

71
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL EXTRACTO CRUDO Y DE LOS
PRODUCTOS DE EXCRECION-SECRECION DEL
CISTICERCO DE *Taenia solium* SOBRE EL SISTEMA
DEL COMPLEMENTO *in vitro*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A :

MARIA DEL CONSUELO GOMEZ GARCIA



MEXICO, D. F.

1993

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 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.

INDICE

I. RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. EL PARASITO	4
A).- TAXONOMIA	4
B).- DESCRIPCION MORFOLOGICA Y CICLO DE VIDA	5
C).- ENFERMEDAD	8
D).- RESPUESTA INMUNE	10
III. RELACION HUESPED - PARASITO	12
IV. SISTEMA DEL COMPLEMENTO	17
A).- VIA CLASICA	20
B).- VIA ALTERNA	26
C).- COMPLEJO DE ATAQUE A LA MEMBRANA	30
D).- PROTEINAS REGULADORAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	34
E).- CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACTIVACION DEL COMPLEMENTO	37
V. JUSTIFICACION	40
VI. HIPOTESIS	41
VII. OBJETIVO	42
VIII. MATERIAL Y METODOS	43
IX. RESULTADOS	57
X. DISCUSION	70
XI. CONCLUSIONES	78
XII. BIBLIOGRAFIA	79

I. RESUMEN

El metacéstodo de *Taenia solium*, es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. Este parásito, tiene la capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en su huésped. Se han propuesto diferentes mecanismos de evasión, para tratar de explicar dicha capacidad; uno de estos, es la evasión del sistema del Complemento.

En el presente trabajo, se estudió el efecto del extracto crudo y los productos de excreción - secreción del cisticerco de *T. solium* sobre el sistema del complemento *in vitro*, mediante un sistema de eritrocitos de carnero sensibilizados. Se observó, que al poner en contacto diferentes concentraciones del extracto crudo o de los productos de excreción - secreción frescos del primer y segundo día de cultivo, con una serie de diluciones del complemento, ambos presentaron una reducción en la actividad lítica en un 76%, 27% y 41% en sus mas altas concentraciones que fueron 500, 265 y 601 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Sin embargo, al probar los productos de excreción - secreción congelados el valor de inhibición con la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ fué de 14%.

Al analizar los resultados obtenidos, se observó, que existe un componente o componentes del cisticerco, que están inactivando al complemento. Hasta el momento, se sabe que el antígeno B del cisticerco es capaz de inactivar la vía clásica del complemento, pero experimentos preliminares en los que se eliminó el antígeno B del extracto crudo, mostraron también un decremento en la lisis celular que fué de un 81%.

II. INTRODUCCION

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria, la cual es causada por el establecimiento de la larva de *Taenia solium* en el sistema nervioso central y en el músculo esquelético de sus huéspedes intermediarios que son el hombre y el cerdo.

Esta parasitosis constituye un importante problema de Salud Pública en los Países Subdesarrollados de Asia, Africa y América Latina principalmente, en donde las condiciones higienicas y sanitarias son precarias (1).

En México, la neurocisticercosis se encuentra entre una de las 10 enfermedades más importantes (2), ya que aunque la incidencia y prevalencia real de la cisticercosis no se conoce en forma precisa, existen en la literatura reportes que dan idea de la magnitud del problema; al respecto Woodhouse y cols., (1982), reportaron que el 1% de la población mexicana presenta anticuerpos circulantes anticisticercos (3); en un estudio más reciente Larralde y cols., (1992) reportaron el 1.2%, siendo el D.F. el de mayor incidencia con un 2.95% (4). Sin embargo estos datos pueden estar subestimados debido a que pueden existir variaciones en la prevalencia real de esta enfermedad, ya que este dato depende del manejo y destino de las heces humanas, del control de la carne de cerdo parasitada, de

las costumbres culturales en cuanto al consumo y manejo de la carne de cerdo y de los métodos para identificar y tratar a los portadores del parásito (5).

Además los costos de atención médica a esta parasitosis son elevados, debido a que algunas veces los enfermos necesitan ser hospitalizados y recibir diferentes tipos de tratamiento. También las pérdidas económicas son cuantiosas, debido al decomiso de carne infectada, no apta para el consumo humano, ya que en el país existe una alta prevalencia de cisticercosis porcina que alcanza hasta un 7% en los diferentes rastros; aunque esta cifra puede ser inexacta por lo anteriormente mencionado, ya que en nuestro país es muy frecuente que los cerdos se críen en condiciones insalubres y se sacrifiquen en ausencia de inspección sanitaria (6). Debido a lo anterior, esta enfermedad resulta ser un importante problema socioeconómico y de salud.

III. *Taenia solium*

A) .- TAXONOMIA

Phylum **Platyhelminthes**

Clase **Cestoda**

Orden **Cyclophyllidea**

Familia **Taeniidae**

Género ***Taenia***

Especie ***Taenia solium*** **Linnaeus (1758)**

B).- DESCRIPCION MORFOLOGICA Y CICLO DE VIDA

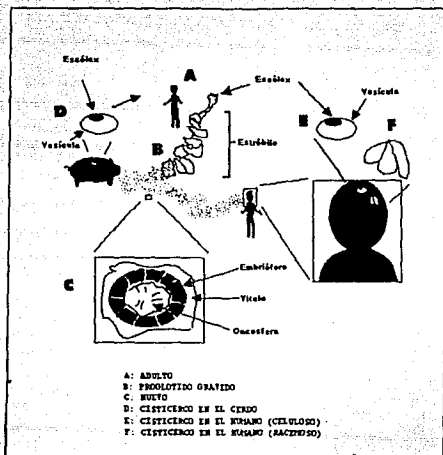


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

Taenia solium es un céstodo hermafrodita, de la familia de los Taenidos, cuyo único huésped definitivo natural es el ser humano (7). El parásito adulto presenta un cuerpo aplanado y alargado que generalmente mide de 1.5 a 5.0 metros; vive adherido a la pared del intestino delgado y puede llegar a sobrevivir hasta 25 años. Su cuerpo consta de 3 partes: escólex, cuello y estróbilo. El escólex

es piriforme, mide de 0.6 a 1.0 mm de diámetro, presenta 4 ventosas musculares como órganos de fijación y un roseto con una doble corona de ganchos. El cuello es corto y no segmentado, y es seguido por el estróbilo, el cual presenta una serie de segmentos llamados proglótidos, los más cercanos al cuello son llamados proglótidos inmaduros, le siguen los proglótidos maduros; en los que se puede observar un ovario trilobulado y los testículos, y en la parte final del estróbilo se encuentran los proglótidos grávidos que miden de 7 a 12 mm de largo por 5-6 mm de ancho, su parénquima se encuentra ocupado principalmente por un saco uterino central que presenta de 7 a 16 ramas laterales en las cuales se encuentran alrededor de 50 000 huevecillos (7,8). Los proglótidos grávidos se desprenden del gusano adulto y salen junto con las heces del hospedero en un promedio de 4 a 5 por día. Los huevecillos son liberados al ambiente pudiendo de esta forma ser ingeridos por el hombre o el cerdo (7,9).

Los huevecillos miden aproximadamente: 30 μ m de diámetro y se encuentran rodeados por una membrana hialina llamada vitelo de donde obtienen sus nutrientes; este vitelo rodea a una gruesa pared estriada denominada embrióforo la cual consiste de una serie de tabiques llamados bloques embriofóricos, que se encuentran unidos entre sí por una proteína cementante, todo ésto a su vez se encuentra incluido por la membrana oncosferral, la cual cubre al embrión hexacanto (llamado así porque tiene 3 pares de ganchos) (9,10).

Los huevecillos, al ser ingeridos por el hombre o el cerdo, quedan bajo la acción de las enzimas gástricas, que rompen a la proteína cementante y a la membrana oncosferral liberándose así el embrión hexacanto (10), el cual, con la ayuda de sus ganchos y mediante la liberación de sustancias líticas es capaz de adherirse y penetrar a la pared intestinal hasta llegar al torrente circulatorio o linfático, por el cual es transportado a todo el organismo llegando a establecerse al tejido muscular, al tejido subcutáneo, al sistema nervioso central o al ojo (1). Una vez establecido, el embrión aumenta considerablemente de tamaño llegando a medir de 0.5 a 2.0 cm de diámetro por lo que se convierte en una estructura fácilmente visible en un periodo de tiempo mínimo de 10 semanas (9), formándose así el cisticerco o metacéstodo. Este presenta una vesícula ovalada y translúcida, la cual contiene el fluido vesicular y el escólex invaginado; la superficie de la pared vesicular del cisticerco se encuentra cubierta por unas estructuras denominadas microtricas, a través de las cuales ocurre el intercambio metabólico, e inmunológico entre el huésped y el parásito.

El ciclo de vida se completa cuando el hombre ingiere carne de cerdo infectada cruda o insuficientemente cocida, donde al penetrar el cisticerco al intestino, por la acción de las enzimas gástricas y de las sales biliares se provoca su activación generando así su evaginación y posteriormente su fijación a la pared del intestino desarrollándose en un adulto en un tiempo aproximado de 4 meses. Esta última etapa de la infección es llamada teniasis (11).

C).- ENFERMEDAD

El cisticerco de *T. solium* es capaz de generar una serie de manifestaciones clínicas muy diversas en su huésped, debido al tipo de cisticerco presente (celuloso o racemoso) a su viabilidad, al número de parásitos presentes, a su localización, a la intensidad de la reacción inflamatoria y a las condiciones del huésped.

El tipo de cisticercosis más frecuente en México es la cisticercosis cerebral llamada neurocisticercosis, debido al establecimiento de la larva en el parénquima, el espacio subaracnoideo o en las cavidades ventriculares del sistema nervioso central (SNC); le sigue en frecuencia la cisticercosis ocular, a causa del establecimiento del parásito dentro del globo ocular o detrás de la retina y finalmente se encuentran la espinal, la subcutánea y la muscular (12). Debido a lo anterior, la sintomatología causada por este parásito es muy variable, pudiendo cursar como una enfermedad sintomática o asintomática.

El daño que produce en el SNC del humano es muy heterogéneo, ya que puede presentar desde perturbaciones sensoriales o motoras leves, hasta la presencia de crisis convulsivas, cefalea y cuadro de hipertensión endocraneana debida a la obstrucción de la circulación del líquido cefalorraquídeo pudiendo evolucionar hasta la muerte. La cisticercosis ocular puede provocar la pérdida funcional o anatómica del órgano visual afectado; mientras que la cisticercosis muscular y subcutánea son las que menos trastornos

producen en el hombre, aunque pueden ocasionar dolor muscular y debilidad (13).

Por otro lado, la cisticercosis porcina tiene pocas descripciones clínicas debido a que las alteraciones que induce son muy leves o no se presentan aún cuando el cerdo se encuentre densamente parasitado (14). Esto posiblemente se deba a que esta parasitosis en el cerdo es menos duradera que en el humano, ya que los animales son sacrificados a una edad máxima de 1 año, mientras que la cisticercosis humana puede llegar a ser hasta de 30 años (15). Por esto es importante el conocimiento de los mecanismos de infección, modalidades clínicas y patológicas y el estudio de la respuesta inmune.

