



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



EFFECTO DE LOS PRODUCTOS DE EXCRECION-SECRECION  
DEL CISTICERCO DE *Taenia solium* SOBRE MACROFAGOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

**ARZEL ALVARADO RODRIGUEZ**

ASESORES:

M. en I. B. B. Ma. Dolores Correa Beltrán

M. en C.M Fco. Javier Alvarado Alemán

M. en C. Victor Manuel Zendejas Buitrón

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 1995

FALLA DE ORIGEN



## **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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

DR. JAINE KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Coballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Efecto de los productos de excreción-secreción del  
cisticercos de Taenia solium sobre macrófagos.

que presenta el pasante: Arzel Alvarado Rodríguez  
con número de cuenta: 8754147-2 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 2 de Marzo de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Gloria Ortiz Gasca

VOCAL M.V.Z. Pablo Martínez Labat

SECRETARIO M.en C. Victor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE Dr. Marco A. Vega López

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Angel Martínez Sosa

## Agradecimientos

Al INDRE y departamentos que lo forman por permitir realizar trabajos de tesis a estudiantes.

A la Dra. Ma. Dolores Correa por su gran apoyo y su interés no solo como asesora de tesis sino también como persona y por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis.

Al Dr. Alvarado y a Carolina por el asesoramiento en el uso del citómetro de flujo.

A mis asesores:

M.V.Z. Gloria Ortiz Gasca  
M.V.Z. Pablo Martínez Labat  
M.en C. Victor M. Zendejas Buitrón  
Dr. Marco Antonio Vega López

Por la revisión a la presente tesis, así como formar parte del comité de sinodales.

A mis compañeros de laboratorio les agradezco sus consejos los cuales me fueron muy valiosos para tomar decisiones en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros de la universidad por compartir con ellos sus conocimientos y amistad.

## Dedicatiria

A mi Mamá que siempre esta en mi

por darme su gran cariño  
por darme su calor cuando tuve frío  
por darme su pan  
por darme su risa en mis ojos  
por darme su comprensión  
por darme su paz  
por caminar juntos en el frío  
por darme el ser  
por todo lo que fuiste y eres  
te quiero mucho Mamá

A mi Papá por su cariño  
y por darme siempre su  
entusiasmo de seguir adelante

A mi hijo y a Mariana  
que son parte de mi como  
yo lo soy de ellos

A mis hermanos: Lidia  
Silvia  
Yolanda  
América  
Félix  
Sol  
por ser tan buenos conmigo  
les quiero mucho

# I N D I C E

	Pag.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1 <u>Biología y clasificación taxonómica de T. solium</u>	2
2.2 <u>Morfología y ciclo de vida de Taenia solium</u>	2
2.3 <u>Cisticercosis</u>	6
2.3.1 Aspectos clínicos	6
2.3.1.1 Localización	7
2.3.1.2 Sintomatología	7
2.3.1.2 Diagnóstico	8
2.3.1.3 Tratamiento	10
2.3.2 Aspectos epidemiológicos	10
2.3.3 Inmunología de la cisticercosis	11
2.3.3.1 Respuesta humoral	12
2.3.3.2 Respuesta celular	13
2.3.3.3 Interfase hospedero-parásito	16
2.3.3.4 Posibles Mecanismos de evasión inmune	17
2.3.3.4.1 Mimetismo molecular	17
2.3.3.4.2 Presencia de receptores para Fc	17
2.3.3.4.3 Liberación de complejos inmunes	18
2.3.3.4.4 Cortina de humo	19

2.3.1.3 Tratamiento	10
2.3.2 Aspectos epidemiológicos	10
2.3.3 Inmunología de la cisticercosis	11
2.3.3.1 Respuesta humoral	12
2.3.3.2 Respuesta celular	13
2.3.3.3 Interfase hospedero-parásito	16
2.3.3.4 Posibles Mecanismos de evasión inmune	17
2.3.3.4.1 Mimetismo molecular	17
2.3.3.4.2 Presencia de receptores para Fc	17
2.3.3.4.3 Liberación de complejos inmunes	18
2.3.3.4.4 Cortina de humo	19
2.3.3.4.5 Inhibición del complemento por la paramiosina (AgB)	19
2.3.3.4.6 Inhibición de células efectoras	20
3. JUSTIFICACION	21
4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos particulares	23
5. HIPOTESIS	23
6. MATERIAL Y METODOS	24
6.1 Cultivo de células	24
6.2 Obtención de cisticercos	24

## INDICE DE FIGURAS

	pag.
1. Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	5
2. Posibles mecanismos de evasión inmune	16
3. Representación de datos de dos poblaciones de células y su análisis estadístico	26
4. Construcción de curva patrón y lectura al citómetro	28
5. Ensayo de citotoxicidad; lectura al citómetro de flujo y al microscopio	29
6. Determinación de la viabilidad por transformación de MTT	32
7. Curva patrón de viabilidad por citometría de flujo	34
8. Curva patrón de viabilidad por transformación de MTT	34
9. Correlación entre la determinación de viabilidad por transformación de MTT y citometría de flujo	35
10 y 11. Evaluación del efecto de los productos de excreción-secreción por exclusión de azul tripano	36
12 y 13. Evaluación del efecto de los productos de excreción-secreción por citometría de flujo	37
14 a 18. Evaluación del efecto de los productos de excreción-secreción por transformación de MTT	38

## 1 RESUMEN

En la cisticercosis a pesar de la presencia de anticuerpos circulantes y de células de reacción inflamatoria como eosinófilos y macrófagos, el cisticerco de *Taenia solium* logra sobrevivir por períodos muy prolongados. Por otra parte se ha observado que en las regiones más próximas al cisticerco los eosinófilos se encuentran alterados y los macrófagos se encuentran distantes de la superficie parasitaria. En un trabajo previo se encontró que los productos de excreción-secreción recién cosechados son líticos para eosinófilos. El presente trabajo se enfocó en determinar el efecto de los productos de excreción-secreción del cisticerco sobre la viabilidad de macrófagos. Para evaluar la viabilidad de los macrófagos frente a los productos de excreción-secreción frescos se utilizó la técnica de exclusión de azul tripano y la estandarización de dos técnicas para evaluar la viabilidad por citometría de flujo y por transformación de la sal de tetrazolio (MTT). Los resultados obtenidos por las técnicas de exclusión de azul tripano y transformación de MTT mostraron que los productos de excreción-secreción no afectan la viabilidad de los macrófagos, por lo que no se descarta que el parásito este empleando otro mecanismo de evasión el cual este operando en la relación hospedero-parásito; en cuanto a la técnica de citometría de flujo esta no se logró estandarizar por razones técnicas.

## 2 INTRODUCCION

### 2.1 Biología y Clasificación taxonómica de Taenia solium

*Taenia solium* comunmente conocida como solitaria es un platelminto hermafrodita que unicamente parasita al ser humano, el cual se infecta cuando ingiere carne de cerdo cruda o mal cocida infestada por la larva o cisticerco de este parásito. La infestación por este parásito no le produce a su hospedero grandes problemas, sin embargo, este último al eliminar los huevos con las heces constituye una fuente de contaminación para sí mismo y para cualquier persona ya que al ingerir estos huevos el ser humano o el cerdo, les provocara cisticercosis. Puesto que el hombre es el único huésped definitivo natural de la *Taenia solium*, la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con el cerdo(Aluja y col,1987).

PHYLUM	Platyhelminthes	
CLASE	Cestoda	
ORDEN	Taeniidea	
FAMILIA	Taenidae	
ESPECIE	<i>Taenia solium</i>	(Soulsby, 1986)

### 2.2 Morfología y ciclo de vida de Taenia solium

El adulto de *Taenia solium* es un gusano aplanado que mide entre 1.5 y 5 m de longitud, aunque en ocasiones puede

alcanzar hasta los 8 m. Su cuerpo está dividido en escólex, cuello y estróbilo. El escólex posee 4 ventosas y un rostelo armado por dos hileras de ganchos. El número de ganchos rostelares puede variar entre 22 y 32, y su tamaño entre 159 y 173 mm. Tanto las ventosas como el rostelo son estructuras de fijación que capacitan a la tenia para mantenerse anclada en la pared del yeyuno. La siguiente región es el cuello y posteriormente el estróbilo estando éste último constituido por proglótidos inmaduros, maduros y grávidos.

Los proglótidos maduros generalmente miden de 7 a 12 mm de largo por 5 a 6 mm de ancho. Cada proglótido maduro puede considerarse como una unidad reproductora independiente, puesto que posee órganos sexuales masculinos y femeninos. Los genitales masculinos están constituidos por un gran número de testículos (275 a 575) que confluyen en un conducto genital que, a su vez, desemboca por un costado del proglótido en el atrio genital.

Los genitales femeninos están constituidos por un ovario trilobulado situado en la base del útero, en el atrio genital extremo posterior a través de la vagina en el mismo. El útero de los proglótidos grávidos consta de 7 a 15 ramas laterales repletas de huevos y cada una de las ramas puede presentar ramificaciones. Los huevos de *T. solium* son morfológicamente similares a los de otras especies de ténidos e idénticos a los de *T. saginata*. Poseen varias envolturas que posibilitan la sobrevivencia de la oncosfera en el medio ambiente. La envoltura más externa es el vitelo constituido por un grupo de células que forman un sincicio. La siguiente envoltura es el embrioforo, formado por

pequeños bloques proteínicos unidos entre sí por un material cementante (Laclette y col, 1982). Esta envoltura además de ser la más importante en la protección de la oncosfera, confiere a los huevos su apariencia estriada característica.

