberá abordarse es el conocimiento sobre la estructura del FM y otro será el conocer que mecanismos opera el FM para inhibir procesos fisiológicos.

CONCLUSIONES

1. El factor de metacéstodo de *Taenia solium* disminuye la proliferación tanto de linfocitos esplénicos obtenidos de ratones normales como de linfocitos de ratones previamente inoculados con él y estimulados *in vitro* con concanavalina A.
2. La inhibición de la proliferación observada en los linfocitos esplénicos de ratones normales tratados con el FM, se debe en parte a la disminución de IL-2 e IL-4, en los cultivos estimulados con Con A.
3. El efecto del FM en linfocitos de ratones normales así como de ratones tratados previamente con él, es una disminución en la liberación de citocinas (IL-2, IFN- γ e IL-4) en los cultivos estimulados con Con A.
4. El efecto del FM sobre los macrófagos en cultivo, es una disminución en la producción de TNF- α al ser estimulados con LPS e IFN- γ

BIBLIOGRAFIA

- Aluja, A. and Vargas, G. (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. *Veterinary parasitology* 28:65-77.
- Ashwell, G. (1957) Colorimetric analysis of sugars. En: Colowich, S., Kaplan, N. (Eds.) *Methods in enzymology*, vol. 3. Academic Press, New York, pp. 87-90.
- Burger, C.J., Rikihisa, Y., and Lin, Y.C. (1986) *Leishmania tenebriformis*: Inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin-2 production in rat splenocytes by larval in vitro product. *Experimental Parasitology* 62:216-222.
- Capron, A. and Dessaint, J. P. (1985) Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Annual Review in Immunology* 3:455-476.
- Capron, A. R. (1992) Immunity to schistosomes. *Current Opinion in Immunology* 4:419-424.
- Cox, F.E.G., and Liew, F.Y. (1992) T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. *Immunology Today* 13:445-448.
- Del Brutto, O. and Sotelo, J. (1988) Neurocysticercosis: An update. *Reviews of infectious diseases* 10(6):1075-1087.
- Dessaint, J.P., Camus, E., Fischer, E., and Capron, A. (1977) Inhibition of lymphocyte proliferation by factor (s) produced by *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Immunology* 7:624-629.
- Dixon, H. B. F. and Lipsecomb, F. M. (1961) Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases. Medical Research Council special report series, no. 299. London: Her Majesty's Stationary Service, pp. 1-58.
- Escobar, A. (1983) The pathology of neurocysticercosis. En: Palacios, E., Rodríguez, J. y Taveras, J. M (eds.) *Cysticercosis of the central nervous system*, Charles C. Thomas, Springfield, pp. 27-54.
- Finkelman, F.D., Pearce, E.J., Urban, J.F., and Sher, A. (1991) Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunoparasitology Today*. 12:A62-A66.

- Gillis, S., Ferm, M. M., Ou, W. and Smith, K. A. (1978) T cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. *Journal of Immunology* 120:2027-2032.
- Hammerberg, B. and Williams, J. F. (1978) Interaction between *Taenia taeniiformis* and the complement system. *Journal of Immunology* 120:1033-1038.
- Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, U. S. A. pp. 578-583.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.R., Holaday, B.J., Coffman, R.L., and Locksley, R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma, of IL-4 during the response or progression of murine leishmaniasis. Evidence of expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* 169:59-72.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.R., Mutha, S.S., and Locksley, R.M. (1991) Production of IFN γ , IL-2, IL-4 and IL-10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 88:7011-7015.
- Hernández-Jauregui, P. A., Márquez-Monter, H. and Sastre-Ortiz, S. (1973) Cysticercosis of the central nervous system in hogs. *American Journal of Veterinary Research* 34:451-453.
- Kierszenbaum, F. (1982) Immunologic deficiency during experimental Chaga's disease (*Trypanosoma cruzi* infection): role of adherent, nonspecific esterase positive splenic cells. *Journal of Immunology* 129:2202-2205.
- Kizaki, T., Ishige, M., Kobayashi, S., Bingyan, W., Kumagai, M., Day, N., Good, R. and Onoé, K. (1993) Suppression of T-cell proliferation by CD8+ T cells induced in the presence of protozoal antigens of *Echinococcus multilocularis* in vitro. *Infection and Immunity* 61(2):525-533.
- Kwiatkowski, D. (1992) Malaria: becoming more specific about non-specific immunity. *Current Opinion in Immunology* 4:425-431.
- Laclette, J.P., Sshoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D. and Nicholson-Weller, A. (1992) Paramyosin inhibits complement C1. *Journal of Immunology* 148:124-128.

