

Eej.
157



Universidad Nacional Autónoma
de México

FACULTAD DE CIENCIAS

“EFECTO MITOGENICO DE UN OLIGONUCLEOTIDO DE ARN
DE LA LARVA DE Taenia solium SOBRE LINFOCITOS
ESTIMULADOS CON FITOHEMAGLUTININA”

T E S I S

Que para obtener el título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

LEONOR PEREZ MARTINEZ

México, D. F.

1986



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 está 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.

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Add	Agua destilada y desionizada
ADN	Acido desoxirribonucleico
Ag	Antigeno
ARN	Acido ribonucleico
ATC	Acido tricloroacetico
EDTA	Tris (hidroximetil) aminometano tetracetico
FC	Factor de cisticerco
HCl	Acido clorhidrico
LPS	Lipopolisacárido
PHA	Fitoheماغlutinina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Timidina- ³ H	Timidina tritiada
u.v.	Luz ultravioleta

INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	8
1. MATERIAL BIOLÓGICO	8
2. OBTENCION DEL MATERIAL BIOLÓGICO	8
2.1 Análisis Espectrofotométrico	8
3. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL MATERIAL DIALIZABLE	9
3.1 Determinación de Acidos Nucléicos	9
3.1.1 Determinación del ARN	9
3.1.2 Determinación del ADN	9
3.2 Determinación de Proteína	10
4. FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL DIALIZABLE	11
5. DIGESTION DEL FC CON ARNasa "A"	11
5.1 Preparación de la ARNasa "A"	11
5.2 Ensayo de Digestión	11
6. ELECTROFORESIS EN PLACA DE AGAROSA	12
7. ENSAYO DE MITOGENICIDAD	12
7.1 Cultivo de Linfocitos	12
7.2 Cultivo de Linfocitos Aislados por Ficoll-Paque	13
7.3 Incorporación de Timidina- ³ H	14
8. PRUEBAS INMUNOQUIMICAS	15
8.1 Antisuero	15
8.2 Inmunodifusión	16

	Pág.
8.3 Inmunelectroforesis	16
8.4 Prueba de Hemaglutinación	17
9. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESEN CIA DE SDS	18
III. RESULTADOS	20
1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL MATERIAL DIALIZABLE	20
2. ANALISIS BIOQUIMICO Y ELECTROFORETICO DEL FC.	23
3. ACTIVIDAD MITOGENICA DEL FC SOBRE CULTIVOS DE LINFO CITOS DE SANGRE PERIFERICA	26
4. EFECTO DEL FC EN LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI- ANTIGENOS NO RELACIONADOS Y RELACIONADOS CON LA LARVA DE <u>Taenia solium</u>	36
IV. DISCUSION	42
V. CONCLUSIONES	47
VI. BIBLIOGRAFIA	48

A mis padres, de quienes siempre he recibido cariño, apoyo, estímulo, consejos y amistad, que -- fueron las bases principales que ayudaron a alcanzar este objetivo. Con mucho agradecimiento y respeto.

A mis hermanos, Mario y Gerardo, por su cariño y su gran ayuda.

I. INTRODUCCION

Se ha observado que muchos parásitos entre ellos el cisticerco de Taenia solium, pueden inducir una respuesta inmune en sus hospederos, sin embargo, algunos de éstos son capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo. Esta prevalencia puede deberse a diferentes factores tanto del hospedero como del parásito, o bien a su interrelación.

En lo que se refiere a los parásitos, éstos pueden evadir la respuesta inmune al adquirir en su superficie antígenos del hospedero, de tal forma que impidan el reconocimiento del parásito como antígeno (Margni, 1982). Esto se ha visto en Ascaris lumbricoides que fija ciertos grupos de aglutininas del hospedero (Soulsby y Coombs, 1959), en Schistosoma mansoni cuya fase adulta que se encuentra en los vasos mesentéricos del hombre, es capaz de adsorber sobre su superficie antígenos de eritrocitos del hospedero (Clegg y cols., 1971), al igual que Echinococcus granulosus que fija inmunoglobulinas sobre su superficie (Varela-Díaz y Coltorti, 1973). Así también, se ha reportado que sobre la superficie del cisticerco de Taenia solium pueden quedar adsorbidos antígenos de histocompatibilidad ó inmunoglobulinas del tipo IgG de cerdo (Willms y Arcos, 1977). Otros mecanismos por los cuales los parásitos pueden evadir la respuesta inmune son: la inducción de síntesis de anticuerpos bloqueadores ó facilitadores, que interfieren con la combinación de anticuerpos específicos a los determinantes antigénicos del parásito (Margni, 1982), lo cual se ha observado en Taenia saginata, Taenia solium (Varela-Díaz y Coltorti, 1973) y en esquistosomas en los que se han encontrado IgG1, IgG2a,

IgGb, IgG3, IgA e IgM sobre la superficie de la forma adulta del parásito (Kemp y cols., 1977). O bien, la secreción de sustancias anticplementarias como la producida por el cisticerco de Taenia taeniaeformis -- que inhibe la acción del complemento y evita el daño al tegumento del -- céstodo (Musoke y Williams, 1975; Williams, 1979).

También, algunos parásitos son capaces de inducir estados de inmunosupresión hacia antígenos relacionados y no relacionados en el hospedero, lo cual puede contribuir para que el parásito sobreviva por largos períodos en el hospedero (Ogilvie y Wilson, 1976 y Bloom, 1979). Experimentalmente, la inmunosupresión ha sido estudiada en infecciones causadas por protozoarios del género Plasmodium, Trypanosoma y Leishmania; y en helmintiasis causadas por Schistosoma mansoni, Trichinella spiralis, Taenia crassiceps y Taenia solium.

En parasitosis causadas por Plasmodium berghei yoelli las -- reacciones de inmunidad celular parecen normales, sin embargo, las respuestas que requieren una función de células T cooperadoras tales como -- respuestas a eritrocitos de carnero, gamaglobulina agregada a toxoide -- tetánico están marcadamente desacopladas (Weinbaum y cols., 1978). En -- el caso de ratones infectados con Plasmodium berghei, éstos presentan una respuesta inmune deprimida hacia una variedad de antígenos y en especial hacia aquellos que son Timo-dependientes como hemocianina dinitrofenilada y eritrocitos de carnero (Khansari y cols., 1981). Así también, Cox y -- Hayes (1985) confirmaron que el suero de ratones infectados con Plasmodium chabaudi suprime la producción de anticuerpos y la respuesta de linfocitos

tos a mitógenos ó antígenos; la actividad supresora no fué influenciada -- por la inactivación del complemento, por lo que se sugiere que esta supre-- sión es en parte inducida por complejos inmunes presentes en la sangre de los animales con malaria.

Del mismo modo, se han demostrado alteraciones en la produc-- ción de células T supresoras en hamsters y ratones infectados con -- Leishmania (Liew y cols., 1982; Blackwell y Ulczak, 1984), que da como -- resultado una producción elevada de inmunoglobulinas, ya que, se encuen-- tran concentraciones muy altas de IgG e IgM en el suero (Stauber y -- cols., 1954; Stauber, 1955 y Stauber, 1958). Además los animales infec-- tados padecen de anemia (Agu y cols., 1982); y abatimiento de la respues-- ta cutánea del tipo de hipersensibilidad retardada hacia antígenos no -- relacionados (Levy y Mendes, 1981; Liew y cols., 1982 y Ho y cols., 1983), lo cual es provocado por la aparición de células T supresoras específicas caracterizadas en ratones infectados con Leishmania tropica. En ratones con infecciones diseminadas debidas a Leishmania donovani y Leishmania -- tropica se ha observado una supresión de las respuestas hacia mitógenos -- de células T (Murray y cols., 1982; Scott y Farrel, 1981; Reiner y Finke, 1983 y Nickol y Bonventre, 1985) y hacia mitógenos de células B (Scott y Farrel, 1981). Por otro lado, los ratones infectados crónicamente con -- Leishmania tropica manifestaron una supresión de la respuesta humoral y -- celular contra antígenos del parásito (Arredondo y Pérez, 1979), así como una inhibición específica de la respuesta linfoproliferativa hacia éstos mismos antígenos, la supresión de la respuesta proliferativa de linfocitos es más pronunciada conforme aumenta el grado de infección (Nicko'y --

Bonventre, 1985).

Así también, las infecciones debidas a tripanosoma producen un estado de inmunosupresión en el hospedero. Con respecto a esto, Clinton y cols. (1975) observaron una supresión de la respuesta humoral a eritrocitos de carnero en ratones infectados con Trypanosoma cruzi, la cual fué más pronunciada cuando el grado de parasitosis era mayor. Cunningham y cols. (1978) también reportaron una inmunosupresión de la respuesta humoral durante la infección de ratones con T. cruzi y además, una sustancia supresora presente en el suero de éstos mismos animales. Rowland y Kuhn (1978) encontraron supresión de las respuestas hacia fitohemaglutinina y hacia antígenos relacionados en ratones infectados con T. cruzi. Posteriormente Ramos y cols. (1979) encontraron una población de células T supresoras en ratones infectados con T. cruzi que inhibía las respuestas de células de bazo a mitógenos de células T (Con A) y B (LPS).

Por otro lado, se ha establecido que algunos parásitos pueden producir diversas sustancias que suprimen la respuesta inmune del hospedero o de manera alterna los mecanismos normales de resistencia (Fudenberg, 1983). En cuanto a esto, la infección por Schistosoma mansoni induce la supresión de varios parámetros inmunológicos en el ratón, como disminución en la función de células T cooperadoras (Ramalho-Pinto y cols., 1976) y una reducción en la respuesta in vitro de linfocitos hacia mitógenos -- (Pelley-Ruffier y cols., 1976). Esto se puede explicar porque el parásito produce factores de bajo peso molecular que inhiben la proliferación de los linfocitos murinos (Dessaint y cols., 1977) ó por la generación de células T supresoras (Coulis y cols., 1978). Más adelante, Attallah y --

cols. (1979) encontraron que en esquistosomiasis murina aguda, la capacidad funcional de los linfocitos B y T para responder a estímulos mitogénicos y la respuesta humoral a antígenos dependientes e independientes de timo estaban severamente deprimidas y sugirieron que tanto las células supresoras como los complejos inmunes contribuyen a esta inmunosupresión. Cottrell y cols. (1980) trabajaron con monos infectados con Schistosoma manfoni y observaron que el suero de estos animales suprimía la respuesta in vitro de los linfocitos de monos normales hacia Concanavalina A, además, observaron que los factores inmunosupresores son complejos inmunes estables al calor, no dializables y de alto peso molecular que aparecen en el suero de monos infectados. Posteriormente, Aune y cols. (1985) demostraron la presencia de una linfocina soluble, supresora de la respuesta inmune en el suero de ratones con esquistosomiasis crónica, que es producida por los linfocitos T supresores activados y que aparece después de veinte semanas de iniciada la infección.