D).- RESPUESTA INMUNE

El estudio de la respuesta inmunológica en esta relación huésped-parásito, ha sido de gran utilidad, no sólo para ayudar al diagnóstico de la enfermedad, sino también para determinar los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, los elementos del sistema inmunológico que confieren inmunidad y los mecanismos responsables de ello, así como los procesos que permiten al parásito evadir la respuesta inmune (12).

a).-Respuesta Inmune Humoral

En cuanto a la respuesta inmune humoral se han realizado una serie de estudios, utilizando diversas técnicas inmunológicas tales como la inmunolectroforesis (IEF), el ELISA (Enzyme Lynked Immunosorbent Assay) y la inmunolectrotransferencia (IET) por medio de las cuales se ha podido caracterizar la respuesta inmune humoral, por lo que en la actualidad se sabe que existen diferentes clases de inmunoglobulinas en el suero y el LCR de pacientes con neurocisticercosis y que el anticuerpo que se encuentra en la mayoría de los casos es de la clase IgG (85%), siguiéndole la IgM (50%) y finalmente la IgA (26%), en este estudio se encontraron anticuerpos IgE sólo en uno de los pacientes (3%) (16,17,18). Además se encontró también que los sueros de los pacientes son capaces de reconocer hasta 8 antígenos con diferentes frecuencias, encontrándose que existe un componente del extracto contra el cual

el 85% de los sueros positivos tienen anticuerpos específicos. Este antígeno denominado antígeno B ya ha sido purificado y está compuesto de dos proteínas una de 95 000 y otra de 105 000 kd; este antígeno se encuentra en la superficie del parásito aunque también es un producto de secreción (19,20).

b).- Respuesta Inmune Celular

La respuesta inmune celular ha sido pobremente estudiada en esta parasitosis. Sin embargo, en reportes existentes se ha analizado la capacidad de respuesta celular inespecífica in vivo en pacientes con cisticercosis utilizando mitógenos o derivados proteícos (PPD de *Mycobacterium tuberculosis* y Conavalina A), encontrándose que los pacientes con cisticercosis presentan una baja respuesta celular en comparación con individuos sanos (18,21). Por esto se ha sugerido que el parásito tiene la capacidad de inmunosuprimir a su huésped.

IV. RELACION HUESPED - PARASITO

El parasitismo es una relación en la cual un organismo (el parásito), va a ser totalmente dependiente de otro (el huésped), del cual obtendrá el alimento y el espacio vital, y por lo tanto dependerá metabólicamente de él; además le causará una serie de daños debidos a la ingestión, digestión o absorción de los tejidos, a el envenenamiento producido por deshechos metabólicos tóxicos, a el robo de nutrientes y a la acción mecánica (8).

Por otro lado, el huésped es un organismo que puede ser infectado por diferentes parásitos, los cuales van a lograr establecerse en él dependiendo de las diferentes condiciones ambientales, sociales y biológicas presentes para poder llevar a cabo una parte de su desarrollo ontogénico o completar su ciclo biológico.

En general las relaciones huésped - parásito suelen ser específicas, ya que el parásito se dice que ha sido capaz de adaptarse selectivamente a una especie o grupos de especies en los cuales será capaz de sobrevivir. Sin embargo, son pocas las especies de parásitos que tienen la capacidad de sobrevivir en una gran variedad de huéspedes, como *Trichinella spiralis* y *Toxoplasma gondii* (22,23).

Todas estas acciones implican una interacción dinámica, compleja y constante de dos organismos en un ambiente, lo que ha

permitido la existencia de la relación huésped - parásito a lo largo de la evolución.

MECANISMOS DE EVASION

La sobrevivencia y proliferación de los parásitos en el huésped han sido un tema de gran discusión, ya que una de las más intrigantes características de los parásitos es su capacidad de sobrevivencia durante diferentes periodos de tiempo en su huésped. Tal es el caso del cisticerco de *T. solium*, el cual logra sobrevivir hasta 25 años en su huésped (12), sin que el ser humano sufra daño aparente. Esto parece depender de su capacidad para modular la respuesta inmune del huésped por diferentes vías (24), figura 2. Precisamente como los parásitos logran evadir la respuesta inmune aún no esta muy claro, sin embargo existen teorías las cuales tratan de explicarlo:

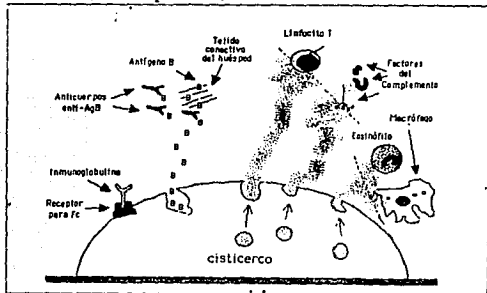


Figura 2. Posibles mecanismos de evasión.

--**ENMASCARAMIENTO**: en la superficie de algunos parásitos se han encontrado inmunoglobulinas del huésped, sin producir daño aparente, tal es el caso de *Onchocerca volvulus*, en la cual se ha demostrado la presencia de receptores para Fc por inmunofluorescencia (25), se han identificado también receptores para Fc de IgG en *S. mansoni* y en *Trypanosoma muscull* (26,27). Además se ha visto que ciertos parásitos son capaces de digerir inmunoglobulinas, como *Tetrahymena pyriformis* (28). En *Schistosoma mansoni* de ratón, se ha observado en su superficie, por medio de inmunofluorescencia la presencia de H-2 del huésped, alfa 2 macroglobulina y de ciertos componentes del complemento y antígenos de eritrocito (29,30,31). También se ha visto que *S. mansoni* presenta varios componentes antigénicos semejantes a los del caracol *Biophalaria glabrata*, por lo que este parásito puede penetrarlo y llevar a cabo una parte de ciclo de vida (32).

--**MIMETISMO**: el parásito es capaz de producir moléculas muy semejantes a las de su huésped y cubrirse con ellas. *Fasciola hepatica* es uno de los parásitos que presentan este mecanismo, ya que es capaz de producir antígenos de los grupos ABO (33).

--**VARIACION ANTIGENICA**: consiste en cambios de antígenos superficiales del parásito, de tal manera que cuando aparece la respuesta inmunológica del huésped contra ciertos antígenos, estos

ya desaparecieron, manteniendo de esta forma inmunológicamente activo al organismo. Tal es el caso de la tripanosomiasis africana, donde *T. brucei* tiene una codificación genética para más de 200 glicoproteínas de superficie (34). Este mecanismo también ha sido encontrado en *Leishmania mexicana* (35), en ciertos estadios de desarrollo de *Plasmodium* (36) y en *Streptococcus pyogenes* (37).

--**LIBERACION DE ANTIGENOS SOLUBLES:** se dice que un antígeno que se encuentra en alta concentración en el huésped puede provocar una tolerancia a éste, la cual puede ser revelada por la disminución en la respuesta humoral contra el antígeno y además puede combinarse con los anticuerpos específicos impidiendo que actúen en la superficie lisando a las células del parásito, como se ha demostrado en *T. brucei* (38); esto mismo ha sido propuesto en la cisticercosis causada por *T. solium* debido a la presencia de un antígeno inmunodominante, el antígeno B (39,20) y también en la infección causada por *Plasmodium* con su antígeno 5 (40).

--**MODULACION DE LA RESPUESTA CELULAR:** se ha visto que ciertos parásitos dirigen la activación o el modo de activación de la respuesta celular tal como sucede con *Leishmania*, cuando es endocitado por los macrófagos induce la activación de linfocitos cooperadores Th₂, propiciando con ello que la enfermedad se disemine. (41).

--INHIBICION DE LA ACCION DEL COMPLEMENTO: existen parásitos, los cuales pueden estar secretando factores que inhiben la acción del complemento y por lo tanto impiden que lise al parásito por cualquiera de sus dos vías. Tal es el caso de *O. cervicalis* de la cual se sabe que al incubar el extracto del parásito con suero de caballo, rata y humano normales inhibe la lisis causada por el complemento *in vitro* (42). También en modelos experimentales hechos con la larva de *T. taeniaeformis*, se observó que es capaz de generar productos que inhiben la cascada de la coagulación así como también la cascada del complemento (43,44). Por otro lado también se han encontrado componentes de la membrana de *T. cruzi* que modulan la activación del sistema del complemento (45).

V. SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El complemento, es un sistema biológico, que está constituido por 30 proteínas, las cuales se encuentran en el suero y en la superficie de membranas y van a interaccionar en una secuencia precisa, bajo la influencia de múltiples controles. Estas proteínas son sintetizadas en un 90% por el hígado, sin embargo, se ha visto que los monocitos, los macrófagos y los linfocitos poseen también esta capacidad. Dentro de este sistema existen dos vías interrelacionadas: la vía Clásica y la vía Alternativa, las cuales son activadas de diferente manera, ya que la vía clásica es capaz de reconocer complejos antígeno-anticuerpo (IgM e IgG) y la vía alternativa es activada por una gran variedad de agentes como polisacáridos bacterianos o vegetales, factor de veneno de cobra, etc., pero ambas convergen en una única vía terminal (46,47,48), figura 3.

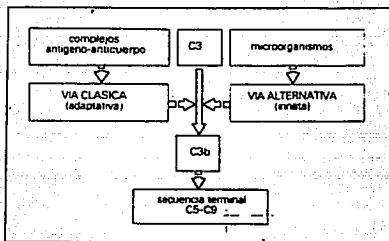


Figura 3. Tipos de activación de las vías del sistema del complemento. Ambas vías convergen al formar C3 convertasa y activar al complejo de ataque a la membrana.

Esta activación va a generar tres importantes funciones del complemento que son la deposición de moléculas sobre la superficie de las partículas generando así su opsonización, la producción de potentes mediadores de la respuesta inflamatoria y principalmente, daño a las membranas celulares provocando su muerte por lisis (47,49,50), figura 4.

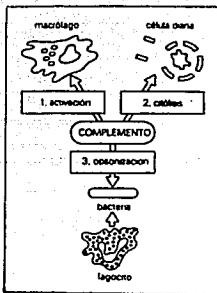


Figura 4. Las tres principales funciones del sistema del complemento: (1) activación del sistema inmune, (2) lisis celular y (3) opsonización.

A). - VIA CLASICA

Las proteínas que forman parte de esta vía son (figura 5):

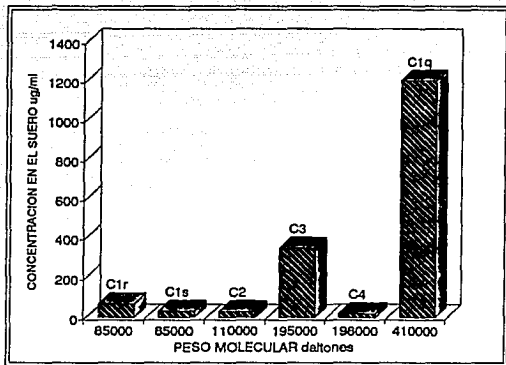


Figura 5. Proteínas de la vía clásica del complemento.

Estas proteínas han sido agrupadas en 3 grandes unidades funcionales:

- 1.- Unidad de reconocimiento formada por: C1q, C1r y C1s.
- 2.- Unidad de activación formada por: C2, C3 y C4.
- 3.- Sistema de ataque a la membrana: C5, C6, C7, C8 y C9

Esta vía es iniciada por la interacción del primer componente del complemento el C1 con los complejos antígeno-anticuerpo. En el hombre, la IgM y la IgG (con excepción de la subclase IgG4) son capaces de unirse a C1q mientras que la IgA, IgE e IgD carecen de esta habilidad. Además se ha visto que una sola molécula de IgM unida al antígeno es capaz de unirse a C1q y generar su activación; sin embargo, son necesarias al menos dos moléculas de IgG para poder activar C1 (46,47,51).

El C1 es un complejo molecular dependiente de calcio formado por tres subunidades conocidas como C1q, C1r y C1s.