A su vez el embrioforo es producido por una envoltura más profunda llamada célula embrioforal. Finalmente la membrana oncosferral rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto que posee 3 pares de ganchos. Cuando los huevos son ingeridos accidentalmente por el humano o el cerdo, se activan por acción de las enzimas digestivas actuando sobre el material cementante, de tal forma que se activa el embrión, se adhiere a la pared intestinal utilizando sus ganchos y posteriormente atraviesa la mucosa para llegar al torrente circulatorio y migrar a músculo, sistema nervioso, ojo o tejido subcutáneo. Una vez establecido el embrión empieza a desarrollarse hasta convertirse en cisticerco en aproximadamente meses (Aluja y col, 1987).

El cisticerco de *T. solium* está formado por una vesícula ovalada y traslúcida llena de líquido (de diámetro mayor de 0.5 a 2 cm.) con un pequeño escólex invaginado en el interior. Al igual que el adulto, el escólex del cisticerco posee cuatro ventosas y un rosetelo armado con dos hileras de ganchos (Slais, 1982).

La superficie que presenta el cisticerco a su hospedero humano o porcino es un tegumento citoplásmico sincicial y continuo en toda la cara externa de la pared vesicular. Puesto que los céstodos carecen de tracto digestivo, estos obtienen sus nutrientes por absorción y excretan sus

desechos a través de la superficie tegumental. La superficie externa del tegumento aparece aumentada por proyecciones digitiformes llamadas microtricas. Estas proyecciones son similares a las microvellosidades que contribuyen a los ribetes de cepillo en diversos epitelios de vertebrados e invertebrados (Ramírez y col., 1982).

Por abajo del tegumento se encuentran varias capas de tejido muscular liso, así como las llamadas células subtegumentales (Lumsden, 1982).

Estas células sintetizan activamente proteínas y otros componentes que posteriormente son transportados hacia el tegumento a través de puentes citoplásmicos. A mayor distancia de la superficie se encuentran una serie de conductos o canales, aparentemente relacionados con las células ciliadas, llamadas células en flama, que constituyen un sistema protonefridial. Cabe hacer notar que todos los elementos celulares por debajo del tegumento se distribuyen en forma poco organizada en medio de un abundante tejido conectivo.

Cuando un cisticerco es viable y es ingerido por el ser humano, el contenido enzimático del tubo digestivo activa al escólex que evagina y posteriormente se fija en la pared intestinal para desarrollarse en adulto y convertirse en una nueva tenia (Cañedo y col., 1982) (figura 1).

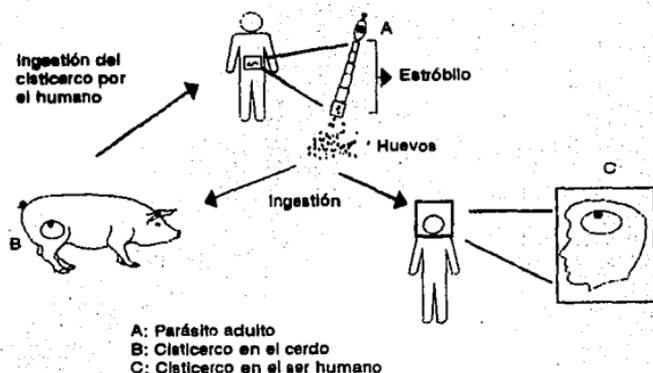


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*  
(Tomado de Correa y cols., 1991)

## 2.3 Cisticercosis

### 2.3.1 Aspectos clínicos

La cisticercosis es una enfermedad causada por el cisticerco de *T. solium*, siendo el cerdo el hospedero intermedio y por accidente también el hombre. La enfermedad es un problema de salud pública y un problema en producción porcina de traspatio, sobre todo en países en vías de desarrollo, por ello, los aspectos clínicos y condiciones de higiene y socioeconómicas han sido de gran interés para la investigación multidisciplinaria desde hace muchos años (Mahajan, 1982).

### 2.3.1.1 Localización

La cisticercosis humana puede ser subcutánea, muscular, ocular o cerebral siendo ésta la más dañina. En este tipo de cisticercosis la larva se establece en el parénquima, en el espacio subaracnoideo o en las cavidades ventriculares del sistema nervioso central (SNC). En algunos casos de neurocisticercosis humana la localización puede ser mixta, es decir, se presentan cisticercos en más de una zona (Zenteno-Alanis, 1982). La cisticercosis ocular producida por el establecimiento del parásito dentro del globo ocular o detrás de la retina, es la que sigue en frecuencia, mientras que la espinal, la subcutánea y la muscular se encuentran con menor frecuencia (Schenone y cols., 1982).

En el caso de la cisticercosis porcina, los cisticercos se localizan principalmente en el músculo esquelético y el tejido subcutáneo, aunque también pueden alojarse en el SNC (Flisser, y col., 1988).

### 2.3.1.2 Sintomatología

El daño que produce el cisticerco cuando se establece en el SNC es variable. Muchos de los casos son asintomáticos y aun en éstos hay una enorme heterogeneidad en los síntomas que pueden ser, desde perturbaciones sensoriales o motoras leves, hasta la presencia de crisis convulsivas, cefalea y cuadro de hipertensión endocraneana, debido a la obstrucción de la circulación de líquido cefalorraquídeo (LCR) y que en ocasiones causa la muerte (Zenteno-Alanis, 1982, Rabiela-

Cervantes, 1982). Esta heterogeneidad puede deberse a diferencias en el número de parásitos, al tipo de cisticerco presente (celuloso o racemoso), a su viabilidad, su localización, y a la respuesta que inducen. La cisticercosis ocular, después de la cerebral es la que más trastornos puede ocasionar, incluyendo ceguera (Cárdenas, 1989); mientras que los cisticercos en los tejidos subcutáneo y muscular provocan trastornos ligeros o pasan inadvertidos (Zenteno-Alanis, 1982; Dixon, y Lipscomb, 1961). En contraste con la cisticercosis humana, la porcina ha sido un pobre objeto de descripciones clínicas, principalmente por que no induce alteraciones, a pesar de que en el cerdo esta parasitosis frecuentemente afecta al SNC (Flisser, y cols, 1988).

### 2.3.1.3 Diagnóstico

Durante muchos años el diagnóstico de la cisticercosis sólo se realizaba con un examen clínico y por rayos X y sus derivados (ventriculografía o angiografía). Los rayos X sólo permiten detectar la presencia de calcificaciones y los casos de cisticercosis quística sólo eran identificados indirectamente con el uso de ventriculografía u otros procedimientos invasivos; en este tipo de métodos se marcan las zonas ocupadas del órgano afectado, pero no permiten la localización fina de la lesión ni la confirmación de la etiología (Dorfsman, 1963., Rodríguez, 1977). Posteriormente se empezó a utilizar la tomografía computalizada (TC),

revolucionando en gran medida el diagnóstico de la neurocisticercosis, ya que permitió identificar muchos casos quísticos sin necesidad de intervenciones dolorosas al paciente (como la inyección de medio de contraste o aire en el cerebro) y mostró ser muy sensible en casos de localización subaracnoidea y parenquimatosa. En el caso de pacientes con cisticercosis quística en los ventrículos se pueden diagnosticar por este método pero sólo con el uso de medios de contraste en el LCR (Rodríguez-Carbajal, 1982).

Aunado a este tipo de técnicas, se han desarrollado múltiples pruebas inmunológicas altamente sensibles que determinan la presencia de anticuerpos en el suero o el LCR y que han dado buenos resultados, siendo la sensibilidad obtenida en suero menor que aquella obtenida en LCR (revisado en Flisser y Larralde, 1986).

La mayoría de estos métodos utilizan un extracto crudo del cisticerco obtenido de carne de cerdo infestada. La utilización de este extracto desafortunadamente produce reacciones cruzadas con otros parásitos, (Schantz, 1980., Espinoza, y cols, 1986; Olivo, y cols, 1988) lo que ha llevado a la utilización de fracciones puras como lo es el antígeno B, esto hace que se disminuyan este tipo de reacciones, aunque no permite el diagnóstico diferencial entre cisticercosis e hidatidosis (Espinoza, y cols, 1986) y probablemente con otras enfermedades causadas por céstodos. También se ha desarrollado la inmunolectrotransferencia (IET) utilizando una fracción enriquecida en glicoproteínas específicas que permite la diferenciación entre pacientes con cisticercosis e hidatidosis (Tsang, y cols, 1989).

### 2.3.1.3 Tratamiento

En el tratamiento de la cisticercosis humana existen varios fármacos como el albendazol, el mebendazol y el metrifonato, los cuales han mostrado resultados favorables en casos humanos y animales (Torres, y col., 1992). Hasta la fecha el fármaco que ha dado mejores resultados en la neurocisticercosis es el praziquantel observándose por imágenes de tomografía computada la disminución en el número o tamaño de los parásitos. En la cisticercosis muscular con el tiempo se muestra un grado de degeneración después del tratamiento y un aumento en la respuesta inflamatoria (Flisser y col., 1990). Por otra parte se ha visto que el praziquantel tiene efecto sobre la membrana del tegumento y una acción sobre la contracción muscular, ambos aspectos son dependientes de calcio. A pesar de que se ve inhibida la evaginación del cisticerco por acción del praziquantel *in vitro* este tiene la capacidad de recuperar su capacidad de evaginar una vez suspendido el fármaco (García, Domínguez y cols., 1991).

### 2.3.2 Aspectos epidemiológicos

Durante muchos años, la única medida de la magnitud del problema de la cisticercosis humana fueron los estudios hechos en cadáveres de hospitales, en los que se encontró que entre el 1 y el 3% de los cadáveres presentaban cisticercos en cerebro (Albores y Altamirano, 1971; Rabiela y cols., 1982).

En la cisticercosis porcina la prevalencia determinada a través de la inspección sanitaria en rastros varía entre 0 y 7%, pero seguramente esta cifra es inexacta debida a la inspección sanitaria poco confiable, ya que en el área rural los puercos pasean libremente comiendo accidentalmente materia fecal de seres humanos pudiendo contener huevos de *T. solium* (Aluja, 1982).