En ratones infectados con Trichinella spiralis se ha reportado una respuesta humoral deprimida hacia eritrocitos de carnero (Lubinieccki, y Cypess, 1975; Faubert y Tanner, 1971 y Barriga, 1975), hacia el rechazo de injertos (Svet-Moldavsky y cols., 1970) hacia antígenos no relacionados (Strickland y cols., 1973). Faubert y Tanner (1975) reportaron factores leucoaglutinantes y leucotóxicos presentes en el suero de ratones infectados con T. spiralis, que probablemente eran derivados del helminto. Y además, inhibición de la respuesta de anticuerpos hacia eritrocitos de carnero por inyección de este mismo suero. Posteriormente Faubert (1976) reportó que los productos liberados por la larva de T. spiralis son supresores de la respuesta primaria de anticuer

pos hacia eritrocitos de carnero in vitro. Los experimentos en los que se utilizaron esplenocitos de ratón infectado con T. spiralis demostraron una respuesta deprimida hacia fitohemaglutinina y Concanavalina A (Kirchner y cols., 1974 y Kasahara y Shioiri, 1976).

En parasitosis con céstodos, Good y Miller (1976) observaron en ratones infectados intraperitonealmente con larvas de Taenia crassiceps una disminución en la respuesta primaria y secundaria de anticuerpos hacia eritrocitos de carnero in vivo. Por otro lado, Willms y Merchant (1980) reportaron que cisticercos de Taenia solium implantados en la cavidad peritoneal de ratones, indujeron en las células de bazo una supresión de la respuesta hacia Concanavalina A. Molinari y cols. (1983) encontraron que cerdos masivamente parasitados con la larva de Taenia solium, presentaron una importante disminución en el número de células T, y que a mayor número de larvas implantadas menor número de linfocitos T.

Con base en lo anterior, se podría pensar que la interacción entre el parásito y los anticuerpos ó las células del hospedero puede ser un factor importante para estimular la liberación de antígenos por parte del parásito, los cuales a su vez son responsables de la inmunosupresión y de otros efectos sobre el sistema inmune del hospedero que permiten la sobrevivencia del parásito.

Otro mecanismo por medio del cual un parásito puede evadir la respuesta inmune es la capacidad que tienen algunos de éstos para inducir una proliferación no específica de linfocitos B. Abele y cols. (1965) observaron que las infecciones malarias en el hombre y en animales experimentales se acompañan por un marcado incremento en el nivel de

inmunoglobulinas séricas. Del mismo modo, Greenwood (1979) obtuvo evidencias en niños enfermos de paludismo de que Plasmodium falciparum produce un mitógeno. Por otro lado, Esuruoso (1976) mostró in vitro, los efectos mitogénicos de antígenos obtenidos de Trypanosoma brucei sobre células de bazo de ratón normal ó atímico; y Assoku y Tizard (1976) obtuvieron un -- mitógeno de células B producido por la lisis de Trypanosoma congolense. -- Posteriormente, Kobakayawa y cols. (1979) demostraron una activación no específica de linfocitos B en ratones inoculados con Trypanosoma brucei. Hallazgos semejantes obtuvieron Weintraub, Gottlieb y Weinbaum (1982), -- quienes reportaron experimentos que apoyan la asociación de un mitógeno -- de células B derivado de Leishmania con una activación policlonal de célu las B en ratones con leishmaniasis cutánea experimental. Finalmente, -- Sealey y cols. (1982) han presentado evidencia de que un extracto obteni do de la larva de Taenia solium induce una proliferación de linfocitos -- B en cultivo.

La finalidad del presente trabajo, basada en los antecedentes mencionados fue separar e identificar un producto de secreción (FC) obte nido a partir de larvas de Taenia solium; describir su capacidad mitogéni ca sobre linfocitos humanos de sangre periférica estimulados con PHA me-- dida por la incorporación de Timidina-³H, así como estudiar la respuesta humoral de ratones inmunizados con FC y con base en esto tratar de expli car su participación en la inmunidad del hospedero.

II. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

Los cisticercos de Taenia solium fueron disecados de los músculos esqueléticos de carne de cerdos parasitados, confiscados en el rastro de Texcoco, Méx.

2. OBTENCION DEL MATERIAL DIALIZABLE

Los cisticercos se lavaron durante 2 hr con solución salina -- 0.15 M que contenía: 0.05 gr de sulfato de estreptomycin (Lakeside) y - 400 000 UI de penicilina G (Lakeside) por cada 100 ml, se decantó el sobrenadante y se repitió el proceso. Después se incubaron en solución salina estéril 0.15 M o en agua destilada y desionizada (add) estéril durante 12 hr a 4°C, finalmente el material se concentró por liofilización.

El material se resuspendió en 10 ml de solución salina isotónica estéril o en add estéril y se dializó durante 12 hr contra 100 ml de la solución respectiva a través de una membrana Spectrapor 3 (Spectrum -- Medical Industries Inc. Los Angeles). El material interno (material no dializable) y externo (material dializable) de la membrana de diálisis se liofilizó y se guardó a 4°C hasta su uso.

2.1 Análisis Espectrofotométrico

Se resuspendieron 9.0 mg del material dializable en 2.0 ml de solución salina 0.15 M y se le hizo un espectro de absorción de 200 a 300 nm en un espectrofotómetro Zeiss (modelo M4 QIII 29482).

3. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL MATERIAL DIALIZABLE

3.1 Determinación de Acidos Nucléicos

La determinación de ácidos nucleicos se basa en el hecho de que estos, pueden ser separados de otros componentes tisulares por su solubilidad preferencial en ácido tricloroacético (ATC) caliente. La concentración de ácidos nucleicos es entonces cuantificada por reacciones colorimétricas que involucran su componente de pentosa (Schneider, 1945).

3.1.1 Determinación de ARN

La concentración de ARN del material dializable se determinó -- utilizando el método del orcinol (Ashwell, 1957). Se resuspendieron 100 y 200 ug del material dializable en 0.5 ml de add cada uno y se le agregaron 1.5 ml de ATC al 5%, las muestras se incubaron durante 30 minutos en ebullición y se centrifugaron para eliminar la proteína desnaturalizada. A 1.0 ml de los sobrenadantes se les añadieron 2.0 ml de una solución que -- contenía: 40 mg de orcinol por cada 10 ml de cloruro férrico al 0.05% en HCl concentrado, se calentó hasta ebullición durante 15 minutos y después 5 minutos en agua fría. La estimación de ribosa se hizo de acuerdo a la -- intensidad del color leída a 660 nm. Para la curva estándar se utilizaron concentraciones crecientes de ARN (Sigma), se incluyeron blancos.

3.1.2 Determinación de ADN

La concentración de ADN se determinó usando el método de Welbs y Lury (1960). Se resuspendieron 2 y 4 mg del material dializable en add

y se les agregó a cada uno 1.0 ml de ATC al 5% y 0.1 ml de P-nitrofenilhidrazina al 0.5% en alcohol etílico al 95%, se incubó en ebullición durante 20 min, se dejó enfriar, se agregaron 5.0 ml de acetato de butilo a cada muestra agitando vigorosamente durante 15 min; se centrifugó a 1,500 rpm durante 5 min, la capa superior se eliminó, se tomaron 1.5 ml de la inferior y se les agregó 1.0 ml de hidróxido de sodio 2 N, se agitó para mezclar y se dejó reposar 1 min. La estimación de ADN se hizo de acuerdo a la intensidad del color leída a 560 nm. Se utilizaron para la curva estándar concentraciones crecientes de ADN 9Sigma), se incluyeron blancos.

3.2 Determinación de Proteína

La concentración de proteína del material dializable se determinó utilizando el método descrito por Lowry y cols. (1951); se resuspendieron 100 y 200 ug del material dializable en 0.4 ml de solución salina, se añadieron 2.0 ml de una solución que contenía: 49.0 ml de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio al 0.1 N; 0.5 ml de sulfato de cobre al 1% y 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2%. Las muestras se agitaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se les agregó 0.2 ml del reactivo de folin (1:1), nuevamente se agitaron y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La estimación de proteína se hizo de acuerdo a la intensidad del color leída a 500 nm. Se utilizaron para la curva patrón concentraciones de Albúmina Bovina (Sigma), se incluyeron blancos.

4. FRACCIONAMIENTO DEL MATERIAL DIALIZABLE

Con el objeto de eliminar material desnaturalizado, 40 mg del material dializable resuspendidos en 4.0 ml de add, se centrifugaron a -- 15 000 rpm durante 15 minutos, se tom-ron 1.5 ml del sobrenadante y se -- aplicaron a una columna de 0.9 X 27 cm (Pharmacia, Suecia) de Bio0Gel P-6 (Bio-Rad Laboratories) previamente equilibrada con add. La muestra se -- eluyó con add a un flujo de 60 ml/hr, el material se colectó en alícuotas de 3.0 ml y la salida del material se estimó por absorbancia a 260 nm. El material de los tubos correspondientes al pico más alto se mezclaron, lio filizaron y se guardos a 4°C hasta su uso. A este material se le denomi- nó Factor de Cisticerco (FC).

5. DIGESTION DEL FC CON ARNasa "A"

5.1 Preparación de la ARNasa "A"

Para eliminar la ADNasa que generalmente contamina la ARNasa - comercial, se disolvieron 10 mg de ARNasa "A" en 1.0 ml de acetato de so- dio 0.2 M pH 5 y se hirvieron durante 15 minutos, esto se dejó enfriar -- lentamente a tempratura ambiente y se guardó a -20°C hasta su uso.

5.2 Ensayo de Digestión

La digestión del FC con la ARNasa se llevó a cabo de la siguien te forma: 12 mg del FC resuspendidos en 1.0 ml de add se incubaron duran- te 1 hr a 37°C, con 0.25 ml de amortiguador Tris (hidroximetil) aminometano tetracético (EDTA) 0.02 M y 0.1 ml de ARNasa "A", de acuerdo al método de

Tsumeko (1967). Posteriormente se dializó a través de una membrana -- Spectropor 3 contra 100 ml de add durante 12 hr y el material dializable se liofilizó para después hacerle un espectro de absorción (200 a 300 nm) y aplicarlo a una columna de Bio-Gel P-6 en las mismas condiciones señaladas anteriormente.

6. ELECTROFORESIS EN PLACA DE AGAROSA

La presencia de ácido nucléico en el FC digerido y sin digerir se estudió siguiendo el método de Maniatis (1982) por electroforesis en geles de agarosa al 2%, se usó un amortiguador de: Tris-HCl 0.089 M, ácido bórico 0.088 M y EDTA 0.002 M, pH 8. Las muestras se resuspendieron en 2 ul del mismo amortiguador y se les agregaron 10 ul de una solución -- que contenía: ficoll al 35%, SDS al 0.5% xileno y cyanol al 0.1% y azul de bromofenol al 0.1%. Posteriormente las muestras se depositaron en el gel y se aplicó una corriente de 100 Voltios durante minutos a temperatura ambiente. Después el gel se tiñó con una solución que contenía 500 ug de bromuro de etidio por cada mililitro de acetato de amonio 0.5 M a temperatura ambiente. La presencia de ARN se pone de manifiesto al hacer incidir luz UV sobre la preparación, el ácido nucléico aparece como una banda fluorescente

7. ENSAYO DE MITOGENICIDAD

7.1 Cultivo de linfocitos.

Se tomaron muestras de 5.0 ml de sangre periférica de humano, con una jeringa humedecida con solución de heparina de 1.000 UI/ml, los cultivos se llevaron a cabo según modificación a la microtécnica de --

Arakaki y Sparkes (1963). Los linfocitos se cultivaron en medio TC-199 (Difco) adicionado con 20% de suero fetal de ternera (Gibco) previamente inactivado por calor (60°C durante 30 minutos), glutamina (Difco al 0.5% 100 UI de penicilina y 100 ug de estreptomycin (Difco) y 300 unidades - de heparina (Abbot). Se utilizaron frascos ampula de 10 ml que contenían: 1 ml de medio completo y seis gotas de sangre periférica equivalentes a 0.3 ml. A cada frasco se le añadieron 0.4 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Difco). Todo este material se incubó a 37°C junto con dosis variables - de FC, así como FC digerido con ARNas "A", como controles se utilizaron - cultivos con PHA sin FC.