El C1q, es una proteína lábil al calor, formada por 18 cadenas polipeptídicas, estas cadenas son de tres tipos: A, B y C (de acuerdo a su movilidad electroforética) y están presentes en cantidades equimoleculares, la interacción entre estas cadenas origina una estructura de triple hélice, con una región globular, por la cual C1q interacciona con el dominio CH₂ del anticuerpo, ya que éste reconoce los sitios expuestos después de que el anticuerpo se une al antígeno. La visualización por microscopía electrónica de C1q revela una estructura de 6 cabezas globulares conectadas por tiras fibrilares a una subunidad central, por lo que se pueden encontrar tres regiones distintas: una región amino terminal, una región central tipo colágena y una región carboxilo terminal (47,51) figura 6.

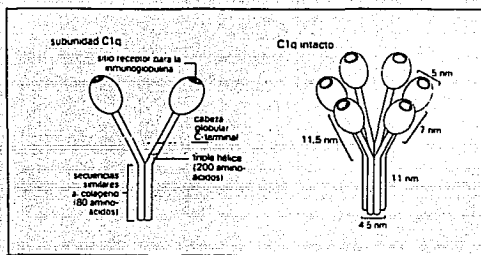


Figura 6. Estructura de C1q.

Esta proteína, como ya se mencionó anteriormente se encuentra en el suero asociada con otras dos subunidades que son C1r y C1s, que son formas proenzimáticas de proteasas formadas por una cadena polipeptídica cada una. Estas, en presencia de calcio, forman un tetrámero compuesto de dos moléculas de cada subcomponente (46,47,48) figura 7.

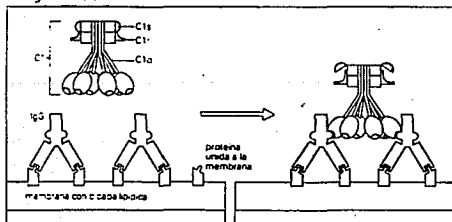


Figura 7. Unión de C1r y C1s a C1q en presencia de Ca^{++} a través de la región - tipo colágena.

Este complejo tetramolecular necesita interactuar con la región tipo colágena de la molécula C1q a través de C1r para ser activado y continuar la cascada del complemento (51).

La siguiente proteína es el C4, éste componente va a ser fragmentado por el C1s, liberando un pequeño péptido llamado C4a de 9000 daltons y otro fragmento llamado C4b, el cual se va a unir covalentemente a la membrana de la célula o partícula, pero si las moléculas no llegan a unirse a la membrana son destruidas en el medio debido a la pérdida del sitio activo (46,47), figura 8.

La tercera proteína participante es el C2 que al ser fragmentada por el C1s se rompe en dos cadenas llamadas C2a y C2b de 74 000 y 34 000 daltons, respectivamente, éste último es liberado al medio y C2a es capaz de unirse a C4b en presencia de Magnesio para formar la enzima llamada C3 convertasa (C4b2a); (47), figura 8.

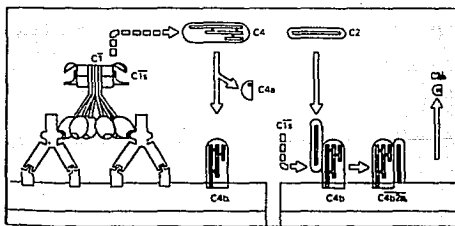


Figura 8. Activación de las proteínas C4 y C2 a través de C1s, para la formación de la C3 convertasa.

La proteína C3 está compuesta de dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro. El rompimiento de C3 por la enzima C3 convertasa origina un fragmento pequeño llamado C3a y un fragmento mayor, C3b, el cual tiene la habilidad de unirse a las membranas celulares. La unión de C3b al complejo C4b2a, cambia la especificidad del sitio enzimático de C2a, esta nueva enzima generada C4b2a3b se denomina C5 convertasa la cual es ahora capaz de actuar con el componente C5 (46,47,52), figuras 9 y 10.

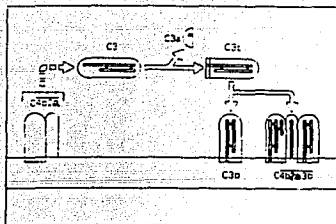


Figura 9. Formación de la C5 convertasa de la vía clásica, la cual activará al MAC.

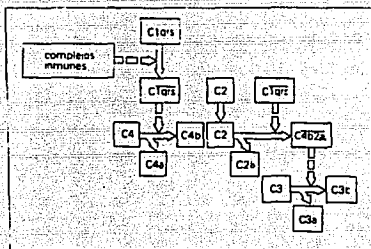


Figura 10. Resumen de la activación de la vía clásica.

B).- VIA ALTERNA

La activación de la vía alterna del complemento representa un medio natural de resistencia a agentes infecciosos, porque es capaz de neutralizar una gran variedad de agentes patógenos potenciales en ausencia total de anticuerpos. Esta vía, puede ser activada por polisacáridos bacterianos, hongos, plantas, lipopolisacáridos, virus, células infectadas por virus, células tumorales, parásitos multicelulares y eritrocitos de ciertas especies de mamíferos como ratones y conejos (48,53).

Esta vía está constituida por 6 proteínas del plasma, figura 11, y funcionalmente esta dividida en dos fases:

- 1.- Iniciación: en la cual la partícula unida C3b es la base del reconocimiento.
- 2.- Amplificación: en la cual se forma un circuito positivo dependiente de C3b, figura 12.

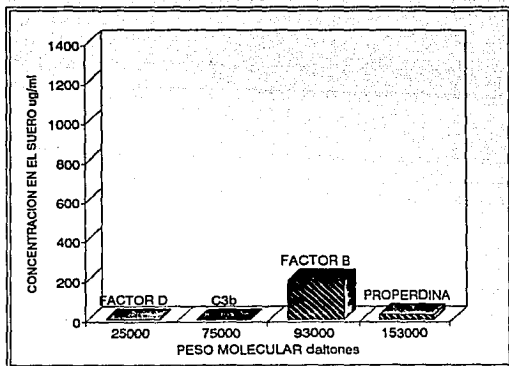


Figura 11. Proteínas de la vía alterna del complemento.

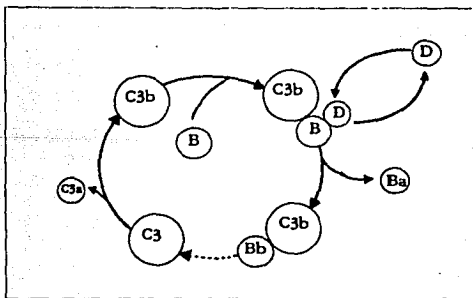


Figura 12. Amplificación de la vía alterna.

El rompimiento efectivo de C3 por la vía alterna depende de la fase de amplificación y de las reacciones moleculares involucradas en su formación, función y regulación, por lo que esto determinará si esta vía responde o no a un agente particular.

Esta vía es iniciada cuando el Factor B en presencia de magnesio, forma un complejo bimolecular estable con C3b generando C3bB el cual aún no tiene actividad enzimática; este complejo llega a ser susceptible cuando el Factor B es fragmentado por el Factor D, este va a generar la liberación de dos fragmentos uno pequeño no funcional, Ba, de 30 000 daltones y uno largo Bb de 63 000 daltones, el cual posee un sitio activo por medio del cual es capaz de unirse a C3b formando así la enzima C3 convertasa (C3bBb), que en primera instancia es una proteína inestable; por lo que la Properdina nativa (nP) se le puede unir y de esta manera darle estabilidad y extender su tiempo de vida media para de esta manera continuar la vía a través de C3bBbnP; además como el Factor D se encuentra siempre en forma activa en el suero, va a generar una continua formación de C3 convertasa, pero en bajos niveles. Sin embargo, las pocas moléculas de C3b producidas por la acción de la C3 convertasa sobre C3 son capaces de unirse a más Factores B y D originando nuevamente la formación del complejo C3bBb el cual va a poder fragmentar más C3; es decir se produce una amplificación de la C3 convertasa. Esta retroalimentación positiva no existe en la vía clásica, sin embargo, este sistema utiliza el producto C3b de la reacción enzima - sustrato para generar una enzima adicional

C3bBb constituye la fuerza motora de la vía alterna. Por otro lado, como la fase de amplificación es continua, la C3bBbNP se une a una molécula de C3b generando así el complejo C3bBb3b llamado C5 convertasa, a la cual también se le une nP para darle mayor estabilidad. Esta convertasa es capaz de fragmentar C5 generando así C5a y C5b y por lo tanto provoca la activación del MAC (C5-9) (46,47,48,52,53) figura 13.

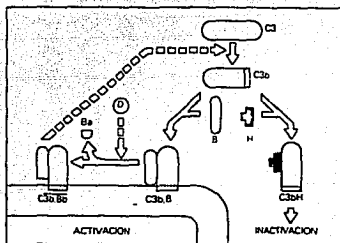


Figura 13. Mecanismo de activación de la vía alterna.

C).- COMPLEJO DE ATAQUE A LA MEMBRANA

Este complejo está contituido por 6 proteínas, (figura

14:

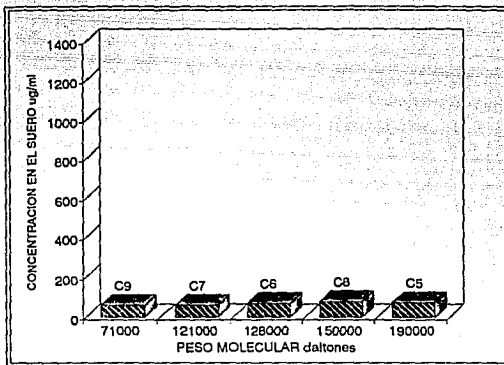


Figura 14. Proteínas del complejo de ataque a la membrana, (MAC).

El complejo de ataque a la membrana (MAC) se inserta en la bicapa lipídica de las células produciendo canales hidrofílicos transmembranales, los cuales permiten el paso de pequeñas moléculas y iones, pero retiene macromoléculas citoplásmicas, lo que provoca el «Efecto Donnan» que es la entrada de agua a la célula a través de los canales causándole hinchamiento y posteriormente lisis (47).

Este complejo es iniciado por la activación de C5, debido a la acción de la C5 convertasa tanto de la vía Clásica como de la vía Alternativa, las cuales rompen de igual manera la cadena de C5 generando dos cadenas: C5a y C5b. El C5a es una potente anafilotoxina y es probablemente el más potente activador y quimioatrayente de neutrófilos derivados de la activación del complemento, figura 15.

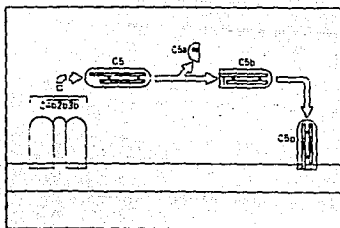


Figura 15. Iniciación de la activación del MAC a través de la C5 convertasa.

El C5b es el iniciador del MAC. Este componente presenta una alta afinidad hacia las membranas celulares y es capaz de depositarse sobre la superficie de las células blanco; esta molécula sufre una serie de cambios conformacionales por lo que es capaz de exponer sitios de unión lábiles hidrofóbicos y así unirse por medio de enlaces no covalentes a la superficie celular. Este

C5b es capaz de unirse a C6 y formar un complejo estructural y funcionalmente estable denominado C5b6 el cual tiene la capacidad de unirse a células no sensibilizadas. La unión de estas proteínas no es enzimática, sino se debe a una interacción hidrofóbica. La siguiente proteína que se une a este complejo es el C7, el cual presenta una alta afinidad por C5b6 tanto en la fase de fluido como en la asociación con células; este complejo trimolecular se inserta en la bicapa lipídica debido a que sufre ciertos cambios conformacionales, los que generan la exposición de los dominios hidrofóbicos; el tiempo de vida media de este complejo es de 0.1 seg por lo que los complejos que no interaccionan inmediatamente con la membrana de la célula blanco decaen irreversiblemente a una fase inactiva de fluido. La siguiente proteína que se une a este complejo es el C8 el cual se inserta dentro de la bicapa lipídica y genera una lesión con la cual se inicia la entrada y salida de algunos solutos de la célula ya que esta proteína forma un canal transmembranal; este canal posteriormente aumenta de tamaño cuando la proteína C9 se une a este complejo, ya que se sabe que son alrededor de 6 a 18 C9 los que se pueden unir, estos forman un canal de aproximadamente 100 Å de diámetro generando una lesión mayor a la membrana (46,47,50,54), figura 16.