En un estudio en seroepidemiológico en cisticercosis de 18,000 sueros analizados por IEF se obtuvo una seropositividad del 1% (Woodhouse y col, 1982); en otro estudio seroepidemiológico de 70,000 sueros analizados por hemaglutinación se obtuvo una prevalencia de seropositivos del 1.2% (Larralde, y col, 1992).

La prevalencia de la teniasis por *T. solium* realmente se desconoce ya que las cifras informadas son más variables (Schantz, y Sarti, 1990).

### 2.3.3 Inmunología de la cisticercosis

#### 2.3.3.1 Respuesta humoral

El estudio de la respuesta humoral en pacientes con neurocisticercosis ha sido bastante detallado, principalmente debido a los intentos por establecer un diagnóstico útil, de tal forma que la respuesta inmune humoral ha sido bien estudiada en suero y LCR de pacientes utilizando técnicas como la IEF con la que se pueden detectar anticuerpos en un 44% de los sueros de pacientes

(Flisser y col, 1980); el porcentaje de sensibilidad para la IgG se eleva a 73% en suero y 85% en LCR cuando son analizados por ELISA (Espinoza y col, 1986). También se han encontrado anticuerpos específicos de todas clases por IEF en sueros de pacientes con neurocisticercosis, siendo la IgG la más frecuente, seguida de la IgM, la IgA y la IgE (Flisser y col, 1980). La frecuencia de estas clases son idénticas en ELISA (Espinoza y col, 1986).

El antígeno B, componente inmunodominante de naturaleza glicoproteica de 95 kDa es reconocido por un 85% de los sueros de pacientes con neurocisticercosis, (Flisser, y col, 1987). Por inmunoelectrotransferencia se ha demostrado que se pueden reconocer hasta 30 antígenos distintos (Larralde y col, 1989).

#### 2.3.3.2 Respuesta celular

La participación de la respuesta inmune celular no se conoce; algunos estudios *in vitro* han demostrado que existen diferencias significativas entre la reactividad de células de pacientes con neurocisticercosis y las de personas aparentemente sanas hacia diferentes mitógenos y al parecer, también hay diferencias entre las proporciones de linfocitos CD4+ y CD8+. Cuando se sometió a estos pacientes a una prueba cutánea aplicando un extracto purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD), la respuesta de estos individuos fue significativamente menor a la de la población mexicana sana, por lo que no se puede descartar la

posibilidad de que la respuesta celular en estos pacientes esté alterada (Correa y col., 1989).

Debe considerarse cuidadosamente el hallazgo que el extracto crudo de cisticerco de *Taenia solium* tiene efecto mitogénico en linfocitos B de ratones sanos (Sealey y col., 1981), ya que el ratón no es hospedero de la *Taenia solium*, por lo que no es claro el significado de este hallazgo en la relación hombre-cisticerco.

#### 2.3.3.3 Interfase hospedero-parásito

Las parasitosis tisulares son aquellas donde la interfase entre el hospedero y el parásito es más obvia, pues físicamente se puede observar la región donde se localiza la membrana del tegumento parasitario y la cápsula que lo rodea (supuestamente proveniente del hospedero). Esta cápsula puede o no contener componentes de la respuesta inflamatoria. Los cisticercos que se encuentran en un pedazo de carne de cerdo decomisada generalmente presentan una morfología y un tegumento bien preservado, tanto a nivel de la larva invaginada como a nivel de la pared vesicular, y la mayoría de las larvas son capaces de evaginar (Correa y cols., 1987; Flisser, 1989).

La cápsula que rodea a los parásitos contiene una reacción inflamatoria escasa, en la que se pueden observar eosinófilos, macrófagos y células de reacción granulomatosa (epiteloides y gigantes multinucleadas) cerca de la superficie parasitaria. Además se pueden observar linfocitos

y células plasmáticas en el tejido más lejano (Willms, y Merchant, 1980), las cuales son capaces de producir anticuerpos específicos *in vitro* (Díaz, 1983).

Más recientemente se publicó una descripción minuciosa de los cambios inflamatorios y degenerativos que ocurren en estos parásitos al transcurrir el tiempo (Aluja y Vargas, 1988). Se consideró un corte histológico de un cisticerco sin reacción inflamatoria y sin cambios degenerativos, como grado cero. En un corte correspondiente al grado 1 se observa una infiltración de células mononucleares (linfocitos y células plasmáticas) y eosinófilos; en el grado 2 la reacción inflamatoria aumenta, siendo linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos las células predominantes y escasamente los macrófagos, aunque los eosinófilos se notan más numerosos y distribuidos en forma difusa entre las demás células; el grado 3 muestra el inicio de la inflamación de tipo granulomatosa de intensidad variable alrededor de la cavidad larvaria y los eosinófilos se acumulan en el borde interno de la reacción y da la impresión de una primera línea de ataque, algunos eosinófilos están adheridos a la pared vesicular de la larva y se observa desgranulación. Los macrófagos empiezan a alinearse en forma de empalizada y los eosinófilos se adhieren a la pared vesicular, el tegumento se incha y en la cutícula aparecen vacuolas. En el canal de entrada y en el canal espiral aparecen eosinófilos. En la cavidad del parásito se detecta material amorfo, eosinofílico. Dentro de la zona granulomatosa empiezan a

formarse agregados de linfocitos., en el grado 4 la reacción inflamatoria rodea casi completamente a la cavidad que contiene al parásito. Entre las empalizadas de macrófagos y células epiteloides aparecen células gigantes. En la zona inflamatoria se notan numerosos fibroblastos. Muchos de los eosinófilos entre el parásito y las células epiteloides se encuentran necrosadas. Los agregados de linfocitos son de mayor tamaño y en ellos se detectan formas de mitosis; los canales de entrada y espiral contienen numerosos eosinófilos, y su tegumento esta inchado y vacuolado. Ya en el grado 5 el parásito esta degenerado y solo se reconocen corpusculos calcáreos y ganchos. El grado 6 se caracteriza por que el lugar que ocupa el parásito está totalmente invadido por tejido fibroso, las células inflamatorias son muy escasas, pero aun se pueden encontrar corpúsculos calcáreos y ganchos (Aluja y col. 1988).

Estas observaciones son similares a lo que sucede en esquistosomiasis y en otras enfermedades producidas por cestodos (Butterworth, 1979).

En un estudio histopatológico de cisticercosis porcina, donde se utilizaron cerdos infectados naturalmente como modelo experimental, y despues de haber sido sometidos a tratamiento con praziquantel se observo que los eventos celulares durante la destrucción del parásitos son iniciados por los eosinófilos seguido de los macrófagos (Flisser y cols., 1990).

#### 2.3.3.4 Posibles mecanismos de evasión inmune

A pesar de la presencia de anticuerpos específicos circulantes y de células en una reacción inflamatoria cercana, el cisticerco de *Taenia solium* logra sobrevivir por periodos prolongados en el ser humano (Dixon y Lipscomb, 1961). Por otro lado, la cisticercosis porcina parece tener una convivencia pacífica entre el hospedero y el parásito por lo menos durante unos meses, (Aluja, 1989); para explicar que los cisticercos y otros parásitos logran sobrevivir en hospederos inmunocompetentes se ha postulado la existencia de mecanismos de adaptación evolutiva entre el hospedero y el parásito llamados mecanismos de evasión inmune. Actualmente se cuenta con datos de que ciertos mecanismos de evasión inmune posiblemente estén operando en la cisticercosis por *Taenia solium* figura(2).

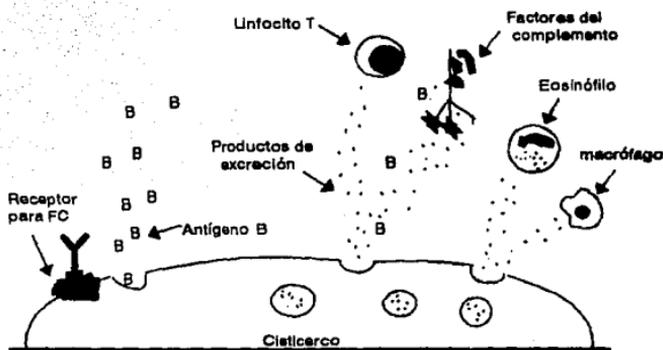


Figura 2. Posibles mecanismos de evasión inmune. El cisticerco presenta receptor para Fc, además secretar antígeno B, y productos de excreción-secreción que afectan a células del sistema inmune.  
(Tomado de Correa y cols., 1991).

#### 2.3.3.4.1 Mimetismo molecular.

La presencia de moléculas similares a las del hospedero puede deberse a que el parásito tenga la información para sintetizarlas y expresarlas en la superficie, siendo el efecto sobre la relación hospedero-parásito similar al inducido por enmascaramiento. Al respecto, se ha demostrado que *Fasciola hepatica* tiene la maquinaria enzimática necesaria para sintetizar antígenos de grupos sanguíneos y que estos se encuentran en la superficie del parásito (Ben-Ismail, 1982). Por medio de sistemas libres de células se encontró que el cisticerco de *Taenia solium* tiene un ARN mensajero que codifica para una proteína precipitable con anticuerpos anti-IgG porcinos (Díaz de León y cols, 1982); este parásito tiene IgG en la superficie (Varela y Coltorti, 1973; Kemp y cols, 1977); sin embargo, el origen y el papel de estas moléculas en la evasión o en la protección no han sido dilucidadas.