7.2 Cultivo de Linfocitos Aislados por Ficoll-Paque

Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica de humano, con una -- jeringa humedecida con solución de heparina de 1.000 UI/ml, los linfocitos se aislaron siguiendo el método de Boyum (1968). Se colocaron 3 ml - de Ficoll-Paque (Pharmacia) en cada uno de los tubos de centrifuga a los que después, se les añadieron sin mezclar 4 ml de sangre periférica pre- viamente diluída (2 ml de sangre más 2 ml de solución salina isotónica). Se centrifugó durante 40 minutos a 1,500 rpm a una temperatura de 18 a 20°C. Después se tomó la interfase correspondiente a los linfocitos, los cuales se lavaron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min, con 6 ml de solución salina isotónica con el objeto de eliminar el exceso de Ficoll- Paque y proteínas contaminantes del plasma. Este último paso se repitió dos veces más. Finalmente, se evaluó la viabilidad celular por exclusión del colorante azul Trypan y se cultivaron 3×10^6 linfocitos/ml en medio

TC-199 en las mismas condiciones señaladas anteriormente. A cada frasco de cultivo se le añadieron 0,4 mg/ml de PHA. Todo este material se incubó a 37°C junto con dosis variables de FC, así como FC digerido con -- ARNasa "A" y se usaron como controles cultivos con PHA sin FC y con material dializable de músculo esquelético de cerdo normal con PHA.

7.3 Incorporación de Timidina-³H

Existen varios parámetros para determinar el comportamiento de las poblaciones celulares. En este trabajo se utilizó la incorporación de Timidina-³H que es un índice de la actividad de las células que duplican su ADN durante el periodo final de incubación. Se agregó 0.1 ml equivalente a 1 uCi de Timidina-³H (New England Nuclear Net. 027 A, actividad específica de 2.0 Ci/mM) por frasco, 15 hr antes de la cosecha. Al término del periodo de incubación, el contenido de cada frasco se cosechó mediante la técnica de Moorhead (1973), que consiste en agitarlo y centrifugarlo durante 10 minutos a 800 rpm, el sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió en fijador a base de metanol-ácido acético en proporción de 3:1, con un volumen de 5.0 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Posteriormente se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se repitió el paso anterior dos veces más, ahora sin incubar, de tal forma que el botón quedó libre de hemoglobina y -- restos celulares. Después de la segunda fijación el sobrenadante se desechó y se agregó ATC frío al 7%, hasta un volumen de 5.0 ml. se dejó en incubación a 4°C durante 1 hr. Una vez transcurrido este tiempo, se cen-

trifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 5.0 ml de ATC frío, se hizo pasar el contenido del tubo a través de un filtro Millipore de 0.65 μ m de poro, se agregó un volumen igual de ATC y se repitió el filtrado. El filtro se colocó en un vial de contador de centelleo al que se le agregó 0.4 ml de SDS al 2% y se incubó 30 minutos a 60°C. Se le añadieron 10 ml de líquido de centelleo (Bray) para registrar como cuentas por minuto la actividad del elemento radioactivo incorporado al ADN de las células que entraron a la fase S, que es la única etapa del ciclo celular en la que ocurre la síntesis del ADN. Se utilizó un contador de centelleo líquido Packard automático modelo 2425. Los resultados de la incorporación se reportan como porcentaje de incorporación de Timidina-³H. La significancia se estimó cuando la prueba de t de Student.

8. PRUEBAS INMUNOQUÍMICAS

8.1 Antisuero

Se preparó antisuero contra el material no dializable del cisticerco de Taenia solium, mediante la inoculación de seis ratones machos de la cepa CD-1, con 100 μ g del material resuspendidos en 0.1 ml de solución salina isotónica estéril. Los animales se inocularon por vía subcutánea y se les administraron cinco dosis en un intervalo de cuatro días entre cada inmunización y al cuarto día después de la última dosis se sangraron por punción intracardíaca.

Para obtener antisuero contra el material no dializable más FC

de la larva de T. solium, se inocularon seis ratones de la misma cepa con 100 ug de material no dializable junto con 200 ug de FC, se siguió el mis mo esquema de inmunización de los ratones anteriores.

8.2 Inmunodifusión

La reacción antígeno-anticuerpo se estudió por inmunodifusión, siguiendo el método de Ouchterlony (Clausen, 1971) para lo cual, se prepa ró agar purificado al 1% (Merck) en amortiguador de fosfatos de sodio -- 0.05 M pH 8.6 y se colocaron 4 ml del gel sobre cada portaobjetos a utili zar. Los geles se dejaron solidificar en cámara húmeda a 4°C durante 24 hr e inmediatamente después se perforaron con un sacabocado. Se deposita ron 10 ul de los sueros a probar en los pozos centrales y en los pozos -- exteriore se puso el antígeno. Como antígeno se utilizó material no dia lizable a diferentes concentraciones resuspendido en 10 ul del mismo amor tiguador. Las placas se dejaron en cámara húmeda a 4°C durante 48 hr para que se llevara a cabo la reacción. Los geles se lavaron durante cinco -- días con cambios frecuentes de solución salina isotónica y posteriormente se tiñeron con una solución de amido negro (0.1%) en ácido acético al 10% durante 20 minutos, el exceso de colorante se eliminó lavando el gel con ácido acético al 10% y por último se dejaron secar a temperatura ambiente.

8.3 Inmunoelectroforesis

Las pruebas de inmunoelectroforesis se realizaron de acuerdo a la técnica de Clausen (1971). Los geles se prepararon en portaobjetos a los que se les agregó agar purificado al 1.0% (Merck) en amortiguador de fosfatos de sodio 0.05 M pH 8.6. Las placas se dejaron solidificar a 4°C

en cámara húmeda durante 24 hr e inmediatamente después se perforaron, se colocaron 20 ul del antígeno (Material no dializable) a diferentes concentraciones en los pozos respectivos. La electroforesis se realizó en una cámara CAMAG, usando 2.5 mA por laminilla durante 2 hr; después se depositaron 200 ul del suero a probar en los canales correspondientes y se incubaron en cámara húmeda durante 48 hr a temperatura ambiente. El lavado y la tinción se realizaron en las mismas condiciones que se mencionaron para la inmunodifusión.

8.4 Prueba de Hemaglutinación

Esta prueba se efectuó con el objeto de estimar la concentración de anticuerpos inducidos por la inoculación de eritrocitos de carnero en el ratón y para estudiar la influencia del FC sobre la producción de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero.

Se utilizaron seis ratones por grupo, a cada grupo se le inoculó FC a dosis crecientes (100, 200 y 300 ug) a cada dosis se añadió 1.6×10^8 eritrocitos de carnero. Se incluyeron tres grupos controles inoculados con 1.6×10^8 eritrocitos de carnero y otros tres con las dosis de FC señaladas arriba. Todas las inoculaciones se hicieron por vía subcutánea, se administraron tres dosis a cada grupo en un intervalo de cuatro días entre cada inmunización y al cuarto días después de la última dosis se sangraron por punción intracardíaca.

Los eritrocitos de carnero que se utilizaron para la prueba de hemaglutinación se obtuvieron por punción venosa, se mezclaron con solución de Hanks compuesta por; NaCl 8 mg, KCl, 400 mg, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 60 mg,

KH_2PO_4 60 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg, CaCl_2 140 mg, Glucosa 1 mg, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -- 100 mg, NaHCO_3 350 mg y rojo fenol 2.5 mg, todo aforado a un litro con -- add. En el momento de su uso, los eritrocitos de carnero, se lavaron tres veces por centrifugación a 1,500 rpm durante 10 minutos solución salina - isotónica y se diluyeron al 4% en la misma solución.

La prueba de hamaglutinación se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Boyden (1951). Para la determinación del título de anticuerpos se hicieron diluciones seriadas de cada suero, se partió de 1:2 hasta 1:128, en placas para hamaglutinación (Cooke Microtiter) y con volúmenes finales de 25 μl . A cada dilución se le agregó un volumen igual de eritrocitos de carnero al 4%, la placa se agitó suavemente y se incubó a 4°C entre 4 y 24 hr y se procedió a su lectura. El criterio de positividad es - la última dilución en que se observa la malla de aglutinación precipitada y en la siguiente dilución donde se observa la precipitación en botón de - los eritrocitos de carnero.

9. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

El peso molecular de las proteínas del material no dializable del cisticercos de T. solium, así como el de la enzima ARNasa "A", se estimaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio de acuerdo al método de Weber y Osborn (1969). Las muestras por duplicado se depositaron en geles de acrilamida al 10% y se les aplicó una corriente de 8 mA por gel durante 7 hr a temperatura ambiente. Los geles se tiñeron con azul de Comassie y se destiñeron con la solución destenidora estándar (75 ml de ácido acético, 50 ml de metanol y 875 ml -

de agua). Las proteínas de referencia usadas para estimar los pesos moleculares fueron: galactosidasa (116,000 d), albúmina bovina (66,000 d), albúmina de huevo (45,000 d), gliceraldehído 3 fosfato (36,000 d), anhidrasa carbónica (29,000 d), tripsinógeno (24,000 d), inhibidor de la tripsina (200,000 d) y lactoalbúmina (14,200 d) (Sigma).

RESULTADOS

1. CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL MATERIAL DIALIZABLE

Con el objeto de caracterizar que tipo de material era el que había sido obtenido después de incubar a los cisticercos de Taenia solium en solución salina isotónica estéril o en add estéril, se hizo un análisis espectrofotométrico, el cual reveló, en los dos casos, un sólo pico de absorbancia máxima de 255 nm de longitud de onda (Fig. 1).

Con base en el resultado anterior, se procedió a caracterizar bioquímicamente el material dializable obtenido con solución salina isotónica o con add. Dicha caracterización incluyó la estimación de ARN, ADN y proteína cuyos resultados fueron los siguientes: para el material obtenido con solución salina isotónica la concentración de ribosa, ADN y proteína por miligramo de peso seco fue de 115.6 ug, 5 ug y 4.4 ug respectivamente y para el material obtenido con add la concentración de ARN fue de 100 ug/mg de peso seco, la de ADN de 4.06 ug/mg de peso seco y 3.8 ug de proteína/mg de peso seco. Debido a que prácticamente no hubo diferencias entre estos resultados, se decidió utilizar para todas las pruebas únicamente el material dializable obtenido con add, puesto que de esta forma se evitó trabajar con exceso de sales.