- Lammie, P. J. and Katz, S. P. (1983) Immunoregulation in experimental filariasis. I. *In vitro* suppression of mitogen-induced blastogenesis by adherent cells from jirds chronically infected with *Brugia pahangi*. *Journal of Immunology* 130:1381-1385.
- Leid, R. W., Suquet, C. M. and Perryman, L. E. (1984) Inhibition of antigen and lectin-induced proliferation of rat spleen cells by a *Faenia taeniaeformis* proteinase inhibitor. *Clinical and Experimental Immunology* 57:187-194.
- Leid, R. W., Suquet, C. M., Bouwer, H. G. A. and Hinrichs, D. J. (1986) Interleukine inhibition by a parasite proteinase inhibitor, taeniaestatine. *Journal of Immunology* 137:2700-2702.
- Leid, R. W., Suquet, C. M. and Tanigoshi, I. (1987) Parasite defense mechanisms for evasion of host attack: a review. *Veterinary Parasitology* 25:147-162.
- Letonja, T., Hammerberg, C. and Schuring G. (1987) Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Laemia taeniaeformis*. *Parasitology Research* 73:265-270.
- Lightowers, M.W., and Rickard, M.D. (1988) Excretory-secretory products of helmenth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* 96:S123-S166.
- Liles, W. C. and Van Voorhis, W. C. (1995) Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *Journal of Infectious Diseases* 172:1573-1580.
- Long, C. A. (1993) Immunity to blood stages of malaria. *Current Opinion in Immunology* 5:548-556.
- Márquez, H. (1971) Cysticercosis. En: *Pathology of protozoal and helminthic diseases*, Ed. Marcial, R., pp. 592-617, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Massart, L. and Hoste, J. (1947) Le dosage photométrique des nucleotides puriques et pyrimidique au moyen de la reaction a l'orcine. *Biochemical et Biophysical Acta* 1:83-86.
- Metwali, A., Blum, A., Mathew, R., Sandor, M., Lynch, R. G. and Weinstock, J. V. (1993) Modulation of T lymphocyte proliferation in mice infected with *Schistosoma mansoni*: VIP suppresses mitogen- and antigen-induced T cell proliferation possibly by inhibiting IL-2 production. *Cellular Immunology* 149:11-23.

- Molinari, J. L., Meza, R., Suarez, B., Palacios, S., Tato, P. and Retana, A. (1983a) *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. *Experimental Parasitology* 55:340-357.
- Molinari, J. L., Meza, R. and Tato, P. (1983b) *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Experimental Parasitology* 56:327-338.
- Molinari, J. L., Tato, P. and Valles, Y. (1987) Immunodpression of T-lymphocytes in hogs modulated by *Cysticercus cellulosae*. *Revista latinoamericana de Microbiologia* 29:293-300.
- Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., and León-Cázares, J.M. (1989) Modulation effects on mice response to a *Salmonella typhimurium* infection by a *Taenia solium* cysticerci product of low molecular weight. *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 31:327-333.
- Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., and León-Cázares, J.M. (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 84:205-208.
- Molinari, J.L., Soto, R., Tato, P., Rodríguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J. and Palet, A. (1993) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: A field and laboratory study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49:502-512.
- Mosmann, T., Chervinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136:2348-2357.
- Mosmann, T. and Moore, K. (1991) The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. *Immunoparasitology today* 12:A49-A53.
- Moore, K., O'Garra, A., Waal Malefyt, R., Vieira, P. and Mosmann, T. (1993) Interleukin-10. *Annual Review of Immunology* 11:165-190.
- Musoke, A. J. and Williams, J. F. (1976) Immunological responses of the rat to infection with *Taenia taeniiformis*: protective antibody response to implanted parasites. *International Journal of Parasitology* 6:265-269.