#### 2.3.3.4.2 Presencia de receptores para Fc

Las inmunoglobulinas presentes en la superficie de los cisticercos tanto en humanos como en cerdos pueden ser anticuerpos unidos a través de reacciones antígeno-anticuerpo, pero existe evidencia que sugiere que por lo menos parte de estas moléculas están unidas a través de un receptor para la fracción Fc, como mecanismo de evasión inmune por enmascaramiento (Correa y cols, 1985; Willms y Arcos, 1977; Mandujano, 1991). En primer lugar, está la falta

de correlación entre lo que está en la superficie y los anticuerpos cercanos (Correa y cols., 1983), así como la presencia de inmunoglobulinas superficiales presentes en parásitos viables (Willms y Arcos, 1977). Recientemente se reportó que los cisticercos de *Taenia taeniaeformis* son capaces de endocitar las inmunoglobulinas de rata (Hayunga y cols, 1989). Posiblemente el parásito no solo esté uniendo las inmunoglobulinas como un mecanismo de evasión, sino como mecanismo de "explotación inmune", término acuñado por J.P. Lacllette (comunicación personal) para referirse al doble uso de un posible receptor para Fc: la evasión y la ingestión de proteínas. También se tiene evidencia inmunológica de que el cisticerco de *Taenia solium* posee una molécula que es capaz de unir IgG humana y que esta unión es inhibida por IgG completa o Fc purificados, pero no por Fab (Mandujano, 1991).

#### 2.3.3.4.3 Liberación de complejos inmunes.

La liberación de complejos inmunes de la superficie parasitaria, podría tener efecto sobre la supervivencia del parásito, impidiendo que el sistema inmune actúe, o inclusive provocando inmunosupresión al hospedero. Murrell y Graham, (1983) informaron que el nemátodo *Strongiloides ratti* libera complejos inmunes de su superficie. Se ha visto que los sueros de pacientes con esquistosomiasis crónica suprimen la respuesta de células mononucleares de individuos normales a mitógenos (Kamal e Higashi, 1982) y que los

complejos inmunes formados durante infección por *Brugia pahangi* inhiben la adherencia y la citotoxicidad de células peritoneales normales (Karavadin y Ash, 1982).

#### 2.3.3.4.4 Cortina de humo

Llamada así a la secreción de antígenos solubles que son altamente inmunogénicos, lo que promueve la síntesis de anticuerpos que no van a tener efecto sobre el parásito. *Taenia solium* secreta un antígeno inmunodominante al que se le denomina antígeno B, el cual tiene afinidad por la colágena; por esta razón, se cree que los anticuerpos sintetizados en contra de este antígeno reaccionan lejos del parásito, probablemente afectando el tejido conectivo del hospedero (Plancerte y cols, 1983).

#### 2.3.3.4.5 Inhibición del complemento por la paramiosina (AgB)

Existe evidencia que sugiere que los cisticercos de *Taenia solium* son susceptibles al ataque del complemento *in vitro* (Correa y cols, 1987); es por ello que se podría esperar la presencia de algún mecanismo relacionado con la activación del complemento que esté ocurriendo *in vivo*. En el modelo de *Taenia taeniaeformis* se encontró que hay productos de la larva que inhiben la cascada del complemento y la coagulación (Hammerberg y cols., 1980). Ahora se sabe que el AgB de *T. solium* disminuye la actividad de la vía

clásica del complemento, inhibiendo específicamente la fracción C1q, de tal forma que regula la respuesta inmune del hospedero (Laclette y cols, 1992).

#### 2.3.3.4.6 Inhibición de células efectoras

La presencia de moléculas citotóxicas que eliminan o inactivan células del sistema inmune son otros mecanismos de evasión inmune, como en el caso de tripanosomiasis encontrada por Albright (1980) y en triquinosis por Faubert (1976), donde la liberación de moléculas tóxicas ha sido postulada para explicar la inmunosupresión no debido a células T; además se ha observado en *Trichomona vaginalis* y *Trichomona foetus* la liberación de sustancias citotóxicas hacia células epiteliales (Costa, F. y Souza, W. 1988).

Por otra parte las células más importantes que tiene que evadir el cisticerco de *Taenia solium* se encuentran los eosinófilos y los macrófagos, ya que estas células predominan en la reacción inflamatoria que destruye al cisticerco una vez que por tiempo o tratamiento se rompe el equilibrio de la relación hospedero-parásito (Flisser y col, 1990; Aluja y col, 1989; Aluja y Vargas, 1988).

### 3 JUSTIFICACION

Uno de los hallazgos de interés es la observación que en las regiones más próximas al cisticerco de *Taenia solium* es que los eosinófilos se encuentran lisados en comparación con los que se encuentran más distantes (Willms, y Merchant, 1980); en otros parásitos como *Trichomona vaginalis* y *Trichomona foetus* se ha demostrado un efecto citotóxico sobre células epiteliales, no solo por contacto sino también por sustancias liberadas por el parásito aún no identificadas (Costa y Souza, 1988).

En un estudio hecho con productos de excreción-secreción (ES) del cisticerco de *Taenia solium*, sobre la viabilidad de eosinófilos de ratón de la cepa Balb/c, se observó que los productos ES recién cosechados poseen una o varias sustancias que afectan la viabilidad de eosinófilos, mientras que los productos ES congelados antes de su uso no afectaban la viabilidad de los eosinófilos por lo que se cree esta o estas sustancias son muy lábiles. (Medina, Escutia, 1992). Lo anterior nos sugiere que el cisticerco de *Taenia solium* produce alguna o algunas sustancias para poder evadir el sistema inmune de su hospedero.

Como ya se mencionó anteriormente en la interfase hospedero-parásito los eosinófilos y macrófagos constituyen las dos primeras líneas de ataque al cisticerco una vez que se rompe el equilibrio hospedero-parásito ya sea por tiempo o tratamiento. Es por ello que se debe analizar

directamente si el efecto de estas sustancias de excreción-secreción del cisticerco de *T. solium* afectan la viabilidad de los macrófagos como un mecanismo de evasión inmune.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre la viabilidad de macrófagos *in vitro*.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

I Estandarizar una técnica para evaluar la viabilidad de macrófagos por citometría de flujo y transformación de MTT.

II Determinar el efecto de los productos de excreción-secreción sobre la integridad y viabilidad de los macrófagos *in vitro* utilizando las técnicas estandarizadas.

## 5 HIPOTESIS

El cisticerco de *Taenia solium* produce una o varias sustancias que afectan la viabilidad de los macrófagos como un mecanismo de evasión inmune.

## 6 MATERIAL Y METODOS

### 6.1 Cultivo de células

La línea celular murina de macrófagos J774.1 se mantuvo en cultivo con medio DMEM (Gibco; utilizado como Dulbecco, y cols., 1959., y Smith, 1960) suplementado con suero fetal bovino al 10% (INMUTEC), L-glutamina 20mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 0.1 mM (Gibco) y con una mezcla de antibióticos (100 U/ml de penicilina G sódica y 100µg/ml de estreptomicina), a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> (Furth, 1985). Cuando las células se encontraron confluentes o el medio se acidificaba, se cambió el medio de cultivo y se expandió la línea cultivándola en otras cajas (Corning de 75 cm<sup>2</sup>). La viabilidad de las células se verificó por exclusión de azul tripano al 0.004% en solución salina (Nowotny, A. 1977).

### 6.2 Obtención de cisticercos

Se aislaron parásitos de carne fresca infestada, separándolos cuidadosamente de la cápsula inflamatoria, se verificó su viabilidad colocando de 10 a 20 cisticercos en una placa de 24 pozos (Nunc) con bilis Bovina (obtenida en laboratorio de un cerdo) al 25% en solución salina 0.15M amortiguada con fosfatos 0.01M, pH7.2 (PBS), en agitación constante a 37°C durante 45-60 min. Se consideraron viables a los cisticercos que habían evaginado y se contó el

porcentaje al microscopio (Cañedo y col, 1982). El resto de los parásitos se utilizó para obtener los productos de excreción-secreción.

### 6.3 Obtención de productos de excreción-secreción

Los cisticercos se colocaron en un vaso de precipitado de 1 litro y se lavaron varias veces con PBS estéril suplementado con antibióticos concentrados 5 veces (500 U/ml de penicilina G sódica y 500µg/ml de streptomina) (antibióticos 5 X). Los cisticercos fueron pasados a tubos cónicos de 50 ml; los siguientes 5 o 6 lavados se hicieron a intervalos de 5 min, y con cambio de tubo en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar (Veeco). Por último se realizaron dos lavados más con medio mínimo esencial DMEM o RPMI (Gibco; utilizado como Moore, G. 1967), suplementado con antibióticos 1X y los cisticercos se incubaron en DMEM o RPMI en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 18 h.

Después de este periodo se cosechó el medio rico en productos de ES y se determinó la concentración de proteínas con el reactivo de Biorad (Modificado de Bradford, 1976), se fraccionó en alícuotas que se usaron inmediatamente para cada experimento de citotoxicidad sobre macrófagos.

#### 6.4 Ensayos de citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los productos de ES sobre macrófagos se utilizaron diferentes técnicas de evaluación, como la exclusión de azul tripano, la citometría de flujo y la transformación de la sal de tetrazolio (MTT). Dependiendo del tipo de ensayo se incubaron  $5 \times 10^5$  o  $1 \times 10^5$  células, empleando diferentes concentraciones de productos de ES recién cosechados producidos en DMEM o RPMI incubándose en una atmósfera de 95% de aire y 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 min (tiempo en el cual los eosinófilos se observaron alterados; Medina, 1992).

#### 6.6 Determinación de viabilidad por citometría de flujo

La citometría de flujo tiene como uno de sus parámetros de lectura la fluorescencia, así, el ensayo está basado en medir la autofluorescencia que emiten las células al hacerles incidir un rayo láser, siendo las células viables las que emiten mayor fluorescencia en comparación con las células no viables que han incorporado azul tripano, los resultados pueden ser mostrados en forma de puntos o histogramas entre otros, los cuales pueden analizarse por una serie de datos estadísticos como la media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación, o por diferencia de poblaciones como lo muestra la figura 3.