Después de haber caracterizado el material dializable de la larva de T. solium, se fraccionó mediante una cromatografía en Bio-Gel P-6. Dicho fraccionamiento mostró que este material debe estar constituido por moléculas de diverso tamaño, como lo ilustra el perfil de elución en la Fig. 2. Aquí se aprecian al menos cuatro subfracciones (II, III, IV y V) -

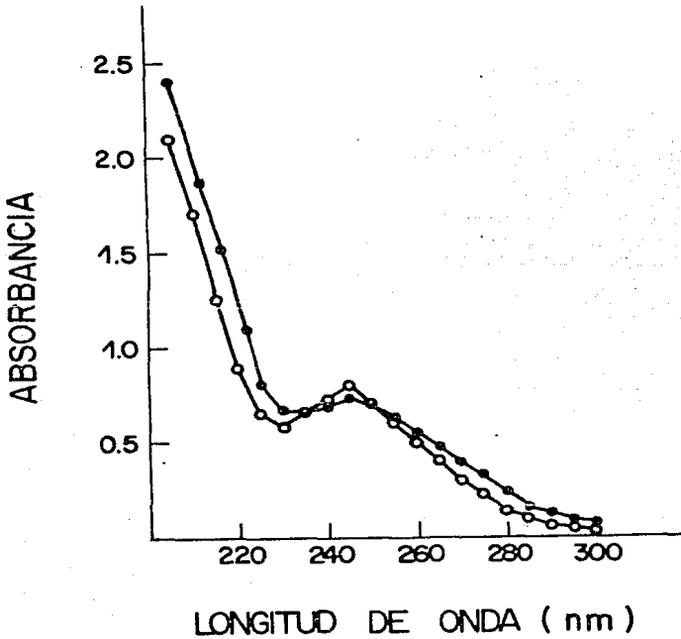


Fig. 1 Análisis espectrofotométrico desde 200 hasta 300 nm, del material excluido de la membrana de diálisis (Spectrapor 3) del producto de secreción obtenido después de incubar al cisticerco de *Taenia solium* durante 12 hr.

Material dializable obtenido con solución -- salina isotónica. ●-●

Material dializable obtenido con agua destilada y desionizada. ○-○

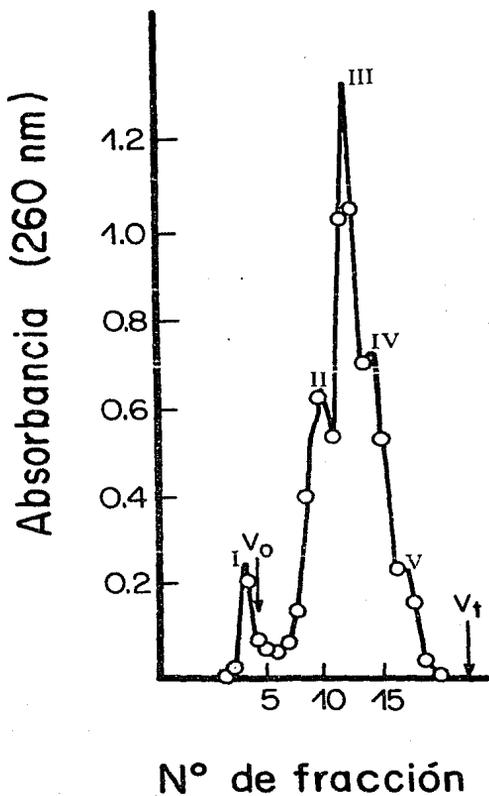


Fig. 2 Perfil de elución de la cromatografía en Bio-Gel P-6 del Material Dializable del cisticerco de Taenia solium. Se aplicaron 40 mg del material a una columna de 0.9 x 27 cm. Se colectaron frac ciones de 3.0 ml.

de las cuales, las subfracciones III, IV t V deben tener pesos moleculares muy próximos entre sí, además se obtuvo una subfracción pequeña que fue -- eluída en el volumen de exclusión (I). El material de las subfracciones III, IV y V se reunió, liofilizó y se denominó "FC". Posteriormente, se -- le determinó la concentración de ribosa (reacción de orcinol, 72 ug/mg de peso seco) y con base en esto se utilizó para las pruebas de: digestión -- con ARNasa "A", incorporación de Timidina-³H por linfocitos humanos esti-- mulados con PHS, así como para experimentos in vivo en los que se inmuniza-- ron ratones con diferentes dosis.

2. ANALISIS BIOQUIMICO Y ELECTROFORETICO DEL FC

Los resultados obtenidos por absorbancia (255 nm) y reacción de orcinol (72-ug/mg de peso seco) sugirieron que la naturaleza del FC po-- dría ser un ácido nucléico de tipo ARN. En virtud de esto, este material se sometió a digestión con ARNasa "A".

Previo a la digestión, la enzima se preparó con el objeto de -- eliminar la ADNasa contaminante y para comprobar su pureza se realizó -- una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sul-- fato de sodio (Fig. 3, B). En la cual se observa una sola banda con un peso molecular aproximado de 17,000 d.

Para determinar sí el FC había sufrido algún cambio al ser -- tratado con la enzima se procedió a realizar una cromatografía en Bio-Gel P-6 cuyo pèrfil de elución se presenta en la Figura 4, la cual muestra la desaparición del pico comprendido entre las fracciones 11 y 14, que apare-- ce en el pèrfil de elución del material sin tratamiento con ARNasa "A" --

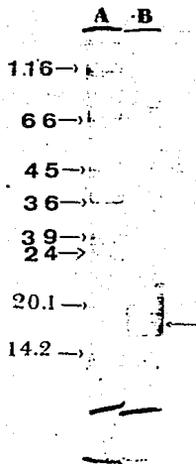


Fig. 3 Comprobación de la pureza de la enzima ARNasa por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. -- A: marcadores de peso molecular (Lactoalbúmina 14,200 d; Inhibidor de tripsina 20,000 d; Tripsinógeno 24,000 d; -- Anhidrasa carbónica 29,000 d; Glicerol dehidro-3-fosfato deshidrogenasa 36,000 d; Albúmina de huevo 45,000 d; Albúmina bovina 66,000 d; Galactosidasa 116,000 d. B: ARNasa "A".

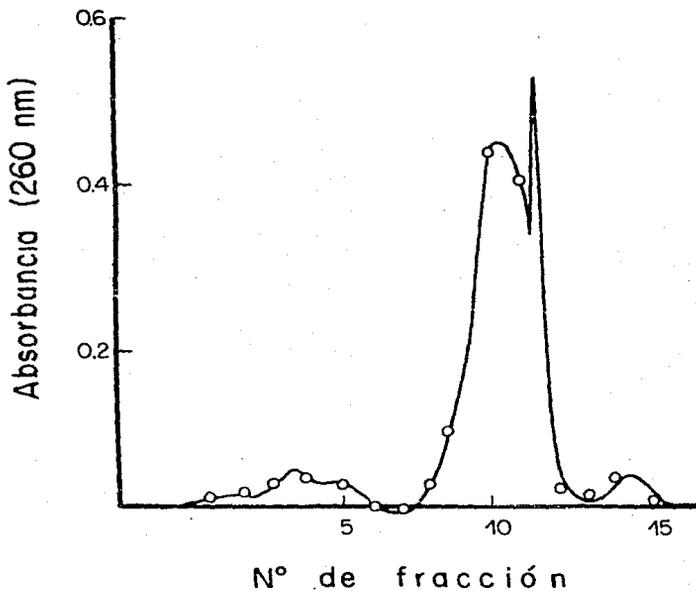


Fig. 4. Perfil de elución de la cromatografía en Bio-Gel P-6 del Factor de Cisticerco -- digerido con ARNasa "A". Se aplicaron 40 μ g del FC digerido a una columna de 0.9 x 27 cm. Se colectaron alícuotas de 3.0 ml.

(Fig. 2), lo cual aporta una fuerte evidencia para pensar que el FC es ARN.

Para observar el comportamiento electroforético del FC, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (Fig. 5).

El patrón electroforético del FC muestra una banda de aproximadamente 27,000 d de peso molecular, esta banda se puede evidenciar a diferentes concentraciones de FC: 200, 100 y 50 ug (Fig. 5 carriles 3, 4 y 5 respectivamente) pero desaparece cuando el FC es tratado previamente con ARNasa "A" (Fig. 5 carril 2).

Por otro lado, el FC también se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, el cual no presentó alguna banda cuando se tiñó con azul brillante de Coomassie -- (Fig. 6, C).

3. ACTIVIDAD MITOGENICA DEL FC SOBRE CULTIVOS DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

Para observar si el FC tenía alguna actividad mitogénica sobre células linfoides, se cultivó sangre completa de humano en presencia de FC más PHA ó LPS.

Los resultados mostraron que el FC indujo una incorporación de Timidina-³H adicional a la inducida por PHA. Esta incorporación fue dosis dependiente y la inducida con la dosis de 20 ug fue significativamente mayor a la inducida por la PHA sola ($P < 0.01$). Por otro lado, ninguna dosis de FC en ausencia de PHA fue capaz de inducir incorporación de Timi-

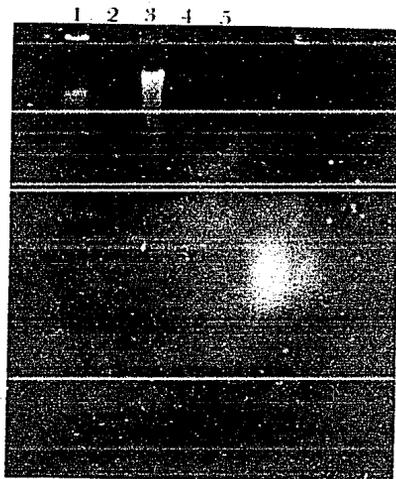


Fig. 5 Patrón electroforético del Factor de *Cisticercos* en gels de agarosa al 2% y teñidos con Bromuro de Etidio. Carril 1: ARN de transferencia - (10 ug); Carril 2: FC digerido con ARNasa "A" - (200 ug); Carril 3: FC (200 ug); Carril 4: FC - (100 ug); Carril 5: FC (50 ug).

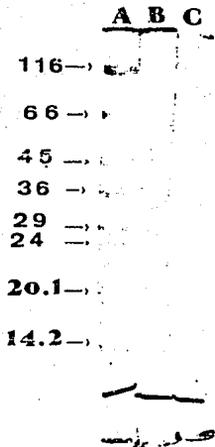


Fig. 6 Patrón electroforético del material no dializable y del FC en geles de poliacrilamida en presencia de - SDS. A) Marcadores de peso molecular (Lacto-albúmina 14,200 d; inhibidor de tripsina 20,100 d; trip sinógeno 24,000 d; anhidrasa carbónica 29,000 d; gli ceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa 36,000 d; albú mina de huevo 45,000 d y albúmina bovina 66,000 d; galactosidada 116,000 d). B) Material no dializa- ble de la larva de Taenia solium (100 ug). C) FC (200 ug).

dinal³H (Fig. 7).