D).- PROTEINAS REGULADORAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

La activación del complemento es controlada por la labilidad de los sitios enzimáticos producidos en las diferentes etapas de la reacción de este sistema por medio de varias proteínas séricas que modulan y limitan la activación del sistema del complemento. Estas proteínas se fijan a los componentes o atacan enzimáticamente sólo a las formas activas del sistema, figura 17.

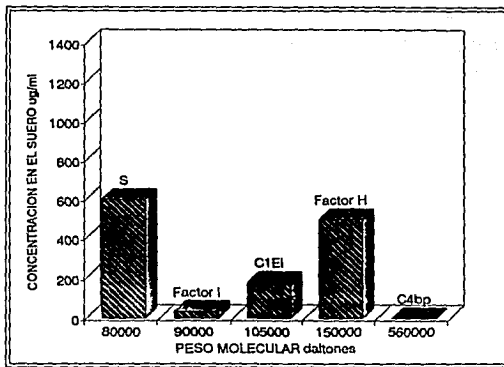


Figura 17. Proteinas reguladoras del sistema del complemento.

El inactivador de C1 bloquea la actividad enzimática del C1s mediante la formación de un complejo estequiométrico irreversible.

Esta proteína se une rápida, firme e irreversiblemente a las formas activadas de C1r y C1s, disociando estas unidades de C1q (47), figura 18.

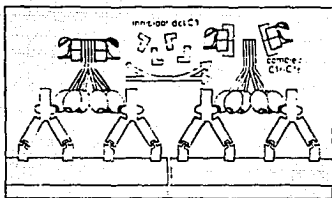


Figura 18. Inactivación de C1q por unión del inhibidor de C1 al C1r y C1s.

Otra proteína reguladora es el inactivador de C3b o Factor I, el cual ataca al C3b libre en solución o sobre la superficie de las células y fragmenta a la molécula en varios segmentos impidiendo de esta manera la formación de C4b2a3b o C3bBb. Otro factor regulador de la vía alterna es el Factor H el cual bloquea el acceso del Factor B para unirse a C3b, así como también disocia a Bb del complejo C3bBb y finalmente modula el ataque del Factor I al C3b (47,50), figura 19.

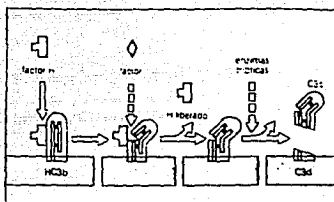


Figura 19. Fragmentación de C3b por el Factor I.

En el suero también se ha encontrado una enzima capaz de inactivar los efectos biológicos de C3a y C5a, ya que la enzima actúa rompiendo la arginina presente en la porción carboxilo terminal de cada una de estas moléculas. Esta proteína se ha denominado Inactivador de la anafilotoxina.

Otra proteína inactivadora es la llamada proteína S que modula la capacidad del complejo C5b67 de fijarse a las membranas, es decir, evita que el complejo se libere de una célula y se adhiera a otra (50).

**E).- CONSECUENCIAS BIOLÓGICAS DE LA ACTIVACION DEL
COMPLEMENTO**

Como resultado de la activación del complemento por sus dos vías se genera, como ya se mencionó anteriormente la lisis de células, parásitos, etc., para controlar la infección, sin embargo, el complemento es capaz de generar la activación de otros productos o elementos, ya que numerosos tipos celulares presentan receptores capaces de interactuar con fragmentos de componentes del complemento, generando diferentes procesos de activación y diferentes respuestas celulares, tales como inflamación y opsonización, figura 20.

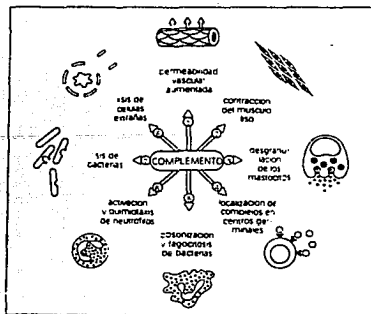


Figura 20. Acciones del complemento que intervienen en la defensa del huésped.

Como ya se indicó, durante la activación del complemento, se generan varios fragmentos, los cuales son de gran importancia biológica, tal es el caso de C3a y C4a que son anafilotoxinas que inducen contracción del músculo liso, aumento en la permeabilidad vascular y causan degranulación de basófilos, con liberación de histamina y sustancias vasoactivas. Además existen receptores C3a en la superficie de eosinófilos, neutrófilos, basófilos y monocitos, los cuales están involucrados directamente con los efectos inflamatorios (55).

El C5a difiere un poco de C3a y C4a. Este fragmento genera la liberación de histamina y una respuesta espasmogénica en el músculo liso, además es un fuerte quimiotáctico para las células fagocíticas, basófilos, neutrófilos y eosinófilos, incrementa la adhesividad de los neutrófilos y estimula la producción de interleucina 1 por macrófagos. Por último, el Factor Ba induce quimiotaxis de leucocitos polimorfonucleares (46,55).

Otros componentes o fragmentos del complemento permanecen firmemente unidos al sitio de activación, generando interacciones mediadas por receptores, los cuales tienen papeles prominentes en los procesos de opsonización y citotoxicidad celular.

Son los receptores los que están involucrados con el aumento de la fagocitosis; ya que estos se encuentran en una gran variedad de células y su interacción con los diferentes componentes del complemento genera eventos responsables, en parte, de la regulación de la respuesta inmune. Sus principales funciones son el

reconocimiento de ligandos, la transducción de señales dentro de las células y la inducción de respuestas celulares tales como la fagocitosis. En la actualidad se conocen 5 receptores que son CR1, CR2, CR3, C5a, C3a; los cuales se encuentran en diferentes tipos celulares generando diferentes funciones (47,50,56) tabla 1.

TABLA 1. RECEPTORES DE C3b.

RECEPTOR	OTROS NOMBRES	LIGANDOS	DISTRIBUCION EN EL TEJIDO Y/O CELULAS
CR1	RECEPTOR C3b RECEPTOR DE ADHERENCIA INMUNE	C3b, C4b, iC3b E iC3	ERITROCITOS, GRANULOCITOS, FAGOCITOS MONONUCLEARES, LINFOCITOS B, PLAQUETAS.
CR2	RECEPTOR C3d	C3d, C3d-g, iC3b	LINFOCITOS B, FAGOCITOS MONONUCLEARES
CR3	RECEPTOR iC3b	iC3b, iC3d-g	GRANULOCITOS, FAGOCITOS MONONUCLEARES Y CELULAS NK

VI. JUSTIFICACION

El éxito de la sobrevivencia del cisticerco como parásito del ser humano y del cerdo parece deberse a su capacidad para evadir el reconocimiento y/o evitar su destrucción por los diferentes mecanismos de defensa del huésped. Uno de estos mecanismos es el del sistema del complemento el cual genera daño a las membranas del parásito desestabilizando y provocando así la muerte de éste.

Pero por alguna razón el cisticerco se encuentra bloqueando la acción de este sistema. Por lo anterior el presente trabajo está encaminado a tratar de demostrar la capacidad que presenta el cisticerco para modular la activación del complemento, para así poder proponer acciones que puedan incidir o interrumpir de alguna forma del ciclo vital del parásito.

VII. HIPOTESIS

Si el cisticerco de *Taenia solium* es capaz de sobrevivir durante periodos muy prolongados dentro de su huésped sin sufrir daño alguno, aun habiendo componentes del sistema del complemento en el suero capaces de activarse y causar lisis al parásito, es posible que éste se encuentre secretando algún factor o factores capaces de inhibir la acción del complemento.

VIII. OBJETIVO

Estudiar el efecto del extracto crudo y los productos de excreción - secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre el Sistema del Complemento in vitro.

IX. MATERIAL Y METODOS

--OBTENCION DE ERITROCITOS DE CARNERO.

Se sangró un carnero una vez por mes al cual se le extrajeron 20 ml de sangre. La sangre fué colocada en un volúmen igual de solución Alsever (0.07M de NaCl, 0.02 M de citrato de Na y 0.002M de ácido cítrico) estéril. Inmediatamente después se guardó en refrigeración a 4°C durante siete días, ya que después de este periodo, la susceptibilidad de los eritrocitos a la lisis por el anticuerpo y el complemento permanece uniforme (57).

--OBTENCION DE HEMOLISINA.

La hemolisina son anticuerpos capaces de producir lisis de eritrocitos en presencia de complemento.

Se tomaron 8 ml de eritrocitos de carnero en solución Alsever y se centrifugaron durante 10 min a 1500 rpm. Posteriormente se les agregó 1 ml de agua destilada para lizarlos y esta solución se centrifugó nuevamente, deshechándose el sobrenadante. Inmediatamente después se les hicieron 3 lavados con solución salina al 0.75% y al botón se le agregó 1 ml de la misma solución la cual finalmente fué inyectada al conejo.

a.- INMUNIZACION

Con la suspensión anteriormente preparada se inmunizó un conejo al cual previamente se le habían extraído 5 ml de sangre, la inmunización fue vía intravenosa por la vena marginal externa. Al tercer día de haberse inmunizado, se inyectó nuevamente 1 ml de eritrocitos preparados como anteriormente se explicó. A los seis días de haberse inmunizado por vez primera al conejo, se le tomó una muestra de sangre para ver si se encontraba inmunizado realizándole la técnica de aglutinación; como sí hubo aglutinación, al día 7 se le practicó una punción cardiaca y la sangre obtenida se dejó coagular 20 min a 37°C; posteriormente se removió el coágulo con la ayuda de un aplicador y se dejó 10 min a 37°C, inmediatamente después el suero se extrajo, fué colocado en otros tubos limpios, se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm y fué colocado en otros tubos para descomplementarse colocándose a 56°C, en baño María, durante 30 min. Finalmente se fraccionó y se guardó a -70°C hasta su uso.

--OBTENCION DEL COMPLEMENTO.

A tres cobayos se les practicó una punción cardiaca, obteniéndose de 5 a 8 ml de sangre por cobayo. La sangre se dejó coagular durante 15 min a temperatura ambiente e inmediatamente después se separó el coágulo y se dejó 5 min a temperatura

ambiente, luego se extrajo el suero se colocó en otros tubos y se centrifugó durante 10 min a 1500 rpm a 4°C, después se fraccionó y se guardó a -70°C hasta su uso.

--ESTANDARIZACION DE ERITROCITOS.

Estandarización volumétrica

Se tomaron 8 ml de sangre de carnero en solución Alsever y se centrifugó a 1500 rpm (revoluciones por minuto), durante 10 minutos (min) para separar los eritrocitos de la solución; posteriormente se retiró el sobrenadante cuidadosamente y se lavaron los eritrocitos resuspendiéndose en 5 ml de NaCl 0.12M amortiguado con trietanolamina 0.01M, pH 7.4 (TBS), centrifugándose a 1500 rpm durante 10 min. Este paso se repitió 4 veces. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se agregó a las células 10 ml de TBS; se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min y nuevamente se removió el sobrenadante; enseguida se hicieron 2 lavados más como en la primera ocasión, y después de esta centrifugación los eritrocitos se resuspendieron en 10 ml de TBS, se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 min y se hizo una suspensión a una concentración del 1% (aproximadamente 2×10^6 células por mililitro) agregando 1 ml de eritrocitos a 99 ml de TBS.