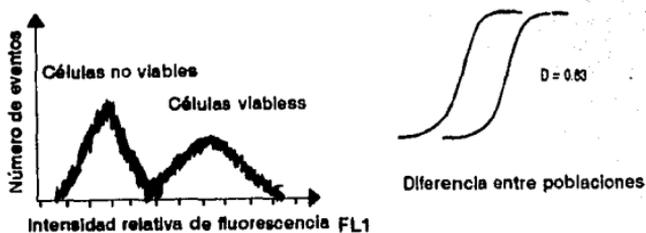


Figura 3. Representación de datos por histogramas de dos poblaciones diferentes y su análisis por diferencia poblacional(D).

Así mediante el uso de un citómetro de flujo es posible diferenciar cuantitativamente entre células viables y células no viables.

Para realizar la lectura por citometría de flujo se construyó una curva patrón de la siguiente manera: primeramente se colocaron de  $7$  a  $8 \times 10^5$  de células en un tubo.

Por otra parte se colocaron  $4 \times 10^6$  células en un tubo y se les adicionó una solución de metanol al 50% en PBS pH 7.2 estéril incubándose durante 1 h. Al término de la incubación se realizaron 2 lavados con PBS estéril y se verificó la viabilidad por exclusión de azul tripano al microscopio, observándose una viabilidad de 0%.

Para construir la curva patrón de viabilidad se hicieron combinaciones de células no viables (tratadas con metanol al 50% y lavadas con PBS) y células viables en diferentes tubos con el fin de obtener un 0, 25, 50, 75 y 100% de viabilidad; cada tubo contó con  $5 \times 10^5$  células y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda de 95% de  $\text{CO}_2$  y 5% de aire durante 45 min. Posteriormente se adicionó azul tripano en una relación 1:1 con el cual se incubó 10 min y posteriormente se leyeron al citómetro de flujo (FACS, Becton Dickinson) (figura 4).

#### Sistemas experimentales con productos de ES:

Se colocaron  $5 \times 10^5$  células en cuatro tubos (las muestras se corrieron por duplicado), los cuales se centrifugaron a 250g a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min; después se adicionaron 300 $\mu\text{l}$  de productos de ES producidos en medio DMEM o RPMI. También se adicionaron 300 $\mu\text{l}$  de medio DMEM o RPMI a los testigos. Los tubos se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda de 95% de  $\text{CO}_2$  y 5% de aire durante 45 min, (tiempo en el cual los eosinófilos se observaron afectados), se centrifugaron a 250 g a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 min, y se realizaron 2 lavados con PBS pH 7.2 estéril centrifugándose en las mismas condiciones; se resuspendieron en 300 $\mu\text{l}$  de PBS pH 7.2 estéril, y se les adicionó azul tripano en una relación 1:1 para verificar inmediatamente la viabilidad al microscopio y a esos mismos tubos se incubaron durante 10 min, para hacer la lectura en el citómetro de flujo con  $2 \times 10^4$  células (figura 5).

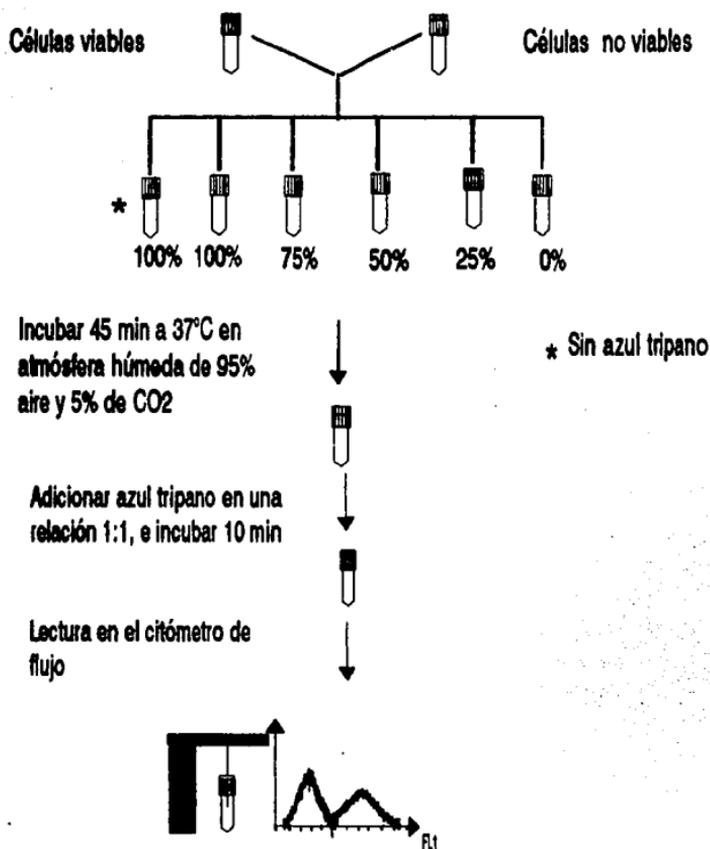
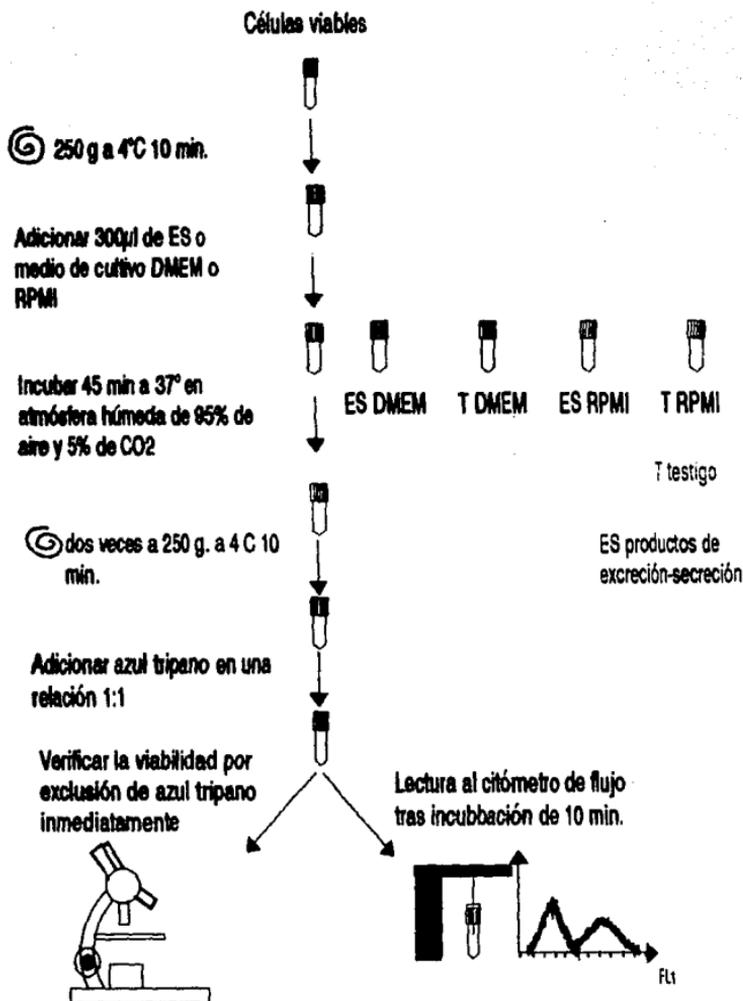


Figura 4. Combinación de células viables con células no viables para la construcción de curva patrón de viabilidad y su lectura en el citómetro de flujo.



**Figura 5.** Ensayo de citotoxicidad con los productos de excreción-secreción(ES) producidos en DMEM y RPMI, y su evaluación al microscopio y citómetro de flujo.

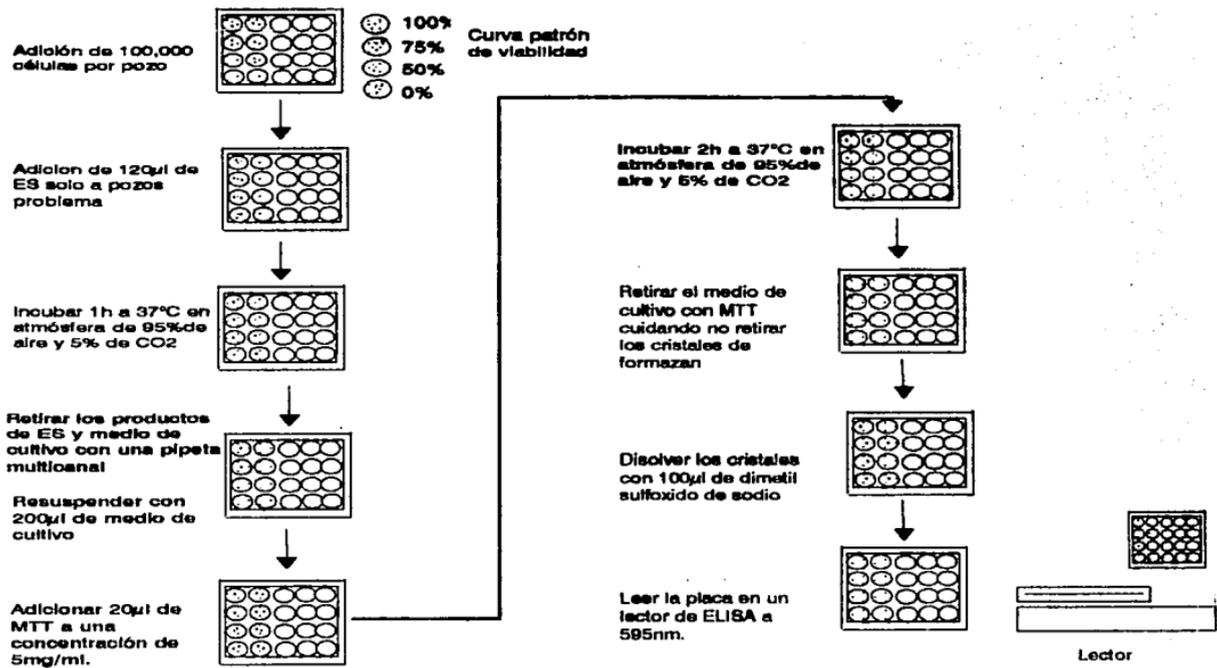
### 6.7 Determinación de la viabilidad por transformación de MTT

El MTT(3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 bromuro de difenil tetrazolio) es una sal que es transformada en las mitocondrias activas de las células viables formando un complejo de formazan en forma de cristales, que se disuelven con dimetil sulfoxido dando una coloración, que es medida espectrofotométricamente en un lector de ELISA a 595nm(Bio-rad).