Con el objeto de observar si la actividad mitogénica del FC sufría alguna alteración cuando éste se trata con la enzima ARNasa "A", se cultivó sangre periférica completa en presencia de PHA y el FC digerido obtenido de las fracciones 9 - 12 de la cromatografía en Bio-Gel P-6 que se ilustra en la Figura 4. Los resultados indican una pérdida total de la actividad mitogénica "aditiva" del FC. En cambio, el material no tratado -- mantuvo su actividad ($P < 0.02$) (Fig. 8).

Cuando se cultivó sangre periférica completa en presencia de LPS (50 ug/ml) y FC (20 ug/ml), se observó una gran disminución (80%) en la incorporación de Timidina-³H con respecto al control (células con LPS únicamente). Sin embargo el FC en presencia de PHA mantuvo su efecto activo con un valor altamente significativo ($P < 0.01$). (Fig. 9).

Con el fin de descartar que sustancias provenientes del hospedero con actividad mitogénica estuvieron contaminando el FC, se trató tejido muscular de cerdo normal de manera semejante a los cisticercos de T. solium (ver materiales y métodos) y se estudió su absorbancia (Fig. 10) y reacción de orcinol (174.3 ug ARN/mg de peso seco), tales resultados mostraron similitud con los obtenidos para el FC, pero se encontraron diferencias en cuanto al perfil de elución en Bio-Gel P-6 (Fig. 11). Además, se observó que éste material no indujo significativamente la incorporación "aditiva" de Timidina-³H con respecto al control con PHA (Fig. 12).

Por otro lado, los linfocitos aislados a partir de sangre periférica y cultivados en presencia de PHA y FC a concentraciones de 20 y 200 ug

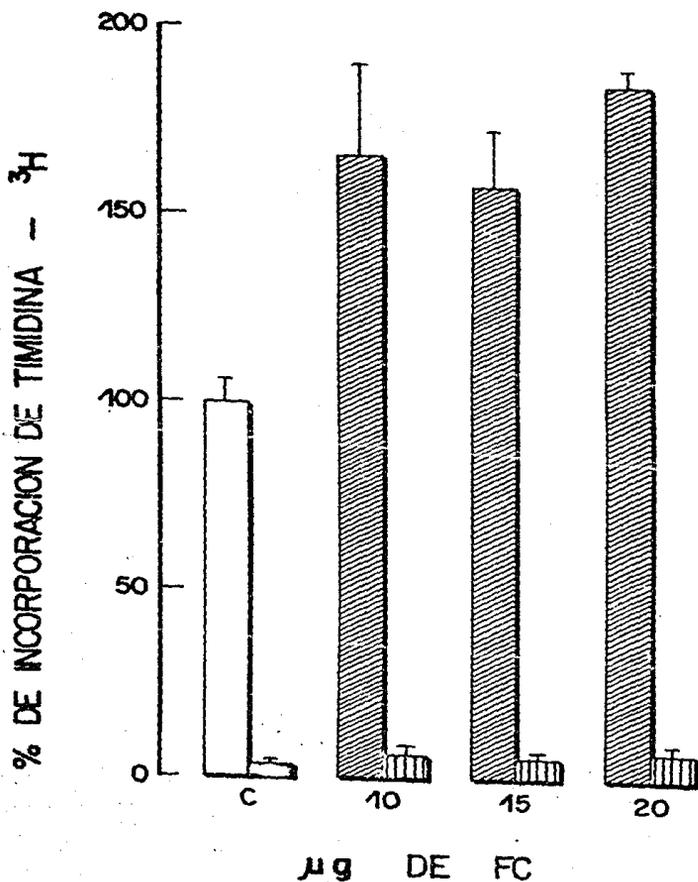


Fig. 7 Porcentaje de incorporación de Timidina-³H por linfocitos humanos estimulados con y sin PHA, utilizando diferentes concentraciones de Factor de Cisticerco.
□ C, células con PHA; [] Células con FC (10, 15 y 20 µg) + PHA; [] Células sin PHA y sin FC; [] Células con FC, a las dosis de: 10, 15 y 20 µg sin PHA.

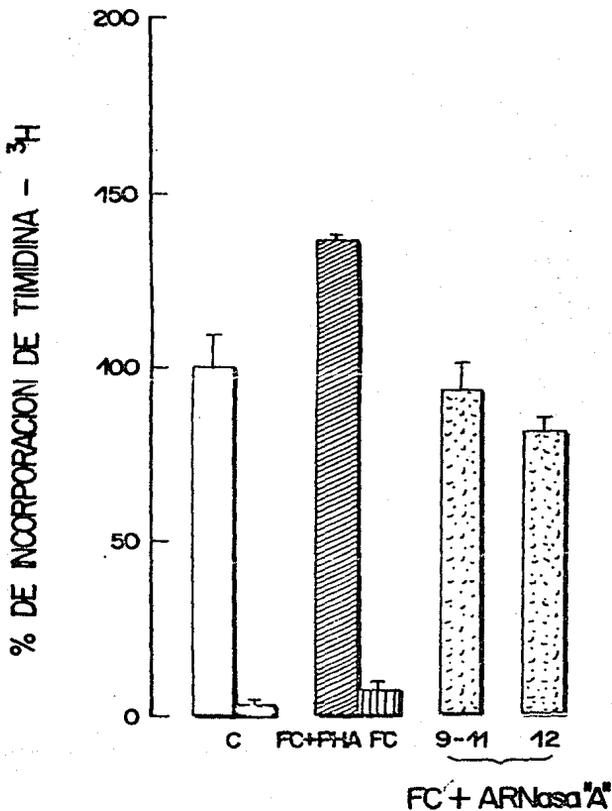


Fig. 8 Efecto del FC digerido con ARNasa "A" sobre la incorporación de Timidina-³H por linfocitos humanos estimulados con PHA. □ C, células con PHA; ▨ C, células sin PHA; ▩ Células con FC + PHA; ▤ Células con FC sin PHA; ▦ Células con PHA + fracciones 9, 11 y 12 obtenidas de la cromatografía en Bio-Gel P-6 del FC digerido con ARNasa "A".

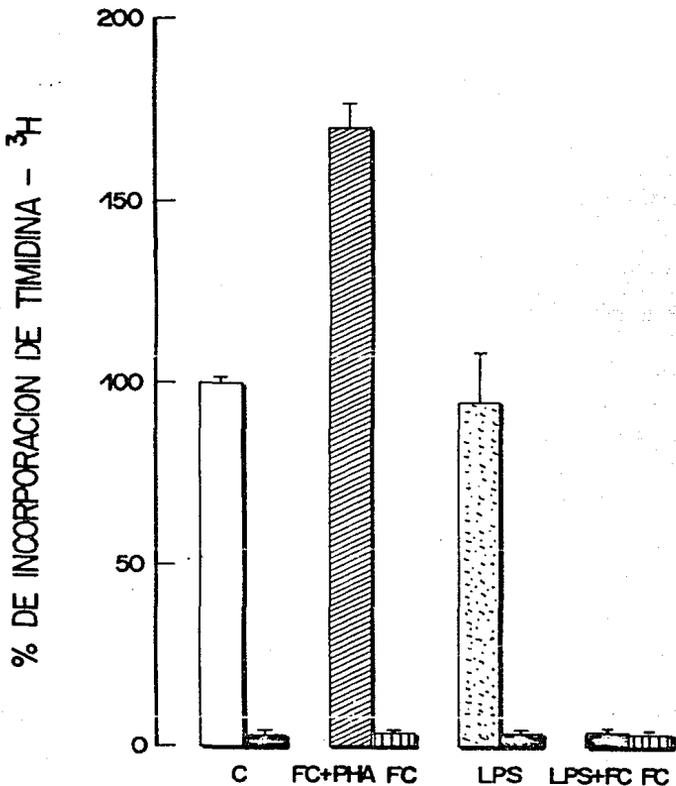


Fig. 9 Influencia del FC sobre la incorporación de Timidina-³H por linfocitos humanos estimulados con LPS de *Salmonella typhimurium*.

□ C, células con PHA; □ C, células sin PHA; ▨ Células con FC + PHA; ▩ Células con FC y sin PHA; □ LPS, células con LPS; ▨ LPS, células sin LPS; ▩ Células con FC + LPS.

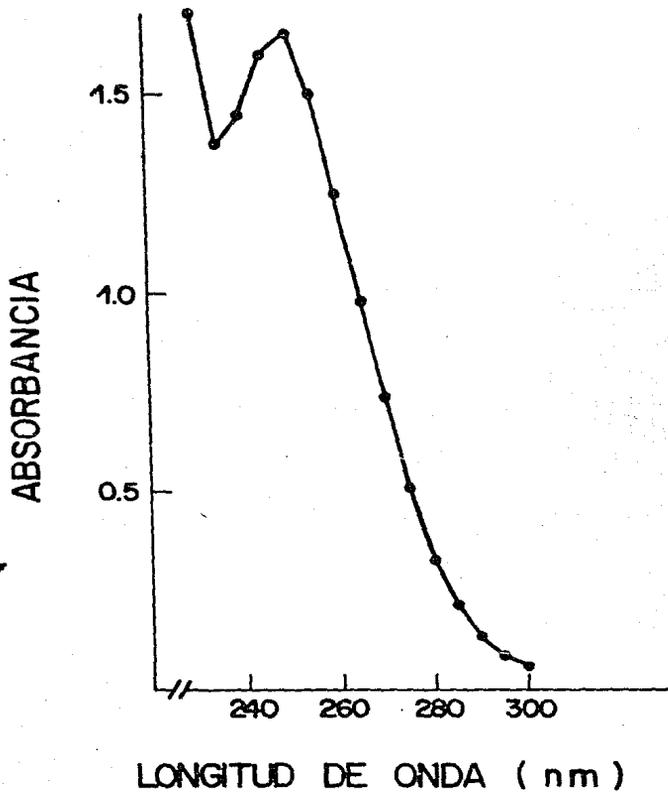


Fig. 10 Análisis espectrofotométrico desde 200 hasta 300 nm, del material dializable obtenido después de incubar tejido muscular de cerdo normal durante 12 hr.

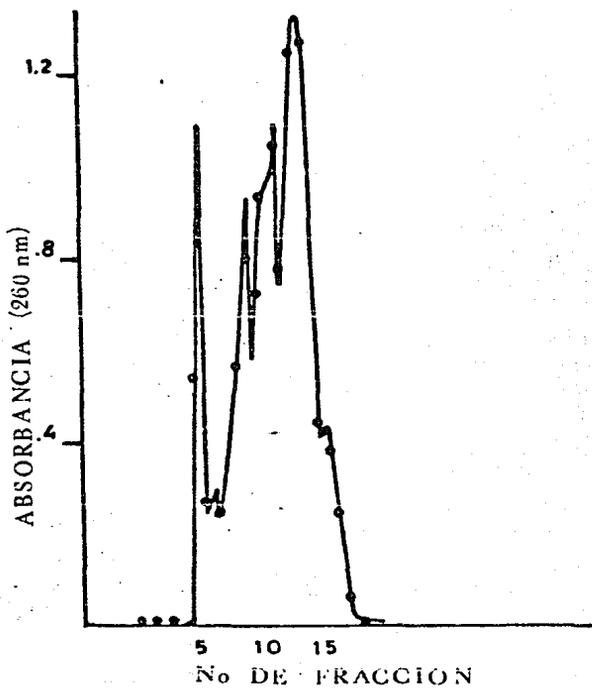


Fig. 11 Perfil de elución de la cromatografía en Bio-Gel P-6 del material dializable obtenido después de incubar tejido muscular de cerdo normal durante 12 hr. Se aplicaron 40 mg del material a la columna -- (0.9 X 27 cm) y se colectaron alícuotas de 3.0 ml.