- Noben-Trauth, N., Kropf, P. and Müller, Y. (1996) Susceptibility to *Leishmania major* infection in interleukin-4-deficient mice. *Science* 271:987-990.
- Rabiela, M. T., Rivas, A., Rodríguez, J., Castillo, S. and Cansino F. (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: Flisser, A., Willms, K., Lachette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltran, F. (eds.) *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York pp. 179-199.
- Ralph, P., Nakoinz, Y., Sampson-Johannes, A., Fong, S., Lowe, D., Min, H. and Lin, L. (1992) IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and Tumor Necrosis Factor. *Journal of Immunology* 148:808-814.
- Reed, S. G. and Scott, P. (1993) T-cell and cytokine response in leishmaniasis. *Current Opinion in Immunology* 5:524-531.
- Ridaura Sanz, C. (1987) Host response in childhood neurocysticercosis. Same pathological aspects. *Child's Nervous System* 3:206-207.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., Cruz, V., Lemus, L. and Lamoyi, E. (1995) Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infection and Immunity* 63(6):2277-2281.
- Scott, P. A. and Farrell, J. P. (1981) Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Nonspecific immunodepression in BALB/c mice infected with *Leishmania tropica*. *Journal of Immunology* 127:2395-2400.
- Scott, P. A. and Sler, A. (1993) Immunoparasitology. In: Paul, W. (ed.) *Fundamental Immunology*, third edition, Raven Press, New York, pp. 1179-1210.
- Sher, A., and Coffman, R.L. (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Review of Immunology* 10:385-409.
- Smyth, J. D. and McManus, D. P. (1989) *The physiology and biochemistry of cestodes*. New York, New York: Cambridge University Press, pp. 283-304.
- Stadecker, M. J. and Flores-Villanueva, P. O. (1994) Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. *Immunology today* 15:571-574.
- Subauste, C. S. and Remington, J. S. (1993) Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current Opinion in Immunology* 5:532-537.

- Suquet, C., Green-Edwards, C. and Leid, R. W. (1984) Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor. *International Journal of Parasitology* 14:165-172.
- Tato, P., Valles, Y., Rolón, R. y Molinari, J. L. (1987) Effect of the immunization on immunodepressed hogs, infected naturally by *Cysticercus cellulosae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 29:67-71.
- 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. *Parasitology Research* 81:181-187.
- Tato, P., White, A. C., Willms, K., Rodríguez, D., Solano, S., Sepúlveda, J. and Molinari, J. L. (1996) Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T. solium* metacestodes. *Parasitology Research* (en prensa).
- Wehr, T. (1980) Nucleic acid constituents HPLC. Variant ASC, Inc. Palo Alto, California, pp. 59-84.
- Willms, K., Merchant, M. T., Arcos, L., Sealey, M., Diaz, S. and Diaz de Leon, L. (1980) Immunopathology of cysticercosis. En: Larralde, C., Willms, K., Ortiz, L. and Sela, M. (eds.) *Molecules, cells and parasites in immunology*. Academic Press, New York, pp 145-162.
- Willms, K., Merchant, M. T., Diaz, S. y Arcos, L. (1982) Host-parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser, A., Willms, K., Lacleite, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltran, F. (eds.) *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York, pp. 397-411.
- Yin Foo, D., Nowak, M., Copeman, B., and Mc Cabe, M. (1983) A low molecular weight immunosuppressive factor produced by *Onchocerca gibsoni*. *Veterinary Immunology and Immunoparasitology* 4:445-451.