Estandarización fotométrica

A tres tubos se les agregaron 4 ml de agua destilada y un mililitro de la solución estandarizada volumétricamente de

eritrocitos al 1%, se mezcló cada uno y en seguida se leyeron en un espectrofotómetro Beckman DU-5 a una longitud de onda de 530 nm frente a un blanco de agua destilada. La solución estandarizada debía dar lecturas de 0.300 ± 0.005 para corresponder a una solución de células rojas al 1%. Si las lecturas obtenidas eran mayores de 0.300 se ajustaba el volumen de la solución aplicando la siguiente fórmula:

$$V_f = V_i (O.D./0.300)$$

donde V_f es el volumen final, V_i es el volumen inicial (100 ml) y O.D. es la densidad óptica (promedio de las tres muestras), agregando la cantidad restante del volumen final, pero si daban lecturas menores de 0.300, la solución se recentrifugaba y se iniciaba todo el procedimiento de nuevo (57).

--PREPARACIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DEL CISTICERCO.

Se preparó el extracto crudo de acuerdo a la técnica previamente establecida por Espinoza, y cols. (58): se pesaron 19 gr de cisticercos (sin cápsula) obtenidos a partir de carne de cerdo infectada, los cuales fueron lavados tres veces en TBS. Enseguida se les hicieron 2 lavados rápidos con agua destilada e inmediatamente después se maceraron durante 10 min a temperatura ambiente y se congelaron durante 15 min, enseguida se descongelaron y se volvieron a macerar. Esto se realizó 5 veces; inmediatamente después se les agregaron 2.0 ml de agua bidestilada por gramo de cisticercos y se dejaron agitando 2 hrs a 4°C. Se les agregaron

3.8 ml de TBS 10X y se ultracentrifugaron (Beckman L8-80) a 30 000 rpm a 4°C durante 1 hr; el sobrenadante se colocó en otros tubos y se guardó a 4°C y el precipitado se resuspendió en TBS 1X. Este se sonicó en dos ocasiones a 7 hz durante 1 min y posteriormente se ultracentrifugó como anteriormente se mencionó; se obtuvo el sobrenadante, se juntó con el sobrenadante de la primera centrifugación, se fraccionó y las fracciones se guardaron a -70°C hasta su uso. Se les determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (59) y fué analizado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 11% (60).

-- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO SIN ANTIGENO B

El antígeno B se eliminó del extracto crudo de acuerdo a la técnica descrita por Laclette y cols. (61), empleando un soporte de colágena. Se pesaron 10 gr de cisticercos extraídos de músculo de cerdo, se mezclaron en 30 ml de TBS y se centrifugaron a 35 000 rpm durante 15 min, se recuperó el sobrenadante y se incubó con la colágena sólida de tendón de bovino durante 90 min en agitación a temperatura ambiente. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 2500 rpm durante 10 min y se concentró por medio de ultrafiltración con membranas de poro que permiten el paso de moléculas de peso molecular menor a 5000. La colágena se lavó 4 veces con PBS por centrifugación. y se incubó con 30 ml de PBS (NaCl 0.5 M) durante 15 min en agitación a temperatura ambiente, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante; la colágena se incubó

nuevamente con 20 ml de PBS (ácido acético 0.1 M) durante 15 min en agitación. Estos dos últimos sobrenadantes se juntaron (S1) y también se concentraron. Finalmente los sobrenadantes se dializaron contra TBS toda la noche, se les determinó la concentración de proteína (58) y se conservaron en alícuotas a -70°C.

-- OBTENCION DE PRODUCTOS DE EXCRECION - SECRECION

Se extrajeron cisticercos enteros de la carne parasitada de cerdo los cuales fueron colocados en una solución salina (0.15 M NaCl) amortiguada con fosfatos 0,015 M, pH 7.4 (PBS). Posteriormente se trabajaron en una campana de flujo laminar (Veeco), en donde se les hicieron 5 lavados intercalados de 5 min con PBS estéril y PBS con antibióticos (200 U/ml penicilina y 300 µg estreptomina); enseguida se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos (Costar) colocando de 10 a 15 cisticercos por pozo; posteriormente se les agregó 1 ml de medio de cultivo DMEM (Gibco) suplementado con antibióticos, y se dejaron en cultivo 18 hr a 37°C. Después de este tiempo se extrajeron los sobrenadantes, de los cuales algunos fueron utilizados inmediatamente y los demás fueron fraccionados y guardados a -70°C hasta su uso. Los cisticercos se mantuvieron en cultivo durante 2 días obteniendo sus sobrenadantes aproximadamente cada 18 hrs. A los sobrenadantes se les determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford y también fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 11%.

Otra parte de los cisticercos fueron lavados en dos ocasiones con PBS y se colocaron en bilis bovina al 25% en PBS a 37°C y en agitación continua durante una hora. Después se observaron en el microscópio y se contó el porcentaje de cisticercos evaginados. Como parásitos evaginados solo se considera aquellos que, además de estar fuera de la vejiga parasitaria mueven activamente el cuello y el escólex.

ENSAYO HEMOLITICO

La relación que existe en un ensayo hemolítico entre la cantidad de complemento ó hemolisina (dependiendo de que se esté titulando) y la proporción de células rojas lisadas, no es lineal, sino que presenta un comportamiento sigmoidal como se muestra en la figura 21. Sin embargo, en la región central de la curva existe una parte lineal, en la cual el grado de lisis es sensible a cambios pequeños en la cantidad de complemento agregado, por lo que se tiene una alta precisión en la titulación de los sueros pudiendo conocer de esta manera la cantidad de suero requerida para producir un 50% de lisis (1 unidad) (62).

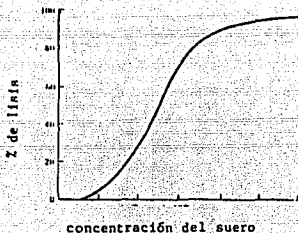


Figura 21. Relación entre la concentración de suero y el porcentaje de lisis de eritrocitos.

--TITULACION DE HEMOLISINA.

Titulación Preliminar

El volúmen total de la reacción en los experimentos fué de 5 ml (1 ml del suero que fué titulado, 2.0 ml de eritrocitos y 2.0 ml de complemento).

Se colocaron 2.0 ml de la suspensión estandarizada de eritrocitos de carnero al 1% con 1 ml de cada una de las diluciones de hemolisina hechas en TBS que fueron 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000; se mezclaron y se dejaron incubar durante 10 min a

temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 2.0 ml de una dilución 1:200 de complemento en TBS, se incubaron 30 min en baño María a 37°C, y se agitaron continuamente. Inmediatamente después se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min; los sobrenadantes se pasaron a otros tubos y se leyeron a 530 nm utilizando como blanco el tubo núm. 6 el cual contenía complemento y eritrocitos en TBS y como testigo se colocó otro tubo sólo con Hemolisina y eritrocitos en TBS (tabla 2). Estos experimentos fueron llevados a cabo 3 veces. Finalmente los datos fueron promediados y se les realizó una regresión lineal extrapolándose el valor de 0.300 para obtener el título de hemolisina de una unidad donde se obtiene el 50% de lisis.

TABLA 2. Titulación preliminar de Hemolisina.

TUBO	ERITROCITOS 1% (ml)	HEMOLISINA (1.0 ml)	COMPLEMENTO 1:200 (ml)	TBS (ml)
1	2.0	1:10	2.0	
2	2.0	1:100	2.0	
3	2.0	1:1000	2.0	
4	2.0	1:10000	2.0	
5	2.0	1:100		2.0
6	2.0		2.0	1.0
7	2.0			3.0

Titulación Final

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se realizó una titulación más fina de estos anticuerpos, llevando a cabo la misma metodología, pero con las siguientes series de diluciones: 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000, 1:7000, 1:8000., utilizando como blanco un tubo con eritrocitos, complemento y TBS. Los experimentos fueron realizados tres veces, los resultados fueron promediados y se les realizó también una regresión lineal para conocer el título de la hemolisina donde se tiene una unidad 50%.

--TITULACION DEL COMPLEMENTO

Una vez obtenido el título de la Hemolisina, se procedió a obtener el del complemento. Se colocaron 2.0 ml de la suspensión estandarizada de eritrocitos al 1% y se incubaron con 2 unidades de la hemolisina previamente titulada (1:2250) en TBS durante 10 min a temperatura ambiente, en seguida se les agregó 1.0 ml de las diluciones de complemento (1:100 a 1:800) en TBS y se incubaron 30 min a 37°C en baño María, enseguida se centrifugaron 10 min a 1500 rpm e inmediatamente después los sobrenadantes se colocaron en otros tubos y se leyeron en un espectrofotómetro a 530 nm frente a un blanco con eritrocitos, hemolisina y TBS; estos experimentos se realizaron en tres ocasiones, fueron promediados, se les realizó

una regresión lineal y finalmente fueron graficados.

--EXPERIMENTOS DE INHIBICION DEL COMPLEMENTO CON EDTA

Se probaron 4 diferentes concentraciones de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); para probar la inhibición del complemento, por lo que se incubaron cada una de las 5 diluciones del complemento (1:100, 200, 300, 400 y 500) con 4 diferentes concentraciones de EDTA (0.04M, 0.02M, 0.01M y 0.005M) durante 30 min en baño María a 37°C e inmediatamente después se les agregaron 2.0 ml de la suspensión de eritrocitos al 1% previamente sensibilizados con 2 unidades (2.0 ml) de hemolisina como anteriormente se mencionó y se incubaron durante 30 min en baño María a 37°C. Los tubos se centrifugaron 10 min a 1500 rpm y los sobrenadantes se colocaron en otros tubos y fueron leídos en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm frente a un blanco con eritrocitos, complemento y TBS. Los datos fueron graficados.

DISEÑO EXPERIMENTAL

--EXPERIMENTOS CON EL EXTRACTO CRUDO DEL CISTICERCO.

Se incubaron tres diferentes concentraciones de extracto crudo (5, 50 y 500 $\mu\text{g/ml}$) con las diluciones de complemento (1:100 a 1:500) en un volumen total de 1 ml en TBS durante 30 min a 37°C en baño María, posteriormente se les agregaron 2.0 ml de la suspensión de eritrocitos al 1%, previamente sensibilizados con 2 unidades de hemolisina y se incubaron 30 min en baño María a 37°C. Después se centrifugaron 10 min a 1500 rpm; los sobrenadantes obtenidos se colocaron en otros tubos y se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm utilizando como blanco un tubo con eritrocitos, hemolisina y TBS. Estos experimentos se realizaron en tres ocasiones y los resultados obtenidos fueron promediados y graficados.

--EXPERIMENTOS CON EL EXTRACTO CRUDO SIN ANTIGENO B

Se incubaron tres diferentes cantidades de extracto crudo sin antígeno B (5, 50 y 500 μl), con las cinco diluciones de complemento y el experimento se realizó de la misma manera que el experimento anterior. En este experimento se prepararon tres controles más, que fueron hechos con la dilución 1:100 de

complemento y con 5, 50 y 500 μ l del S1 (antígeno B). Los experimentos se realizaron en dos ocasiones, fueron promediados y graficados.

--EXPERIMENTOS CON LOS PRODUCTOS DE EXCRECION-SECRECION FRESCOS DEL CISTICERCO.