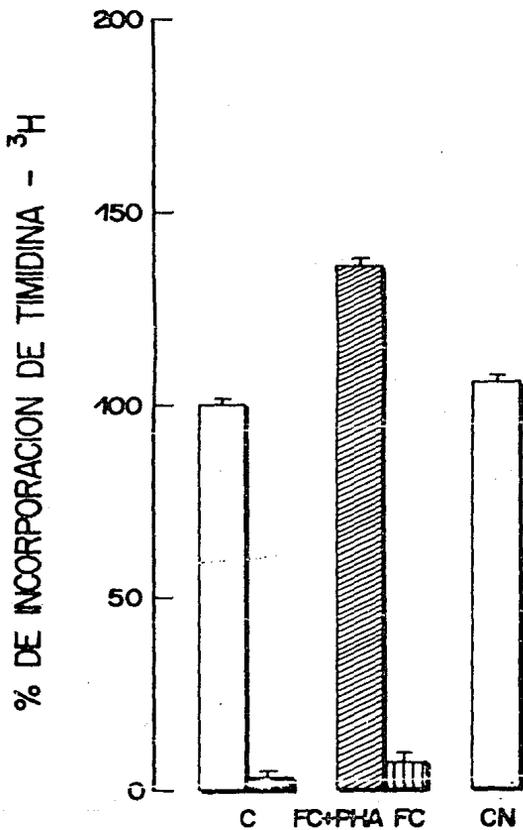


Fig. 12 Efecto del material dializable obtenido de cerdo normal sobre la incorporación de Timidina-³H por linfocitos humanos estimulados con PHA.

□ C, Células con PHA; □ C, células sin PHA; ▨ Células con FC + PHA; ▤ Células con FC pero sin PHA; □ CN, Células con material dializable obtenido de tejido muscular de cerdo normal + PHA.

mostraron una estimulación adicional mucho mayor que la encontrada en sangre total con una significancia estadística muy alta ($P = 0.001$) y dosis de 0.2 y 2 ug no tuvieron el mismo efecto sobre los linfocitos. Paralelamente se probó FC digerido con ARNasa "A", el cual no tuvo en ninguna de las concentraciones utilizadas (0.2, 2, 20 y 200 ug) efecto alguno sobre la incorporación de Timidina-³H por los linfocitos aislados y cultivados con PHA. Los cultivos de linfocitos aislados en presencia de PHA más material dializable de cerdo normal revelaron una incorporación de Timidina-³H no significativa con respecto al control con PHA únicamente (Fig. - 13).

4. EFECTO DEL FC EN LA PRODUCCION DE ANTICUERPOS ANTI-ANTIGENOS NO RELACIONADOS Y RELACIONADOS CON LA LARVA DE Taenia solium

Antígenos relacionados. Con el objeto de observar si el FC podía influir en la producción de anticuerpos hacia antígenos relacionados con la larva de T. solium (material no dializable, ver material y métodos) se realizaron las pruebas de inmunodifusión e inmunoelectroforesis con los antiseros provenientes de: ratones inoculados con antígenos relacionados y ratones inoculados con antígenos relacionados más FC.

Los resultados de la inmunidifusión indicaron que el FC afecta la producción de anticuerpos anti-antígenos relacionados. La Figura 14A muestra las bandas que precipita el suero obtenido de ratones inmunizados con antígenos relacionados. En cambio, el suero obtenido de ratones inoculados con antígenos relacionados más FC no presenta banda alguna Fig. 14B.

Para corroborar lo anterior se realizaron pruebas de inmunoelectroforesis. Los resultados indicaron que de ocho bandas que apare-

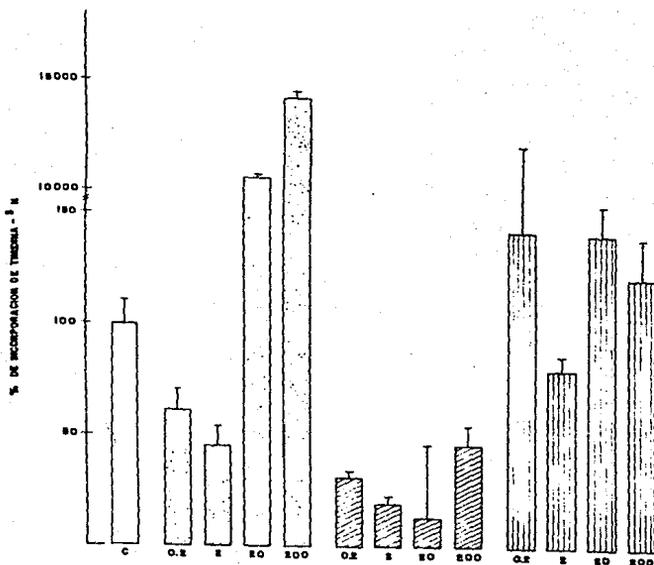


Fig. 13 Porcentaje de Incorporación de Timidina-³H por --
linfocitos humanos purificados a partir de sangre
periférica.

□ Células con PHA; ▨ Células con PHA + FC a --
dosis de 0.2, 2, 20 y 200 ug; ▩ Células con PHA
+ FC digerido a dosis de 0.2, 2, 20 y 200 ug. --
▤ Células con PHA + Material dializable obteni-
do a partir de cerdo normal a dosis de 0.2, 2, 20
y 200 ug.

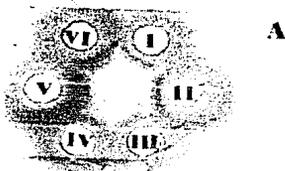


Fig. 14A Immunodifusión del material no dializable de la larva de Taenia solium v.s. suero de ratón anti-material no dializable. El antígeno se utilizó a dosis de: 7.5 ug (I); 15 ug (II); 30 ug (III); 45 ug (IV); 60 ug (V) y 75 ug (VI).

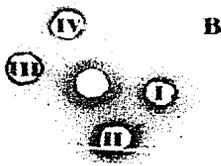


Fig. 14B Immunodifusión del material no dializable de la larva de Taenia solium v.s. suero de ratón anti-material no dializable + FC. El antígeno se utilizó a dosis de: 30 ug (I); 45 ug (II); 60 ug (III) y 75 ug (IV). Nótese que en ninguno de los casos se formaron bandas de precipitación.

cen por electroforesis en geles de poliacrilamida de los antígenos relacionados (Fig. 6, B), seis son antigénicas ya que se evidenciaron seis sistemas antígeno-anticuerpo que migraron hacia ambos lados del sitio de aplicación de la muestra, como se puede observar en la fotografía y el esquema de la Figura 15A. Sin embargo, en el caso del suero anti-antígenos relacionados más FC no se formó ninguna banda de precipitación contra los antígenos relacionados (Fig. 15B).

Antígenos no relacionados. Teniendo como base la participación del FC sobre la producción de anticuerpos hacia antígenos relacionados con la larva de T. solium, se realizó un experimento con un antígeno no relacionado, como son los eritrocitos de carnero. Se obtuvo un antisuero anti-eritrocitos de carnero y otro proveniente de ratones inmunizados con eritrocitos de carnero más FC, éstos antisueros se probaron por hemaglutinación. Los resultados mostraron que el suero proveniente de los animales inoculados con FC dió una reacción positiva hasta una dilución de 1:64 en tanto que el suero de los animales inmunizados con eritrocitos de carnero más FC a diferentes concentraciones (100 200 y 300 ug), no formó ninguna malla de aglutinación precipitada aún con diluciones de 1:2 (Fig. 16).



Fig. 15A Inmunolectroforesis del material no dializable de la larva de Taenia solium usando suero de ratón anti-material no dializable. En el esquema y la fotografía se puede observar la distribución de los seis sistemas antígeno anticuerpo. Pozo 1, 15 ug. Pozo 2, 30 ug).

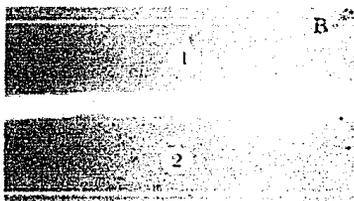


Fig. 15B Inmunolectroforesis del material no dializable de la larva de Taenia solium usando suero de ratón anti-material no dializable + FC. Pozo 1, 15 ug. Pozo 2, 30 ug. Nótese que no hay formación de sistemas antígeno-anticuerpo.

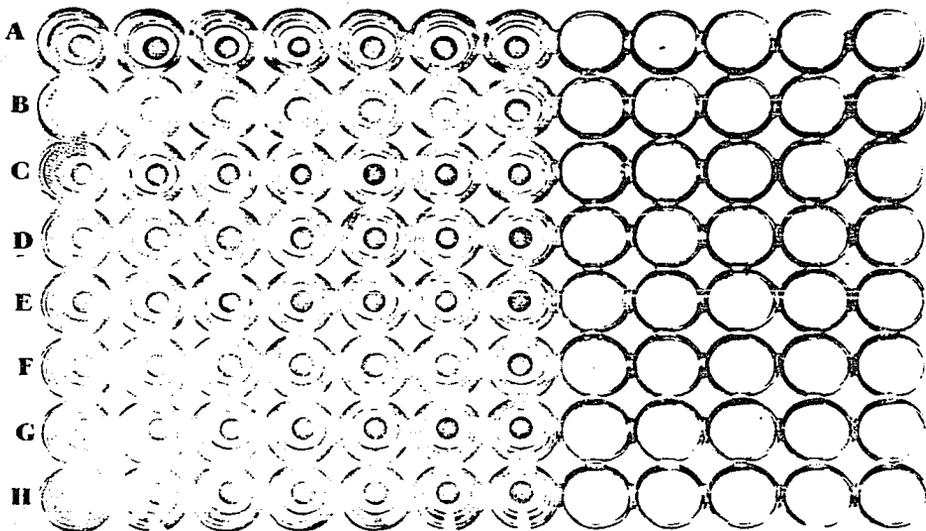


Fig. 16 Determinación del título de anticuerpos en suero de ratón mediante la prueba de hemaglutinación.

Diluciones seriadas a partir de 1:2

- A: Suero de ratón normal
- B: Suero de ratón inmunizado con 1.6×10^8 EC
- C: Suero de ratón inmunizado con 100 ug de FC
- D: Igual que C más 1.6×10^8 EC
- E: Suero de ratón inmunizado con 200 ug de FC
- F: Igual que E más 1.6×10^8 EC
- G: Suero de ratón inmunizado con 300 ug de FC
- H: Igual de G más 1.6×10^8 EC

Nótese que donde se observa la malla de aglutinación precipitada es únicamente en B -- (1:2 - 1:64).