Se realizaron ensayos para determinar la citotoxicidad de los productos de excreción-secreción a diferentes tiempos y concentraciones empleando en cada ensayo  $1 \times 10^5$  células.

Para medir la viabilidad por MTT se construyó una curva patrón en la que se realizaron combinaciones de células viables con células no viables (células tratadas con metanol al 50%) con el fin de tener 0, 25, 50, 75 y 100% de viabilidad. Para la realización del ensayo de citotóxicidad sobre los macrófagos se adicionaron los productos de ES producidos en medio DMEM o RPMI; también se contó con testigos los cuales sólo contenían células en medio DMEM o RPMI suplementado con antibióticos 1x. La placa se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante 30, 60 y 90min, o bien sólo 60 min, dependiendo del tipo de ensayo. Al término del tiempo se retiró todo el medio o productos de ES con una pipeta multicanal(Gilson) y se adicionaron 200µl de medio y 20µl de MTT 5mg/ml en PBS estéril pH 7.2 (Mosmann, T. 1978)

incubándose 2hrs (tiempo en el cual es transformado el MTT). Concluido el tiempo se retiró el medio con MTT cuidando de no tomar los cristales de formazan formados, enseguida los cristales fueron disueltos con 100 $\mu$ l de DMSO (dimetil sulfoxido de sodio) (Merk) y la placa fue leida a 595nm. en el lector de ELISA (Modelo 3550) (figura 6).



**Figura 6. Combinación de células viables con células no viables para la construcción de la curva patrón y ensayo de citotoxicidad con los productos de ES, evaluados por transformación de MTT.**

## 7 RESULTADOS

Regularmente la evaluación de la viabilidad es hecha por exclusión de azul tripano al microscopio, en donde se evalúa una muestra de una población de células. Esta evaluación llega a tener un cierto margen de error, pero ahora con el uso de nuevos aparatos como el citómetro de flujo y el uso del MTT es posible estandarizar otras técnicas con las cuales es posible evaluar un mayor número de células y en cierta forma con mayor exactitud, debido a que estas técnicas cuentan con una curva patrón la cual fue utilizada para interpolar el efecto de los productos de excreción-secreción sobre los macrófagos.

La curva patrón en el ensayo de citometría de flujo mostró que la diferencia poblacional (D) y el porcentaje de viabilidad al microscopio tienen una relación lineal con coeficiente de correlación de  $r=0.99$  (figura 7). Asimismo la curva patrón en el ensayo por transformación de MTT mostró que la absorbancia (transformación de MTT) y el porcentaje de viabilidad al microscopio tiene una relación lineal con coeficiente de correlación de  $r=0.99$  (figura 8).

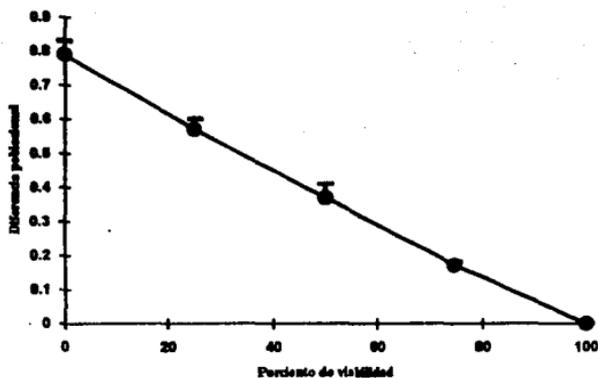


Figura 7 Curva patrón de viabilidad por citometría de flujo. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células durante 10 min con azul tripano. Coeficiente de correlación = 0.99. El círculo nos representa la media y la barra la desviación estándar del resultado de un total de 4 pruebas con 2 repeticiones cada una.

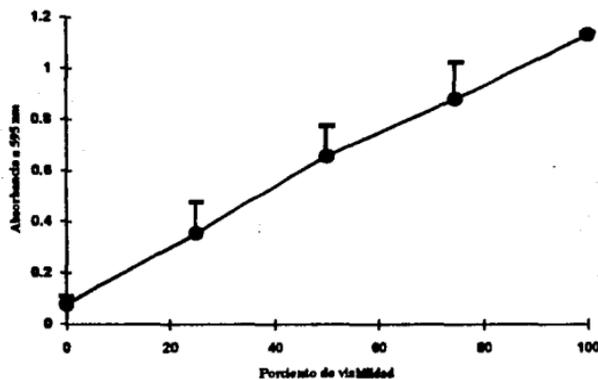


Figura 8. Curva patrón de viabilidad medida por transformación de MTT. Se incubaron  $1 \times 10^3$  células a 37 C durante 2 horas con el MTT. Coeficiente de correlación = 0.99. El círculo nos representa la media y la barra la desviación estándar del resultado de un total de 7 pruebas con 3 repeticiones cada una.

Al correlacionar la transformación de MTT y la citometría de flujo encontramos una correlación de  $r=0,996$  como muestra la figura 9. Estos resultados nos permitieron llevar a cabo la evaluación del efecto de los productos de excreción-secreción por estas dos técnicas, haciendo una interpolación en las curvas patrón de las figuras 7 y 8.

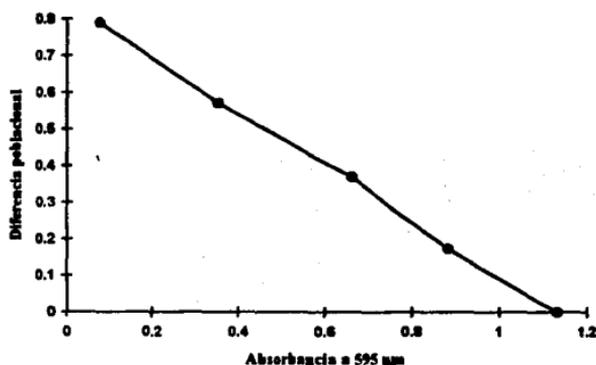


Figura 9. Correlación entre la determinación de viabilidad por la transformación de MTT y por citometría de flujo.

El porcentaje de evaginación obtenido de los cisticercos se mantuvo mayor al 85%, lo que nos indicó su buen estado para obtener los productos de excreción-secreción (ES).

En las figuras 10 y 11 se puede observar que el porcentaje de viabilidad evaluado al microscopio de células incubadas con ES producidos en medio DMEM o RPMI fue similar al observado en los grupos testigo, lo que nos indica que los productos de ES no alteraron la viabilidad de los macrófagos.

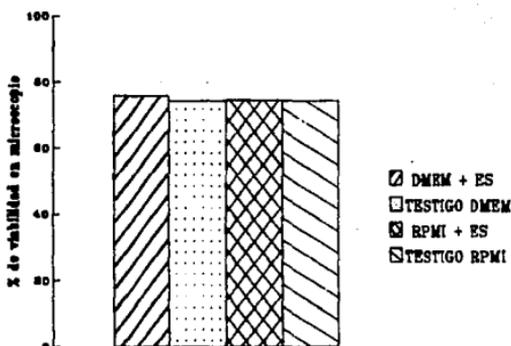


Figura 10. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM(444.ug/ml) o RPMI(223ug/ml) sobre la viabilidad de macrófagos medida al microscopio. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 min. Ensayo por duplicado.

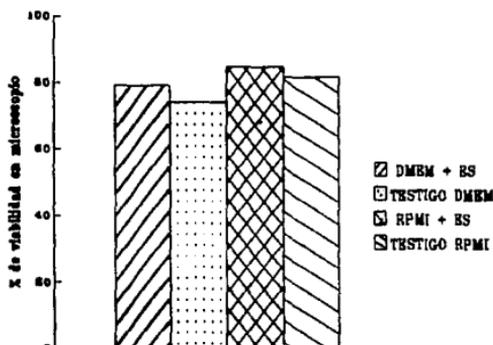


Figura 11. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM (617ug/ml) o RPMI(621ug/ml) sobre la viabilidad de macrófagos medida al microscopio. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células a  $37^\circ\text{C}$  durante 60 min. Ensayo por duplicado.

Quando fueron evaluados estos mismos tubos por citometría de flujo se pudo observar que los grupos testigo aparentemente poseen una viabilidad muy baja, además existe gran diferencia entre el porcentaje de viabilidad de los duplicados por lo que no se promediaron, es por ello que no se pudo evaluar el efecto de los productos de ES sobre la viabilidad de macrófagos (figuras 12 y 13).

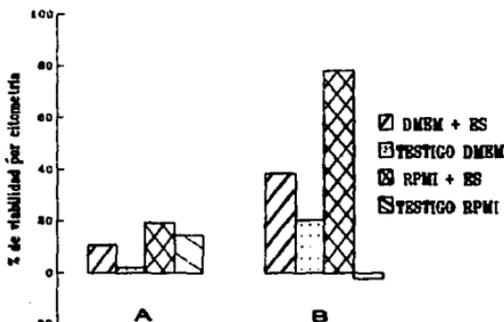


Figura 12. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM(444ug/ml) o RPMI(223ug/ml) sobre la viabilidad de macrófagos medido por citometría de flujo. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 min. A y B son duplicados del mismo experimento.