Se incubaron tres diferentes cantidades de sobrenadantes frescos (5, 50 y 500 μ l) con cinco diluciones de complemento (1:100 a 1:500) en 1ml en TBS durante 30 min a 37°C en baño María. Posteriormente se les agregaron 2.0 ml de la suspensión estandarizada de eritrocitos al 1% previamente sensibilizados con hemolisina (en TBS) y se incubaron 30 min a 37°C en baño María, inmediatamente después se centrifugaron y los sobrenadantes fueron colocados en otros tubos y se leyeron en un espectrofotómetro a 530 nm frente a un blanco con hemolisina y eritrocitos. Estos experimentos se realizaron en tres ocasiones y los resultados obtenidos fueron promediados y graficados. Estos experimentos se realizaron con sobrenadantes frescos del primer y segundo día de cultivo.

**--EXPERIMENTOS CON LOS PRODUCTOS DE EXCRECION-SECRECION
CONGELADOS.**

Se incubaron tres diferentes concentraciones de sobrenadantes congelados (5, 50 y 500 ug/ml) con cinco diluciones de complemento (1:100 a 1:500) en un volúmen total de 1 ml en TBS y se llevó acabo la misma metodología que en el experimento anterior. Los experimentos se realizaron en tres ocasiones y al final los datos también fueron promediados y graficados.

X. RESULTADOS

En la figura 22, se muestra la titulación preliminar de hemolisina, en donde se observa que el título que presenta una absorbancia de 0.300 nm, se encuentra entre las diluciones de 1:3000 y 1:5000 (tabla 3). Por lo anterior el intervalo de diluciones de hemolisina utilizado en la titulación final fué de 1:1000 a 1:8000. Los resultados obtenidos de los tres experimentos se promediaron (tabla 4); y se les realizó una regresión lineal (figura 23). Obteniéndose que en la dilución 1:4500 se tiene una absorbancia de 0.300 nm (1 unidad \approx 50% de lisis). Por lo que en los experimentos posteriores se utilizó a una dilución 1:2250 (2 unidades \approx 100% de lisis).

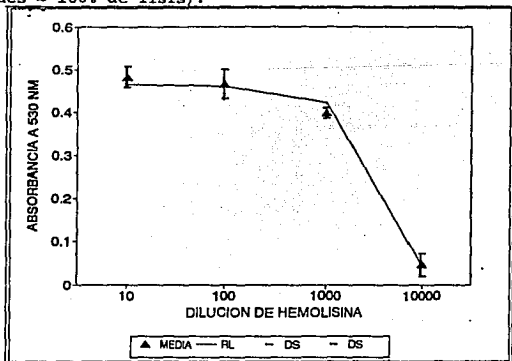


Figura 22. Titulación preliminar de hemolisina.

TABLA 3. TITULACION PRELIMINAR DE HEMOLISINA

DILUCION HEMOLISINA	EXPERIMENTOS			X MEDIA	DS DESVIACION ESTANDAR
	1	2	3		
1:10	0.493	0.499	0.455	0.4823	0.0238
1:100	0.478	0.492	0.427	0.4656	0.0342
1:1000	0.391	0.391	0.412	0.3980	0.0121
1:10000	0.076	0.027	0.035	0.0460	0.0262

TABLA 4. TITULACION FINAL DE HEMOLISINA.

DILUCION HEMOLISINA	EXPERIMENTOS			X MEDIA	DS DESVIACION ESTANDAR
	1	2	3		
1:100	0.520	0.530	0.540	0.5300	0.0100
1:1000	0.480	0.510	0.520	0.5033	0.0208
1:2000	0.460	0.430	0.415	0.4350	0.0229
1:3000	0.360	0.395	0.360	0.3716	0.0202
1:4000	0.235	0.365	0.320	0.3066	0.0660
1:5000	0.185	0.325	0.250	0.2533	0.0700
1:6000	0.165	0.280	0.245	0.2300	0.0589
1:7000	0.082	0.245	0.020	0.1756	0.0841
1:8000	0.034	0.020	0.150	0.1280	0.0851

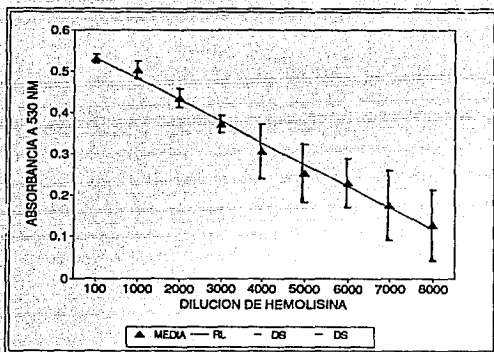


Figura 23. Titulación final de hemolisina.

En la titulación del complemento, los resultados de los experimentos fueron promediados; y también se les realizó una regresión lineal, de la cual se obtuvo un título de complemento de 1:400, (1 unidad \approx 50% ; abs = 0.300 nm) (figura 24); por lo que en los ensayos hemolíticos fué utilizado a una dilución 1:200 (2 unidades) con dos diluciones más bajas y dos más altas (1:100 a 1:500).

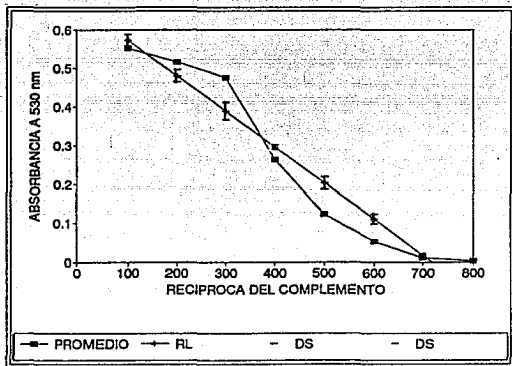


Figura 24. Curva de titulación del complemento.

En los experimentos de inhibición del complemento se observó que con las 4 diferentes concentraciones utilizadas de EDTA la acción del complemento fué inhibida en un 100%; al compararlo con la curva del complemento incubado con TBS, (figura 25).

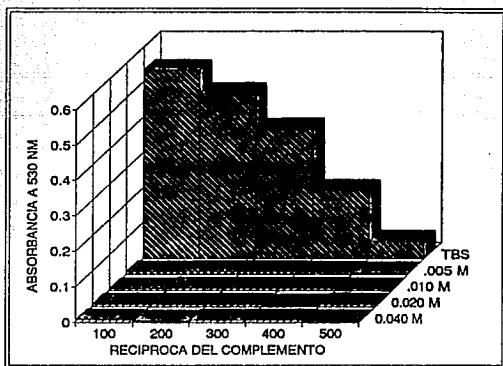


Figura 25. Efecto de cuatro concentraciones de EDTA, sobre el sistema del complemento.

La figura 26, muestra el patrón de bandeado de los productos de excreción - secreción congelados y frescos, y, del extracto crudo del cisticerco de *Taenia solium*, con los que se realizaron los experimentos.

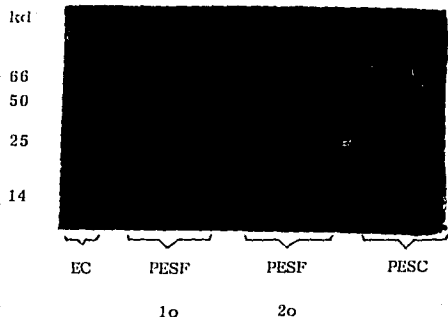


Figura 26. Electroforesis en un gel de poliacrilamida al 11% de los productos de excreción - secreción congelados (PESC) y frescos del primer (PESF 1o) y segundo (PESF 2o) día de cultivo, y, del extracto crudo (EC) del cisticerco de *Taenia solium*.

En la figura 27, se presenta el efecto del extracto crudo del cisticerco sobre el complemento; donde se observó una inhibición de un 76% de la lisis causada por el complemento con la concentración más alta, que fué de 500 $\mu\text{g/ml}$, con respecto a la curva patrón de TBS con complemento. En contraste, con las concentraciones de 5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo un 7% y un 11% de inhibición, respectivamente.

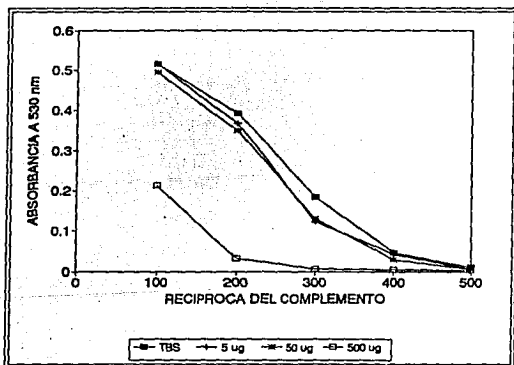


Figura 27. Efecto del extracto crudo del cisticerco de *Taenia solium* sobre el sistema del complemento.

Los resultados de los experimentos hechos con el extracto crudo sin antígeno B, mostraron un 81% de inhibición de lisis de eritrocitos, con la concentración más alta, que fué de 826 $\mu\text{g/ml}$, y de un 10% y 13% con 8.26 y 82.6 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, figura 28.

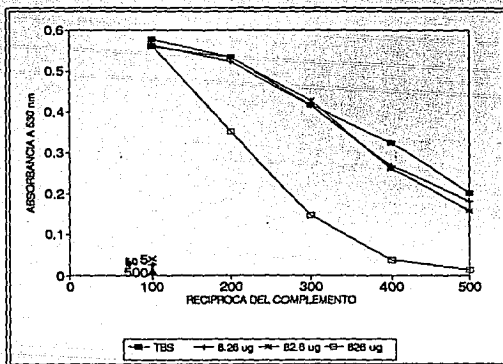


Figura 28. Efecto del extracto sin antígeno B sobre el complemento. Las 3 señales que se muestran en la dilución 1:100 corresponden a 3 cantidades de antígeno B semipuro (5,50 y 500 μl).

En la figura 29 se muestra el extracto crudo sin antígeno B y el antígeno B purificado con los cuales se realizaron los experimentos de la figura 28.

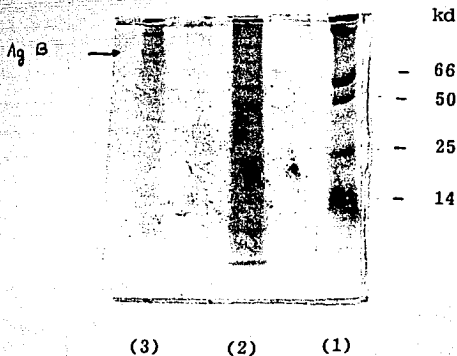


Figura 29. Electroforesis de un gel de poliacrilamida al 11%, donde se muestra en el carril (1) el estándar de pesos moleculares, (2) extracto crudo y (3) antígeno B.

Las figuras 30 y 31 corresponden a los experimentos hechos con sobrenadantes frescos del primero y segundo día de cultivo de los parásitos respectivamente. En la figura 30 se observa nuevamente

que con la concentración más alta de sobrenadantes frescos que fué en promedio de 265 $\mu\text{g/ml}$, se obtuvo un 27% de inhibición con respecto a la curva de TBS y complemento. Con las concentraciones de 2.65 y 26.5 $\mu\text{g/ml}$, los porcentajes de inhibición fueron de 5% y 8% respectivamente. En la figura 31 se observa que de los sobrenadantes frescos del segundo día de cultivo, con la concentración más alta de sobrenadantes que fué de 601 $\mu\text{g/ml}$ hubo un 41% de inhibición; y con las concentraciones de 6.01 y 60.1 $\mu\text{g/ml}$ el porcentaje de inhibición fué de un 19% y un 21%.