FC = Factor de cisticerco de Taenia solium
EC = Eritocitos de carnero

DISCUSION

Los resultados de este trabajo muestran que el producto de secreción de la larva de Taenia solium tiene un papel importante en la modulación de la respuesta inmune; por un lado, induce inmunosupresión en ratones, y por el otro, tiene una actividad mitogénica sobre linfocitos humanos en cultivo. Se ha reportado que otros parásitos tales como Trichinella spiralis, Schistosoma mansoni y Trypanosoma cruzi producen sustancias de secreción que inducen una inmunosupresión (Capron y cols., 1977; Faubert, 1976; Barriga, 1975; Albright y cols., 1978). También se han reportado algunos parásitos (Trypanosoma cruzi y Leishmania tropica) que inducen una respuesta policlonal en células B que resulta en una sobreproducción de inmunoglobulinas no específicas (Hudson y cols. 1976; Assoku y cols., 1978; Kabakayawa y cols., 1979 y Weintraub y cols., 1982).

Sin embargo, es importante hacer notar que en estos trabajos no se purificaron ni se caracterizaron bioquímicamente las sustancias liberadas responsables de tales actividades, mientras que en el presente trabajo se obtuvieron evidencias que llevaron a pensar que el producto secretado es un ácido nucléico del tipo ARN. Tales evidencias fueron que: el FC tiene un solo pico de absorción a 255 nm, el cual es muy semejante al patrón de absorción de los ácidos nucléicos (260 nm); la reacción de orcinol mostró un alto contenido de ribosa (72 ug/mg de peso seco); el FC se tiñe positivamente con Bromuro de Etidio, colorante específico para nucleótidos, cuando se corre en geles de agarosa, y la susceptibilidad del FC a la acción enzimática de la ARNasa "A". Además el peso molecular aproxima-

do del FC es de 27,000 d.

También se observó una actividad mitogénica adicional del FC sobre linfocitos humanos cultivados en presencia de PHA. Este hallazgo -- sugiere que el FC es capaz de inducir en el hospedero una respuesta linfoproliferativa que afecta principalmente a célula T, activando probablemente a clonas de células T supresoras. Tales clonas inducirían en el hospedero un estado de inmunosupresión, lo cual le permite sobrevivir al parásito. Además, es importante hacer notar que cuando los linfocitos humanos se cultivaron en presencia de LPS más FC no hubo incorporación de Timidina-³H. Lo cual corrobora la idea de que el FC actúa sobre los linfocitos T, induciendo la proliferación de clonas supresoras. En este sentido, -- Diamantstein y cols. (1980) reportaron que un extracto obtenido de -- Entamoeba histolytica es capaz de inducir la proliferación de clonas de células T supresoras, así mismo, Ferrante y Smithe (1984) reportaron un extracto de Naegleria fowleri con actividad mitogénica para linfocitos T.

Por otra parte, el FC al ser tratado con la enzima ARNasa -- pierde su actividad mitogénica adicional sobre los linfocitos cultivados con PHA. Dichos resultados concuerdan perfectamente al observar el comportamiento electroforético del FC en geles de agarosa, en los que la banda fluorescente presente en el FC sin digerir, desaparece cuando el FC es digerido con la ARNasa, lo cual denota la destrucción total del FC y por ende la destrucción de su actividad mitogénica adicional.

Un hecho importante que llevó a la conclusión de que el FC es un producto verdaderamente liberado por el parásito y además con capacidad de influir en la proliferación de linfocitos cultivados con PHA, fué que -

el material obtenido de la misma forma que el FC pero proveniente de cerdo sin parásitos no mostró efecto alguno sobre linfocitos humanos cultivados en presencia de PHA, es decir, no poseía un efecto mitogénico adicional.

Con respecto a la capacidad inmunosupresora del FC en ratones, esta se puso en evidencia por dos caminos: El primero fué el inocular un grupo de ratones con FC más antígenos relacionados, dichos ratones no produjeron anticuerpos; y otro grupo de ratones inmunizados únicamente con los antígenos relacionados, los cuales si produjeron anticuerpos. El segundo camino fué al inocular ratones con FC más un antígeno no relacionado timo dependiente (eritrocitos de carnero), y se observó que a ninguna dosis de FC ensayada hubo producción de anticuerpos anti eritrocitos de carnero, sin embargo, el grupo de ratones inmunizado únicamente con eritrocitos de carnero si produjeron anticuerpos (título 1:64).

Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos por --- otros investigadores quienes han demostrado que en algunas parasitosis los hospederos están inmunodeprimidos hacia antígenos relacionados y no relacionados con el parásito (Arredondo y Pérez, 1979). En lo que respecta a la depresión de la respuesta inmune del hospedero exclusivamente hacia antígenos no relacionados, se ha reportado que los ratones infectados con Trichinella spiralis, presentan una respuesta humoral deprimida hacia eritrocitos de carnero (Barriga, 1975; Faubert and Tanner, 1975 y Lubiniecki and Cypess, 1975) y hacia el virus B de la encefalitis japonesa (Cypess y cols., 1973), lo cual ha sido atribuido a un gran número de causas incluyendo competencia antígenica y sustancias inmunosupresoras elaboradas por el parásito. En el --

fenómeno de competencia antigénica la respuesta inmune está deprimida por acción de un primer antígeno hacia un segundo no relacionado (Cypess y cols., 1973).

En la literatura se han citado trabajos cuyo objetivo es observar sobre que tipo de células inmunocompetentes (B ó T) puede actuar algún agente inmunosupresor proveniente de un parásito, como en el caso de ratones infectados con Plasmodium beghei los cuales presentan una respuesta inmune deprimida hacia una variedad de antígenos timo dependientes como eritrocitos de carnero y DNP-KLH y no así a los que son timo independientes como DNP-Ficol, lo cual sugiere que las células B no son las que participan en la inmunosupresión pero si las T cooperadoras (Khansari y cols., 1981). Al aplicar este mismo criterio, en el presente trabajo se ensayó la respuesta humoral hacia un antígeno no relacionado timo dependiente obteniendo como resultado una inmunosupresión, lo cual puede sugerir que las células T cooperadoras están suprimidas, probablemente por la acción de células T supresoras que fueron activadas por el FC.

Recientemente se ha sugerido que el cisticerco de Taenia solium evade la respuesta inmune del huésped al cubrirse de proteínas del mismo -- como consecuencia de una activación policlonal de células B (Willms y Arcos, 1977). Por otra parte Musoke y Williams (1975) han sugerido la presencia de un factor anticomplemento en el fluido del cisticerco de Taenia taeniaformis. Ahora bien, la liberación del FC por parte del cisticerco de Taenia solium puede ser otro mecanismo de evasión de la respuesta inmune; el FC liberado en el hospedero estimularía células T supresoras que inducirían un estado de

inmunosupresión hacia antígenos no relacionados timo dependientes, y hacia antígenos relacionados.

Los hallazgos presentados aquí abren otras posibilidades de estudio con el objeto de entender la relación hospedero-parásito. Para lo -- que sería conveniente probar el FC sobre células de Bazo y de Timo en presencia de su mitógeno correspondiente, así como observar su participación -- frente a un antígeno timo independiente. Además de la evaluación de la proporción Células T cooperadoras / Células T supresoras en ratones tratados -- con FC.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que el producto de secreción (FC) del cist
cerco de Taenia solium obtenido en este trabajo, es capaz de estimular -
aditivamente la incorporación de Timidina ³H por linfocitos humanos culti
vados en presencia de PHA.

Que el FC es un ácido nucléico del tipo ARN, y que pierde su
actividad al ser tratado con ARNasa "A".

Además de lo anterior el FC inmunosuprime la producción de an
ticuerpos anti antígenos relacionados con la larva de Taenia solium y de
anticuerpos anti antígenos no relacionados timo dependientes.

Finalmente, se puede concluir que el FC es capaz de modular la
respuesta inmune y evadir, así el ataque inmunológico del hospedero diri-
gido a destruir al parásito.

BIBLIOGRAFIA

1. Abelene, D.C., Tobie, J.E., Hill, G.J., Contacos, P.G. y Evans, C.B. (1965). Alteracions in serum proteins and 19S antibody production during the course of induced malarial infections in man. American J. Trop. Med. Hyg. 14, 191-197.
2. Agu, W.E., Farrel, J.P. y Soulsby, E.J.L. (1982) Pathogenesis of anemia in hamsters infected with Leishmania donavani. Z. Parasitend. 68, 27.
3. Albright, J.W., Albright, J.F. y Dusanic, D.G. (1978). Mechanisms of trypanosome mediates suppression of humoral immunity in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 3933.
4. Arakaki, D.T. y Sporkes, R.S. (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. Cytogenetics. 2, 57-60.
5. Arredondo, B., y Pérez, H. (1979). Alterations of the immune response associated with experimental leishmaniasis. Infect. Immunity. 25, 16-22.
6. Ashwell, G. (1957). Colorimetric analysis of sugars. In "Methods in Enzymology" by Colowick, S.P. and Kaplan, N.D. Academic Press, New York 3, 680-684.
7. Assoku, R.K. y Tizard, I.R. (1978). Mitogenicity of autolysates of Trypanosoma congolense. Experience 34, 127-129.

8. Attallah, A.M., Smith, A.H., Murrey, K.D., Fleischer, T., Woody, J., Vannier, W.E., Scher, I., Ahmed, A., and Seu, M.W. (1979). Characterization of the immunosuppressive state during Schistosoma mansoni infection. *J. Immunol.* 122: 4, 1413-1420.
9. Aune, T.M., Freeman, G.L. y Colley, D.G. (1985). Production by the lymphokine soluble immune response suppressor (SIRS) during chronic experimental Schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 135: 4, 2768.
10. Barriga, O. (1975). Selective immunodepression in mice by Trichinella spiralis extracts and infections. *Cell. Immunol.* 17, 306-309.
11. Blackwell, J., and Ulczak, A.D. (1984). Influence of H-2 complex on acquired resistance to Leishmania donovani infection in mice. *Nature (London)*. 287, 72-74.
12. Bloom, B.R. (1979) Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. *Nature* 279, 21.
13. Boyden, S.V. (1951). The adsorption of proteins on erythrocytes treated with-tonnic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp. Med.* 93, 107-120.
14. Boyum, A. (1968). Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97, 21.

8. Attallah, A.M., Smith, A.H., Murrey, K.D., Fleischer, T., Woody, J., Vannier, W.E., Scher, I., Ahmed, A., and Seu, M.W. (1979). Characterization of the immunosuppressive state during Schistosoma mansoni infection. J. Immunol. 122: 4, 1413-1420.
9. Aune, T.M., Freeman, G.L. y Colley, D.G. (1985). Production by the lymphokine soluble immune response suppressor (SIRS) during chronic experimental Schistosomiasis mansoni. J. Immunol. 135: 4, 2768.
10. Barriga, O. (1975). Selective immunodepression in mice by Trichinella spiralis extracts and infections. Cell. Immunol. 17, 306-309.
11. Blackwell, J., and Ulczak, A.D. (1984). Influence of H-2 complex on acquired resistance to Leishmania donovani infection in mice. Nature (London). 287, 72-74.
12. Bloom, B.R. (1979) Games parasites play: how parasites evade immune surveillance. Nature 279, 21.
13. Boyden, S.V. (1951). The adsorption of proteins on erythrocytes treated with-tonnic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. J. Exp. Med. 93, 107-120.
14. Boyum, A. (1968). Separation of leucocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97, 21.