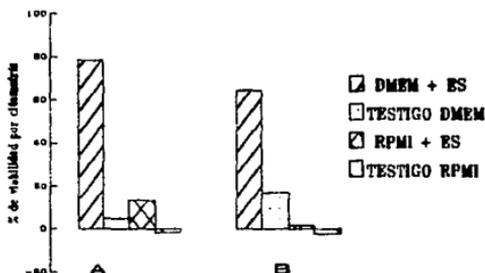


Figura 13. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM( 323ug/ml) o RPMI (260ug/ml) sobre la viabilidad de macrófagos medido por citometría de flujo. Se incubaron  $5 \times 10^5$  células a  $37^\circ\text{C}$  durante 45 min. A y B son duplicados del mismo experimento.

En las figuras 14 a la 18 se muestra el efecto de los productos de ES producidos en medio DMEM o RPMI sobre macrófagos, evaluado por transformación de MTT, en donde la viabilidad no se ve alterada aún cuando se emplearon tiempos y concentraciones superiores a las que se habían usado con eosinófilos en otro estudio donde se había observado que a una concentración de (180ug/ml) durante 45 min. de incubación la viabilidad disminuía a un 51%; lo que nos indica que los productos de ES no alteran la viabilidad de los macrófagos.

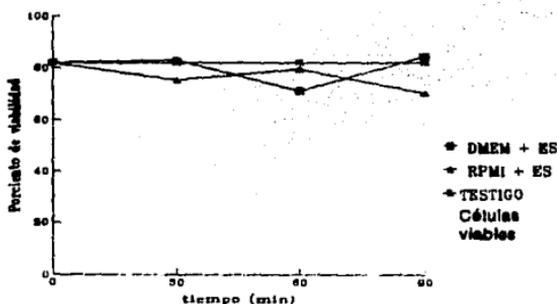


Figura 14. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM (750ug/ml) o RPMI(570ug/ml) sobre la viabilidad de macrófagos medida por transformación de MTT. Se incubaron  $1 \times 10^6$  células a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos. Ensayo por duplicado.

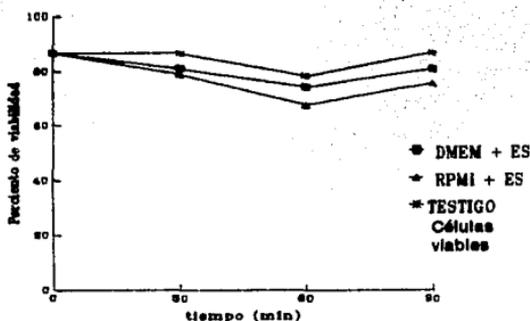


Figura 15. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM (845ug/ml) o RPMI (515ug/ml) sobre la viabilidad de macrófagos medida por transformación de MTT. Se incubaron  $1 \times 10^5$  a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes tiempos. Ensayo por triplicado.

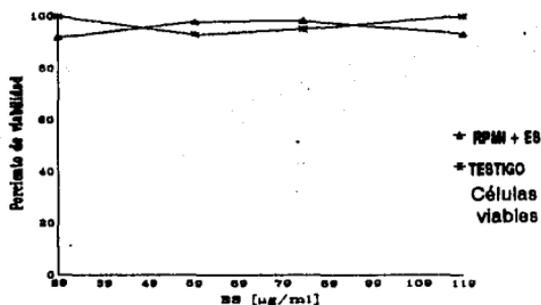


Figura 16. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en RPMI sobre la viabilidad de macrófagos medida por transformación de MTT. Se incubaron  $1 \times 10^5$  células con diferentes concentraciones de ES a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 h. Ensayo por triplicado.

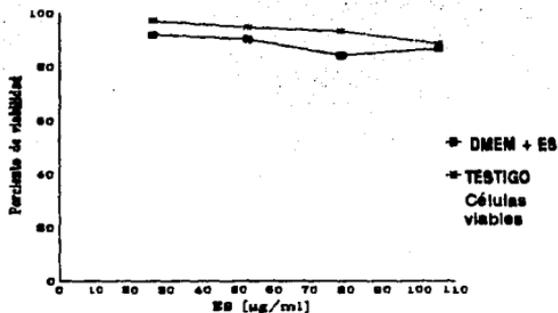


Figura 17. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM a diferentes concentraciones sobre la viabilidad de macrófagos medida por transformación de MTT. Se incubaron  $1 \times 10^5$  células durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Ensayo por triplicado.

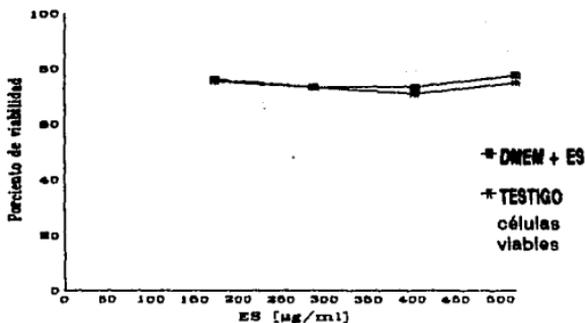


Figura 18. Efecto de los productos de excreción-secreción obtenidos en DMEM sobre la viabilidad de macrófagos medida por transformación de MTT. Se incubaron  $8 \times 10^5$  células con diferentes concentraciones de ES, incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 h. Ensayo por triplicado.

## 8 DISCUSION

El objetivo de estandarizar una técnica para evaluar la viabilidad por citometría de flujo, es debido a que: el citómetro de flujo nos permite hacer una lectura rápida, nos separa diferentes tipos de células para otros estudios y nos ofrece una serie de datos estadísticos para hacer un análisis más detallado.

El hecho de que la curva patrón representa los diferentes porcentajes de viabilidad que se manejan y que en el ensayo de citotoxicidad las células testigo posean una viabilidad muy baja, nos sugiere que en algún paso de la técnica se vio afectada la viabilidad de las mismas; las posibles causas pudieran ser: a) el número de veces que se centrifugó y se tuvo que resuspender el paquete celular, b) la posible pérdida de células al momento de decantar los tubos, y c) la adherencia de los macrófagos al tubo. Debido a lo anterior al realizar la lectura en el citómetro de flujo esté tardaba mucho y considerando que el azul tripano es citotóxico per se, se considero que el tiempo fue un factor decisivo en la determinación de la viabilidad.

El análisis realizado para evaluar el efecto de los productos de excreción-secreción sobre la viabilidad por la transformación de MTT fue posible, ya que se obtuvo una buena correlación entre la absorbancia y el porciento de viabilidad en nuestra curva patrón, así también los testigos mostraron una buena viabilidad; además la facilidad de usar

una placa nos permite trabajar todo a un mismo tiempo, empleando varios duplicados, así como el utilizar una cantidad no muy grande de células.

Al realizar el ensayo del posible efecto de los productos de ES se observó que estos no alteraban la viabilidad de los macrófagos, siendo esta observación corroborada en la evaluación al microscopio, lo que nos indica que los productos de excreción-secreción producidos por el cisticerco de *T. solium* no producen ninguna sustancia citotóxica que afecte la viabilidad de macrófagos. En otros estudios, como ya se mencionó, se ha observado que la viabilidad de los eosinófilos se ve alterada por los productos de excreción-secreción (Medina, 1992), podría pensarse que estas sustancias citotóxicas son específicas para eosinófilos, o que los macrófagos solo son inactivados y no lisados como los eosinófilos. Por otra parte se sabe que los macrófagos son células fagocíticas profesionales, por lo que nos preguntariamos si el cisticerco utiliza otro tipo de mecanismo de evasión inmune, el cual tenga que ver con su supervivencia.

Por otra parte para proveer de datos sobre los mecanismos de evasión inmune en la relación hospedero-parásito, se tiene que contemplar el problema de lo que pasa *in vivo* y lo que pasa *in vitro*, ya que la mayor parte de los mecanismos propuestos no han podido ser corroborados *in vivo*.

También debe considerarse el hecho de haber utilizado una línea celular que es de procedencia tumoral, por lo que existe la posibilidad de que los macrófagos hayan adquirido

resistencia a las posibles sustancias citotóxicas producidos por el cisticerco *T. solium*.

## 9 CONCLUSIONES

Se logró estandarizar una técnica para evaluar la viabilidad por transformación de MTT, la cual cuenta con una curva patrón para una mejor interpretación de resultados.

Las técnicas para evaluar la viabilidad por exclusión con azul tripano y transformación de MTT mostraron en nuestras condiciones que los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* no afectaron la viabilidad de los macrófagos. Aunque no se descarta la posibilidad que el parásito afecte alguna otra función del macrófago que le permita evadir la respuesta inmune del hospedero.

## 10 REFERENCIAS

- Albores, S.J., y Altamirano, M. 1971. Algunas consideraciones sobre 9,412 autopsias realizadas en el hospital general de México. Rev. Invest. Salud. Publ. 31.1.
- Albright, J.W., y Albright, J.F. 1980. Tripanosome-mediated suppression of murine humoral immunity independent of typical suppressor cells. J. Immunol. 124. 2481.
- Aluja, A. 1982. Frecuency of porcine cysticercosis in México. En : A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, y F. Beltrán(eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 53-62.
- Aluja, A., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J.P., Larralde, C., Madrazo, J. I., Velazquez, V., y Willms. 1987. Cisticercosis. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. pp.14-18.
- Aluja, A., y Vargas, G. 1988. The histopatology of porcine cysticercosis. Vet. Parasitol. 28: 65-77.
- Aluja, A., 1989. La histopatología de la cisticercosis porcina. En: A. Flisser y F. Malagón (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega México D.F. pp. 147-156.
- Ben-Ismael, R., Mulet-Clamagiran, C., Carne, B. y Gentilini, M. 1982 Biosynthesis Of A. H. and Lewis blood group determinants in *Fasciola hepatica*. J. Parasitol. 68: 402.
- Bradford, M. 1976. Arapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Nature. 329: 21.
- Butterworth, A:E. 1979. The eosinophil and its role in immunity to helminth infection. Current Topics in Microbiology and immunology. 77: 127-128.