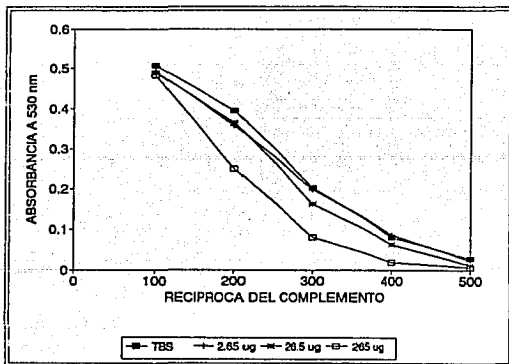


Figura 30. Efecto de los productos de excreción-secreción frescos del primer día de cultivo de los cisticercos de *Taenia solium* sobre el sistema del complemento.

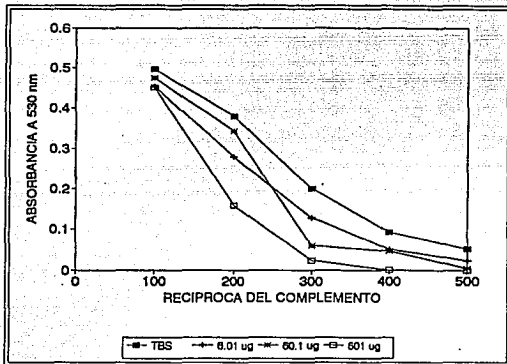


Figura 31. Efecto de los productos de excreción - secreción frescos del segundo día de cultivo de los cisticercos de *Taenia solium* sobre el complemento.

Finalmente, al poner en contacto el complemento con los productos de excreción - secreción congelados, se obtuvo que el mayor porcentaje de inhibición se presentó en la concentración de 5 µg/ml con un 19%, siguiendole la concentración de 500 µg/ml con un 14% y finalmente la de 50 µg/ml con un 10% figura 31.

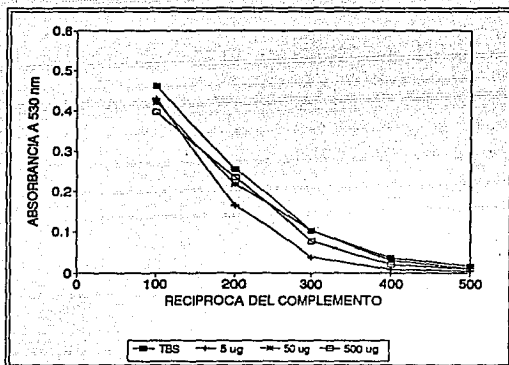


Figura 32. Efecto de los productos de excreción - secreción congelados sobre el sistema del complemento.

XI. DISCUSION

El éxito del establecimiento, sobrevivencia y proliferación de los parásitos en huéspedes inmunocompetentes, parece deberse a la capacidad que han tenido para evadir la respuesta inmune, la cual genera complejas interacciones con la finalidad de destruir al parásito. Estos, a su vez han desarrollado una serie de estrategias llamadas Mecanismos de Evasión Inmune, a través de las cuales interfieren y/o evitan la generación de dicha respuesta.

En la cisticercosis se ha visto que los parásitos pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en su huésped sin sufrir daño alguno (15), lo cual parece deberse a su capacidad para evadir el reconocimiento y/o evitar su destrucción por los diferentes mecanismos del sistema inmune.

Uno de los mecanismos de evasión, generado por los parásitos es la inhibición de las acciones destructivas del complemento, que son: la opsonización, la fagocitosis y la lisis celular. Este mecanismo involucra la posible formación de moléculas, las cuales pueden interferir de diferentes maneras con el complemento.

Debido a lo anterior, el presente trabajo se enfocó al estudio del efecto del extracto crudo y de los productos de excreción - secreción del cisticerco de *T. solium* sobre el sistema del complemento *in vitro*.

Los resultados de este estudio mostraron que al poner en contacto durante 30 min el extracto crudo del cisticerco de *T. solium*, con el complemento de cobayo, se observó una inhibición en el porcentaje de lisis celular hasta en un 76% con la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$. Por lo anterior concluyo que el cisticerco presenta un factor o factores los cuales son capaces de inhibir la acción del complemento. En la literatura se ha reportado la interacción del sistema del complemento con el antígeno B (paramiosina) de este parásito, el cual inactiva la vía clásica a través de su unión a C1q por la región tipo colágena de esta proteína (63). Sin embargo cuando se eliminó el antígeno B del extracto, éste también ocasionó un decremento en la lisis celular en un 81% con la concentración mas alta que fué de 826 $\mu\text{g/ml}$; demostrándose que existen otros factores además del antígeno B, que están bloqueando al complemento.

En otros trabajos se ha visto la inhibición del complemento por otros parásitos, tales como *O. cervicalis*, ya que al poner en contacto el extracto crudo con suero de humanos, ratas y caballos, es capaz de inactivar al complemento por sus dos vías, la alterna y la clásica (42).

El porcentaje de reducción de la actividad lítica del complemento con el extracto crudo, podría deberse a que posiblemente presente alguna o algunas moléculas sobre su superficie, que puedan: a).- impedir la unión de una proteína con otra del sistema del complemento; b).- aumentar la afinidad de las proteínas inhibidoras del complemento a su sustrato; c).- impedir la unión del MAC a la membrana. Al respecto, se ha encontrado que algunos cisticercos de *T. solium* presentan sobre su superficie C3b (64), lo que muestra que posiblemente se este activando el complemento hasta la proteína C3b, pero que de alguna manera está siendo bloqueado en el paso siguiente por algún factor generado por el parásito, o bien puede ser que el parásito pueda presentar un receptor para C3b, a través del cual podría estar regulando la activación del complemento, como en el caso de *T. cruzi* que es capaz de inactivar al complemento, debido a la presencia sobre su superficie de C3b el cual presenta una mayor afinidad por el factor H que por el Factor B debido a que el parásito se encuentra secretando alguna sustancia "atrayente" del Factor H, que va a producir el rompimiento de C3b generando el fragmento inactivo iC3b, el cual no puede participar en la formación de la C5 convertasa inactivando de esta manera al sistema del complemento (65,66). Además, se ha visto que los céstodos presentan sobre su superficie ácido siálico (67), el cual al parecer regula la acción del complemento al generar una mayor afinidad de C3b por el Factor H, provocando la inactivación de C3b de manera similar a la antes

mencionada (68). Por otro lado, se ha demostrado, por medio de estudios de microscopía electrónica e histoquímica, que una gran variedad de metacéstodos presentan en su superficie mucopolisacáridos, los cuales podrían estar formando una "densa" capa, que impida la fijación del MAC a la membrana (69,70). Ejemplos de esto son las espesas membranas formadas por proteoglicanos, las cuales restringen el acceso del complejo C5b-9 (MAC), ya que cubren los sitios hidrofóbicos de la membrana citoplásmica (*Escherichia coli* y *T. cruzi*) (71); o bien por la formación de largas cadenas de polisacáridos, los cuales generan la inserción del MAC pero a una distancia considerable de la membrana del parásito, como es el caso del polisacárido O de *Salmonella* (71).

Con respecto a los experimentos realizados con los productos de excreción - secreción frescos también se observó una disminución en la actividad lítica del complemento en un 27% con los productos del primer día de cultivo y de un 41% con los del segundo día. Esta diferencia se debe a que los productos del segundo día presentaban una mayor concentración (601 $\mu\text{g/ml}$), que los obtenidos el primer día (264 $\mu\text{g/ml}$), por lo que había una mayor cantidad del factor o factores inhibitorios del complemento en los productos del segundo día.

Estos resultados muestran, que además de que el parásito tal vez presenta algo en su superficie también se encuentra secretando un factor o varios factores que están bloqueando la acción del complemento.

Al respecto, en trabajos hechos con el cisticerco de *T. taeniaeformis*, se ha visto que en el fluido vesicular se encuentran factores que inhiben al sistema del complemento a través de proteoglicanos polianiónicos sulfatados, los cuales activan e incrementan la función del inhibidor de C1. Además, se ha mostrado que también es capaz de generar sustancias que también inhiben la cascada de la coagulación (43,44).

Los resultados obtenidos de los experimentos hechos con productos de excreción - secreción congelados, mostraron un 14% de inhibición de la actividad lítica del complemento con la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ pero con la de 5 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo un 19%, sin embargo, al obtener sus desviaciones estándar no se encontró diferencia significativa entre ellas. Estos resultados, al compararlos con los productos de excreción - secreción frescos, mostraron un aumento en la actividad lítica del complemento en los congelados, por lo que se puede sugerir que el factor o factores que inhiben al complemento probablemente al ser congelados pierden su actividad anticomplementaria.

Todos estos resultados sugieren que el parásito se encuentra bloqueando la acción del complemento y probablemente lo esté haciendo por sus dos vías ya que hubo una inhibición de la acción del complemento cuando se probó el sistema con eritrocitos sensibilizados con hemolisina y aunque no se midió directamente la acción de la vía alterna, en el tubo control con eritrocitos no sensibilizados se pudo apreciar cierta inhibición.

Sin embargo, es posible que el parásito no solo presente un solo mecanismo de evasión, ya que hay evidencias de que posiblemente presente un receptor para IgG sobre su superficie (72), por lo que de esta manera estaría inhibiendo la reacción antígeno-anticuerpo y por lo tanto también la activación de complemento por la vía clásica.

También hay que tomar en cuenta que en el hombre este parásito generalmente se encuentra en sitios inmunológicamente privilegiados como el cerebro y el ojo, en los cuales no se encuentran las proteínas del complemento. Además en un trabajo en el cual se buscó la presencia de C3b sobre la superficie de cisticercos se encontró que en la mayoría de los cisticercos presentes en diferentes regiones del cerebro y en el ojo no presentaban C3b en su superficie, sin embargo los cisticercos presentes en el músculo sí lo presentaban (64).

Además, existen indicios de que el cisticerco al parecer produce un factor macrofagocitotóxico, que de alguna manera mata a los macrófagos (73); por lo que con esta acción también se reduciría la actividad del complemento, ya que los macrófagos sintetizan algunos de los componentes del sistema del complemento tales como C4, C2, C3, C5, Factor D, Factor B y la properdina. En favor de esta hipótesis existe un reporte en el que se mostró un decremento transitorio en el CH_{50} del suero de ratas cuando se infectaron con *T. taeniaeformis* (43).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, al inhibir la acción del complemento, no sólo se inhibe la lisis celular, sino también la generación de anafilotoxinas, las cuales causan degranulación de basófilos y degranulación de células cebadas las cuales liberan sustancias vasoactivas como la histamina; también se impide la producción de factores quimiotácticos de neutrófilos, basófilos y eosinófilos; y la adherencia de algunos fragmentos del complemento a las membranas celulares del parásito, con lo cual se inhiben las otras dos principales funciones del complemento que son la opsonización y la respuesta inflamatoria.

Finalmente, en este trabajo se demuestra que existe un factor o varios factores que inhiben la acción del complemento, por lo que es necesario reconocer el factor o factores tanto del extracto

crudo, como de los productos de excreción - secreción que están inhibiendo al sistema del complemento; identificar si son los mismos factores o no, y caracterizarlos, así como también es necesario reconocer a que proteína o proteínas del complemento están inhibiendo y/o tal vez activando (proteínas reguladoras). Ya que estos estudios permitirían tener un mejor entendimiento de la relación huésped - parásito, y, por lo tanto un mayor conocimiento acerca de los mecanismos de evasión inmune.

XII. CONCLUSIONES

-- El extracto crudo del cisticerco de *Taenia solium* presenta algunas moléculas que inhiben la acción del sistema del complemento.

-- El cisticerco secreta algunos factores lábiles que inhiben al complemento.