15. Capron, P.A., Camus, J.P., Dessaint, y LeBoubenner-Fischer (1977). Alterations de la response immune av course des infection parasitaires. Ann. Immunol. (Inst. Pasteur). 128, 541.
16. Blausen, J. (1971). Immunochemical techniques for the identification and estimation of macromolecules, laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. T.S. Work y E. Work. North Holland Publication Co., Amsterdam. 447-463.
17. Clegg, J.A., Smithers, S.R. y Terry, R.J. (1971). Acquisition of human antigens by Schistosoma mansoni during cultivation in vitro. Nature. 232, 653.
18. Clinton, B.A., Stauber, L.A. y Palizuk, N.C. (1975). Leishmania donovani: Antibody response to chicken ovalbumin by infected golden hamsters. Exp. Parasitol. 25, 171-180.
19. Cottrell, B.J., Sturrock, R.J., Vanhoegaerden, J.M. (1980). An immunosuppressive factor in the serum of baboons (Papio anubis) infected with Schistosoma mansoni. Immunology. 30, 587-598.
20. Coulis, P.A., Lewert, R.M. y Fitch, F.W. (1978). Splenic suppressor cells and cell mediated cytotoxicity in murine schistosomiasis. J. Immunol. 20, 1074.
21. Cox, H.W. y Hayes, M.M. (1985). Reversal of immunosuppression induced with plasma of malarious rats by supplemented complement. J. Parasitol. 71: 1, 50-55.

22. Cunningham, D.S., Kuhn, R.E. y Rowland, E.C. (1978). Suppression of humoral responses during Trypanosoma cruzi infections in mice. *Infect. Immun.* 155-160.
23. Cypess, R.H., Lubinecki, A.S. y Hammon, W.McD. (1973). Immuno-suppression and increased susceptibility to Japanese B encephalitis virus in Trichinella spiralis infected mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 143, 469-473.
24. Dessaint, J.P., Camus, D., Fisher, E., y Capron, A. (1977). Inhibition of lymphocyte proliferation by factor(s) produced by Schistosoma mansoni. *Eur. J. Immunol.* 7, 624-629.
25. Diamantstein, T., C.; Tridl, M., Klos, D. Gold, y H. Hahn (1980). Mitogenicity of Entamoeba histolytica for murine lymphocytes. *Immunology* 41, 347-352.
26. Esuruoso, G.D. (1976). The demonstration in vitro of the mitogenic effects of trypanosomal antigen on the spleen cells of normal, athymic, and cyclophosphamide treated mice. *Clin. Exp. Immunol.* 23, 314-317.
27. Faubert, G.M. y Tanner, C.E. (1971). Trichinella spiralis: inhibition of sheep hemagglutinins in mice. *Exp. Parasit.* 30, 120.
28. Faubert, G.M. y Tanner, C.E. (1975). Leucoagglutination and cytotoxicity of the serum of infected mice and of extracts of Trichinella spiralis larvae and the capacity of infected mouse sera to prolong skin allografts. *Immunology.* 28, 1041-1050.

29. Faubert, G.M. (1976). *Immunology* 30, 485.
30. Ferrante, A., y C. Smuthe (1984). Mitogenicity of Nacgleria flowleri extract for murine T-lymphocytes. *Immunology* 51, 461-468.
31. Fudenberg, H., Stites, D.P., Stobo J.D. y Wells, J.V. (1983). *Immunología Básica y Clínica. Manual Moderno. México, D.F.* 825 pp.
32. Good, A.H. y Miller, K.L. (1976). Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with Taenia crassiceps larvae. *Infect. Immun.* 14: 2, 449-456.
33. Greenwood, B.M. (1974). Possible role of a B cell mitogen in hypergammaglobulinemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet.* 1, 435-436.
34. Ho, M., Koech, D.K., Iha, D.W. y Bryceson, A.D.M. (1983). Immunosuppression in kenyan visceral leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 51, 207.
35. Hudson, K.M., Byner, C., Freeman, J. y Terry, R.S. (1976). Immunodepression, high IgM levels, and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature* 264, 256-258.
36. Kemp, W.M., Merrit, S.C., Bogucki, H.S., Rosier, J.G. y Seed, J.R. (1977). Evidence for adsorption of heterospecific host immunoglobulin on the tegument of Schistosoma mansoni. *J. Parasitol.* 62, 413-419.

37. Khansari, N., Segre, M. y Segre, D. (1981). Immunosuppression in murine malaria: A soluble immunosuppressive factor derived from Plasmodium berghei - infected blood. J. Immunol. 127: 5, 1889-1893.
38. Kobakayawa, T., Louis, J., Isui, S. y Lambert, P.H. (1979). Autoimmune response to DNA, red blood cells, and tymocyte antigen in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. J. Immunol. 122, 296-301.
39. Levy, L.H. y Mendes, E. (1981). Impaired cell-mediated immunity in patients with Kala-azar. Allerg. Immunopathol. 4, 109.
40. Loew, F.Y., Hale, C. y Howard, J.G. (1982). Immunologic regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. V. Characterization of effector and specific suppressor T cells. J. Immunol. 128, 1917.
41. Lowry, D.H., Rosebrough, J.J., Far, A.L., y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin serial reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
42. Lubiniecki, A.S. and Cypess, R.H. (1975). Immunological sequelae of Trichinella spiralis infection in mice: effect on the antibody responses to sheep. Erithrocytes and japanese B encephalitis virus. Infect. Immun. 11: 6, 1306-1311.
43. Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 200-209.PP.
44. Margni, R.A. (1982). Inmunología e Inmunoquímica. Panamericana. Buenos Aires Argentina. 592 pp.

45. Molinari, J.L., Meza, R., Suárez, B., Palacios, S., Tato, P. y Retana, A. (1983). Taenia solium: Immunity in hogs to the cysticercus. *Experimental parasitology*. 55, 340-357.
46. Moorhead, P.S. (1973). Human Blood Leukocytes. In: *Tissue culture: Methods and Applications*. Kruse, P.K. and M.K. Patterson, ed. Academic Press, Inc. New York, E.U.A.
47. Murray, H.W., Masur, H. y Keithly, J.S. (1982). Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Conclusion between resistance to Leishmania donovani and lymphokine-generating capacity. *J. Immunol.* 129, 344.
48. Musoke, A.J. y Williams, J.F. (1975). The immunological response of the rat to infection with Taenia taeniaeformis. V. Sequence of appearance of proective immunoglobulins and the mechanism of action of 7SY2a antibodies. *Immunology* 29, 855-866.
49. Nickol, A.D., y Bonventre, P.I. (1985). Visceral leishmaniasis in congenic mice of susceptible and resistant phenotypes: Immunosuppression by adherent spleen cells. *Infect. Immun.* 50: 1, 160-167.
50. Ogilvie, B.H. y Wilson, R.I.M. (1976). Evasion of the immune response by parasites. *Br. Med. Bull.* 32: 2, 177-181.
51. Pelley, R.P., Ruther, J.J. y Warren, K.S. (1976). Suppressive effect of a chronic helminth infection, schistosomiasis mansoni, on the in vitro responses of spleen and lymph node cells to the T cell mitogens phytohemagglutinin and Concanavalin A. *Infect. Immun.* 13, 1176-1183.

52. Ramalho-Pinto, F.J., De Souza, J.B. y Playfair, J.H.L. (1976). Stimulation and suppression of response of mouse T cells to the Schistosomules of Schistoma mansoni during infection. Nature 259, 603-604.
53. Ramos, C., Siwon-Schadtler, I. y Ortiz-Ortiz, L. (1979). Suppressor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi. J. Immunol. 122: 4, 1243-1247.
54. Reiner, N. y Finke, J.H. (1983). Interleukin 2 deficiency in murine Leishmaniasis donavani and its relationship to depressed spleen cell response to phytohemagglutinin. J. Immunol. 131, 1487.
55. Rowland, E.C., y Kuhn, R. (1978). Suppression of cellular response in mice during Trypanosoma cruzi infections. Infect. Immun. 20: 2, 393-397.
56. Sealey, M., Ramos, C., Willms, K. y Ortiz-Ortiz, L. (1982). Taenia solium: mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes. Parasite Immunology 3, 299-307.
57. Schneider, W.C. (1945). Determination of Nucleic acids in tissues by pentosa analysis. J. Biol. Chem. 161, 293.
58. Scott, P.A. and Farrell, J.P. (1981). I. Nonspecific immunodepression in BALB/c mice infected with Leishmania tropica. J. Immunol. 127: 6, 2395-2400.

59. Stauber, L.A., Ochs, J.Q. y Coy, N.H. (1954). Electrophoretic patterns of the serum proteins of chinchillas and hamsters infected with Leishmania donavani. *Exp. Parasitol.* 3, 325.
60. Stauber, L.A. (1955). Leishmaniasis in the hamster. In some Physiological aspects and consequences of parasitism, ed. William H. Cole Rutgers University Press, New Brunswick. 76-90.
61. Stauber, L.A. (1958). Host resistance to the krartoum strain of Leishmania donovini. The Rice Institute, Houston. 18, 35-40.
62. Strickland, G.T., Pettitt, L.E. y Volled, A. (1973). *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 22, 452.
63. Soulsby, F.J.L. y Coombs, R.R.A. (1959). Studies on blood group substances associated with Ascaris lumbricoides. *Parasitology* 49, 505.
64. Svet-Moldavsky, G.I., Shaghijian, I. Y., Chernyakhovskaya, N., Ozeretskoy, N.N., y Kadagnidze, Z.G. (1970). Inhibition of skin allograft rejection in Trichinella infected mice. *Transplantation* 9, 69-70.
65. Varela-Díaz, V.M. y Coltorti, E.A. (1973). The presence of host immunoglobulins in hydatid cyst membranes. *J. Parasitol.* 59, 484.
66. Weber, K., y Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412.

67. Weinbaum, F.I., Weintraub, J., Nkrumah, F.K., Evans, Ch.B., Tigeladr, R.E. y Rosenberg, Y. (1978). Immunity to Plasmodium berghei yoelli in mice. II. Specific and nonspecific cellular and humoral responses during the course, of infection. J. Immunol. 121, 2-10.
68. Weintraub, J., Gottlieb, M. y Weinbaum, F.I. (1982). Leishmania tropica: Association of a B-cell mitogen with hypergamma-globulinemia in mice. Exp. Parasitol. 53, 87-96.
69. Welbs, J.M. y Lury, Y.B. (1960). Developments in the chemical determinations of nucleic acid. Meth. Biochem. Anal. 6, 1-30.
70. Williams, J.F. (1979). Recent advances in the immunology of cestode infections. J. Parasitol. 65: 3, 337-349.
71. Willms, K. y Arcos, L. (1977). Taenia solium host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp. Parasitol. 43, 396.
72. Willms, K., y Merchant, M.T. (1980). The inflammatory reaction surrounding Taenia solium larvae in pig muscle: Ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol. 2, 261-275.