-- Además del antígeno B, existen otros factores que están inhibiendo la acción del complemento.

XII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Malagón, F. (1989). Elementos del Binomio Taeniasis/Cisticercosis. Una Síntesis. En: A. Flisser, F. Malagón (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Límusa-Noriega, México, D.F. pp 3-6.
- 2.- Pérez-Tamayo, R. y Flores, F. (1959). Datos generales de 2202 autopsias. Prensa Med. Mex. 24: 117.
- 3.- Woodhouse, E., Flisser, A., y Larralde, C. (1982). Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Lacllette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp 11-24.
- 4.-Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutiérrez, G., y Tapia - Conyer, R. (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública. México. 34: 197 - 210.
- 5.- Sarti, E. (1989). Epidemiología de la Taeniasis/Cisticercosis. En: A. Flisser, F. Malagón (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Límusa - Noriega, México, D.F. pp 233 - 242.
- 6.- Aluja, A. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in México. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Lacllette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp 53 -62.
- 7.- FAO/UNDP/WHO: (1984). Guidelines for surveillance Prevention and control of Taeniasis - Cisticercosis. Document UPH/83.49 World Health Organization, Geneva, Switzerland. 207 pp.
- 8.- Schmidt, G. D. y L. S. Roberts. (1977). Foundations of Parasitology. The C.V. Mosby Company. St. Louis Missouri. 604 pp.
- 9.- Lacllette, P.P., Ornelas, Y., Merchant, M.T., y Willms, K. (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Lacllette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp 375 - 377.
- 10.- Lacllette, JP. (1985). Componente de superficie en el metacéstodo de la *Taenia solium*. Tesis Doctoral. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del CCH. Instituto de Investigaciones Biomédicas. 126 pp.

11.- Cañedo, L., Laclette, JP., y Morales, E. (1982). Evagination of the metacystode of *Taenia solium*. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Laclette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. pp 375 - 377.

12.- Correa, D., Morales, Z., Medina, Y., García, C., Medina, E., Mandujano, A., Ortiz, D. y Meza, A. (1991). Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de nuevos y viejos descubrimientos. Publicación técnica del INDRE No.4. SSA. 56 pp.

13.- Zenteno-Alanis, G.H. (1982). A classification of human cysticercosis. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Laclette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. pp 107 - 126.

14.- Flisser, A., Madrazo, I., González, D., Sandoval, M., Rodríguez Carbajal, J., y De Dios, J. (1988). Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 739.

15.- Dixon, H. B.F., y Lipscomb, F.M. (1961). *Cysticercosis: An analysis and follow up of 450 cases*. Privy. Council Med. Res. Special Rep. Ser. 299, 58 pp.

16.- Flisser, A., Woodhouse, E., y Larralde, C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 27.

17.- Espinoza, B., Ruíz-Palacios, G., Tovar, A., Sandoval, M.A., Plancarte, A., y Flisser, A. (1986). Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 536.

18.- Correa, D., Tovar, A., Espinoza, B., Plancarte, A., y Flisser, A. (1989). Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped - parásito. En: A. Flisser, E. Malagón (eds). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Limusa - Noriega, México, D.F. pp 31 - 44.

19.- Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L. y Laclette, JP. (1982). Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Laclette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. pp 437 - 451.

20.- Lacllette, JP., Merchant, M., y Willims, K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacystode of *Taenia solium* J. Parasitol. 73: 121.

21.- Sealey, M., y Ortiz, O.L. (1982). Cellular immunity in cysticercosis: a review. En: A. Flisser, K. Willms, JP. Lacllette, C. Larralde, A. Riadura, F. Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp 437 - 451.

22.- Despommier, D. (1977). Immunity to *Trichinella spiralis* Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 68.

23.- Frenkel, J.K. (1988). Pathophysiology of Toxoplasmosis. Parasitol. Today. 4: 273.

24.- Ogilvie, M.B. y Wilson, M.J. (1976). Evasion of the Immune Response by Parasites. Bp. Med. Bull. 32: 177.

25.- Sher, A., Hall, B.F. y Vadas, M.A. (1978). Acquisition of murine Major Histocompatibility Complex gene products by schistosomula of *Schistosoma mansoni*. J. Exp. Med. 148: 46.

26.- Kemp, W.M., Damian, R.T., Greene, N. y Lushbagugh, W. B. (1976). Immunocytochemical localization of mouse alpha 2-macroglobulin like antigenic determinants on *Schistosoma mansoni* adults. J. Parasitol. 62: 413.

27.- McLaren, D.J., Clegg, J.A., y Smithers S.R. (1975). Acquisition of host antigens by young *Schistosoma mansoni* in mice. Correlation with failure to bind antibody in vitro. Parasitol. 70: 67.

28.- Capron, A., y Dessaint. JP. (1989). Molecular basis of host - parasite relationship: Towards the definition of protective antigens. Immunological Reviews. 112: 27.

29.- Ben-Ismael, R., Mulet-Clamagiran, C., Carme, B. y Gentilini, M. (1982). Biosynthesis of A, H and Lewis blood group determinants in *Fasciola hepatica* J. Parasitol. 68: 402.

30.- Damian, R.T. (1979). Molecular mimicry in biological adaptation host - parasite interfaces. New York. Academic Press, Inc. pp 103 - 126.

31.- Torpier, G., Capron, A., y Ouaisi, M. A. (1979). Receptor for IgG (Fc) and human 2-microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. Nature. 278: 447.

32.- Vincendeau, P., y Daeron, M. (1989). *Trypanosoma musculi* co-express several receptors binding rodent IgM, IgE and IgG subclasses. *J. Immunol.* 142: 1702.

33.- Eisen, D., y Tallan, I. (1977). *Tetrahymena pyriformis* recovers from antibody immobilisation by producing univalent antibody fragments. *Nature.* 270: 514.

34.- Vickerman, K. (1978). Antigenic variation in trypanosomes. *Nature.* 273: 613.

35.- Fong, D., y Chang, K-P. (1982). Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79: 7366.

36.- Freeman, R.R., Trejdosiewicz, A.J. y Cross, G.A.M. (1980). Protective monoclonal antibodies recognising stage-specific merozoite antigens of a rodent malaria parasite. *Nature.* 284: 366.

37.- Fischetti, V.A. (1991). Streptococcal M Protein. *Sci. Am.* 264: 32.

38.-Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodríguez, M., Pérez, M. y Ortíz-Ortiz, L. (1978). *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed response to different antigens in the infected mouse. Different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45: 190.

39.- Plançarte, A., Flisser, A., y Larralde, C. (1983). Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios.* 36: 83.

40.- Hommel, M. (1985). Antigenic variation in malaria parasites. *Immunol. Today.* 6: 28.

41.- Bogdan, C. Rollinhoff, M. y Solbach, W. (1990). Evasion strategies of *Leishmania* parasites. *Parasitol. Today.* 6: 183.

42.- Coley, S.C., y Leid, R.W. (1982). Effects of extracts of *Onchocerca cervicalis* from horses on the lytic activity of human, rat and equine complement. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 23: 113.

43.- Hammerberg, B., y Williams, F.J. (1978). Interaction between *Taenia taeniaeformis* and the complement system. *J. Immuno.* 120: 1033.

44.- Hammerberg, B., y Williams, F.J. (1978). Physicochemical characterization of complement interacting factors from *Taenia taeniaeformis*. *J. Immunol.* 120: 1039.

45.- Kipnis, T.L., Joiner, K.A., Da Silva, W.D., Rimoldi, M.T., Hammer, C.N. y Sher, A. (1988). Identification of membrane components of *Trypanosoma cruzi* modulators of complement system. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio. 83: 571.

46.- Brown, J.E., Joiner, A.K., y Frank, M.M. (1984). Complement: in Fundamental Immunology. Ed. Raven Press. New York. pp 645 - 668.

47.- Fries, F.L., y Frank, M.M. (1987). Molecular mechanisms of complement action in: Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, W.W., Leder, P., and Majerus, W.P. The molecular basis of blood diseases. Ed. W.B. Saunders Company. pp 450 - 498.

48.- Douglas, N.G. (1989). Complement System. Ed. Calbiochem Corporation. USA. pp 3 - 34.

49.- Roitt, M.I., Brostoff, J., y Male, K.D. (1977). Inmunología. 3ra. Edición. Ed. Blackwell, Oxford. pp. 7.1 - 7.13.

50.- Kinoshita, T. (1991). Biology of complement: the overture. Immunology Today. 12: 291.

51.- Sim., R.B., y Reid, K.B.M. (1991). C1: molecular interactions with activating systems. Immunology Today. 12: 307.

52.- Erdei, A., Füst, G., y Gergely, J. (1991). The role of C3 in the immune response. Immunology Today. 12: 332.

53.- Pangburn, K.M. (1983). Activation of complement via the alternative pathway. Federation Proceedings. 42: 139.

54.- Podack, R.E. (1986). Assembly and functions of the terminal components. En: Immunobiology of the complement system. Ed. Academic Press. New York. pp 115 - 137.

55.- Frank, M.M., y Fries, L.F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. Immunology Today. 12: 322.

56.- Ross, D.G. y Atkinson, P.J. (1985). Complement receptor structure and function. Immunology Today. 6: 115.

57.- Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, E.N., y Sussdorf, D.H. (1970). Methods of Immunology. Segunda Edición. Ed. W.A. Benjamin. INC. USA. pp 300 - 315.

58.- Espinoza, B. (1980). Antígenos específicos y de reacción cruzada de helmintos parásitos. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.

59.- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248.

60.- Laemli, V. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680.

61.- Laclette, J.P., Alagón, A., Willims, K., y Torre-Blanco, A. (1990). Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J. Parasitol.* 76: 273.

62.- Kabat, A. E., y Mayer, M. M. (1968). *Inmunquímica Experimental*. Ed. La Prensa Médica Mexicana. México. pp 123 -226.

63.- Laclette, J.P., Shoemaker, B.C., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., y Nicholson-Weller, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148: 124.

64.- Correa, D., Dalma, D., Espinoza, B., Plancarte, A., Rabiela, M.T., Madrazo, I., Gorodezky, C. y Flisser, A. (1985). Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J. Parasitol.* 71: 535.

65.- Rimoldi, M.T., Sher, A., Heiny, S., Lituchy, A., Hammer, C.H., y Joiner, K. (1988). Developmentally regulated expression by *Trypanosoma cruzi* of meolecules that accelerate the decay of complement C3 convertases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 193 -197 pp.

66.- Joiner, K., Sher, A., Gaiyher, T., y Hammer, C. (1986). Evasion of alternative complement pathway by *Trypanosoma cruzi* results from inefficient binding of factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6593 - 6597 pp.

67.- Lumsden, R.D., Oaks, J.D. y Alworth, L.W. (1970). Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. IV Localization and citochemical properties of membrane fixed cation binding site. *J. Parasitol.* 56: 736.

68.- Fearon, D.T. (1979) Activation of the alternative complement pathway. En: *CRC critical reviews in immunology*. Florida. pp 1 - 32.

69.- Lumsden, R.D. (1975). Parasitological review. Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp. Parasitol.* 37: 267.

70.- Waitz, J. (1963). Histochemical studies of the cestode *Hydatigena taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 50: 271.

71.- Cooper, N.R. (1991). Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunology Today*. 12: (9), 327 - 331 pp.

72.- Mandujano, M. A.P. (1991). Presencia de un receptor para la fracción Fc de IgG en el cisticerco de *Taenia solium*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 49 pp.

73.- Pérez, I. D. G. (1993). Procesamiento de antígenos somáticos y de excreción - secreción del cisticerco de *Taenia solium* por macrófagos. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. pp 70.