- Cañedo, L., Laclette, J.P., y Morales, E. 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium* En: A, Flisser., K, Willms., J, P, Laclette., C, Larralde., F, Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp. 363-374.
- Cárdenas, F. Cisticercosis intraocular. 1989. En: Flisser, F. Malagón., Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México, Limusa-Noriega, México, D.F. pp. 69-76.
- Correa, D., Laclette, J.P., Rodriguez D.R. Merchant M., y Flisser A 1987. Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pig. J parasit. 73: 443-445.
- Correa, D, Dalma, D., Espinoza B, Plancarte, A, Rabiela, M.T., Madrazo, I., Gorodesky, C., y Flisser, A. 1985. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. J. Parasitol. 71: 535-541.
- Costa, F., y Zousa, W. 1988. The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomona foetus* with Epitelial Cell in vitro. Cell structure and Funtion. 13: 301-310.
- Díaz de León, L., Arcos, L., y Willms, K.1982. The use of cell-free systems for the characterization of *cysticercus cellulosae* antigens. En: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., y Beltran, f. (eds): Cysticercosis: presen state of knowledge and perspectives. Academic Press,. Nueva York. pp. 465-476.
- Diaz, S. 1983. Síntesis de anticuerpos en la reacción inflamatoria en el cisticerco de *Taenia solium* en el músculo porcino. Tesis(Maestría). Facultad de medicina, UNAM.
- 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: 58-63.
- Dorfsman, J., 1963. The radiology aspects of cerebral cysticercosis. Acta Radiol. 1: 836-842.
- Dulbecco, R., y Freeman, G. 1959. Virology. 8, 396.

- Espinoza, B., Ruiz-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: 536-541.
- Faubert, G.M. 1976. Depression of the plaque-forming cells to sheep red blood cells by the newborn larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunology* 30: 485.
- Flisser A., Woodhouse E., y Larralde, C. 1980. Human cysticercosis: antigen, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 27-37.
- Flisser, A., y Larrelde, C. 1986. Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México D.F. pp. 226.
- Flisser, A., Madrazo I., Gonzalez, D., Sandoval M. A., Rodriguez, J. 1988. Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. *Trans. Roy. Soc. Trop. Hyg.* 82: 739-742.
- Flisser, A., 1989. Tratamiento de cisticercosis porcina con praziquantel. En: Flisser, A., y Malagón, F, (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega. México D.F. pp. 227-230.
- Flisser, A., González, D., Skurovich, M., Madrazo, Y., Correa, D., Rodríguez-Carvajal, E., Cohen, S., Rodríguez-Del Rosal, E., Collado, M., Fernandez, B., Fernandez, F., Aluja, A. 1990. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. I. Radiological, physiological and histopathological studies. *Parasitol. Res.* 76: 263-269.
- Furth, R.V., Schadewijk, M.V.-Niewstad., Elzenga-Classen., Cornelisse, C., y Nibberrin, P. 1985. Morphological, cytochemical functional and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell lines, *Cell. Immunol.* 90: 339-357.

- García-Domínguez, C., Correa, D., Rabiela, M.T., y Flisser, A., 1991. Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis. 4. Reversible in vitro effect. Parasitol. Res. 77: 691-696.
- Hammerberg, B., Dnagler C., y Williams, J.F. 1980 *Taenia taeniiformis*: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. J Parasit. 66: 569-574.
- Hayunga, E., Sumner, M., y Letonja, T. 1989. Evidence of selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia Taeniaeformis*. J. Parasit. 75: 638-642.
- Kamal, K.A. e Higashi, G. 1982. Suppression of mitogen induced lymphocyte transformation by plasma from patients with hepatosplenic *Schistosoma mansoni*; role of immune complexes. Parasite Immunol. 4: 283.
- Karavadin, L.M. y Ash, L.R. 1982. Inhibition of adherence and cytotoxicity by circulating immune complexes formed in experimental filariasis. Parasite Immunol. 4: 1.
- Kemp, W.M., Merritt, S.C., BoGucki, M.S. Rosier, J.G. y Seed, J.R. 1977. Evidence for adsorption of heterospecific host immunoglobulin on the tegument of *Schistosoma mansoni*. J Immunol. 119: 1849.
- Lacllette, J.P., Ornelas, Y., Merchant, M.T. y Willms, K. 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *taenia solium* eggs. En : A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacllette, C. Larralde, C. Ridaura, y F. Beltrán(eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 375-388.
- Lacllette, J.P., Merchant, M.T., y Willms, K. 1987. Histological and ultra structural localization of antigen B in the metacystode of *Taenia solium*. Parasit 73: 121-129.
- Lacllette, J.P., Rodriduez, M., Landa., Arcos, L., Willms, K., Alba De P., Mancilla, R., y Willms, K. 1989. The coexistence of *Taenia solium* cysticercosis and the pig: Role of antigen B. Acta Leidensia 57 (2): 115-122.

- Lacleste, J.P., A. Landa., Arcos, L., Willms, K., Davis, A.E., y Shoemaker. C.H. 1991 Paramosin in the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium*. Mol. Biochem. Parasitol. 44: 287-296.

- Lacleste, J.P., Shoemaker. C.H., Richter. D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, S., Bing, D., y Nicholson-Weller. 1992 Paramosin inhibits complement C1. J. Immunol. 148: 124-128.

- Larralde, C., Montoya, R, M., Scuitto, E., Díaz, M, L., Govezensky, T., y Coltorti, E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting whit sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am J. Trop. Med. and Hyg. 40: 284-292.

- Lowry, O.; Rosebrough, N., Farr, A., y Randall, R. 1951. Protein measurement with foliphenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

- Lumsdem, R.D., Voge, M., y Sogandares-Bernal, F. 1982. The metacestode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interaction with the host. En : A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, y F. Beltrán(eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 307-362.

- Mahajan, R,H. 1982. Geographical distribution of human cysticercosis. En: A. Flisser., K. Willms., J. P. Lacleste., C. Larralde., F. Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp.39-46.

- Mandujano, A. 1991. Tesis de licenciatura. Presencia de un receptor para la fracción Fc de IjG en el cisticerco de *Taenia solium*. México D.F. pp. 44.

- Medina , M, E., 1992. Tesis de licenciatura. Efecto de los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre eosinófilos in vitro. U.N.A.M. Facultad de ciencias. México D.F. pp. 53.

- Moore, G. E., Gerne, R. E., y Franklin, H. A. 1967. J. Am. Med. Assoc. 199, 519.

- Mosmann, T. 1982 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol Methods. 65: 55-63.

- Murrel, K.D. y Graham, C.E. shedding of antibody complexes by *Strongyloides ratti* (Nematoda) larvae. J. Parasitol. 67: 476-480;1983.

- Nowotny, A. 1979. Basic exercise in immunochemistry. Springer-Verlag., Berlin. pp 272-274.

- Olivo A., Plancarte A., y Flisser A. 1988. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. Int. J. Parasit. 18: 543-545.

- Plancarte, A., Flisser A., y Larralde C. 1983. Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium*. Cytobios. 36: 83-93.

- Rabiela-Cervantes M.T., Rivas Hernandez A., Rodriguez-Ibarra J, Castillo-Medina S., y Cancino F.M. 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: A. Flisser., K. Willms., J.P. Lacllette., C Larralde., C. Ridaura., Y F. Beltrán(eds.) Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp.179-200.

- Ramírez- Bon., Merchan, M.T., González-Del Pliego, M., y Cañedo, L. 1982. Neural and excretory structures of *Cysticercus cellulosae* En: A. Flisser., K. Willms., J. P. Lacllette., C. Larralde., F. Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp. 261-280.

- Sarti-Gutiérrez, E., Schantz P.M., Lara-Aguilera, R., Gómez-Dandoy, H., y Flisser, A. 1988. *Taenia solium* teniasis and cysticercosis in a Mexican village. Trop. Med. Parasit. 39, 194-198.

- Sealey M., Ramos C., Ortiz-Ortiz L., y Willms K. 1981. *Taenia solium*. Mitogenic effects of larval extracts on murine B lymphocytes. *Parasite Immunol.* 3: 299.
- Schantz P.M., Shanks D., y Wilson M. 1980. Serologic cross-reaction with sera from patients with echinococcosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22: 609-612.
- Schantz P.M., Sarti-Gutierrez. 1990. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia.* 57: 153-163
- Schenone, H., Villarroel, Rojas, A., y Ramírez, r. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin América. En: A. Flisser., K. Willms., J. P. Laclette., C. Larralde., F. Beltrán (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York. pp. 25-38.
- Slais. 1982. Morphology of the scolex of *Cysticercus cellulosae* in brain cysticercosis. En: C. Ridaura., A. Flisser., K. Willms., J. P. Laclette., C. Larralde., F. Beltrán (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York. pp. 235-260.
- Sadowski, D., Steer, J., Clothier, R.H., y Balls, M. 1993. An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods.* 157: 203-207.
- Smith, J. D., Freeman, G., Vogt, M., y Dulbecco, R. 1960. *Virology* 12, 185.
- Soulsby, E. J. L. 1988. *Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos.* Ed. Interamericana. 7ªed
- Torres, A., Plancarte, A., Villalobos, A.N.M., Aluja, A., Navarro, R., y Flisser, A. 1992. Preaziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 3. effect of 1-day treatment. *Parasitol Res.* 78: 161-164.
- Tsang V.C.W., Brand J.A., Y Boyer A.E. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis of *Taenia solium*. *J. Infect. Dis.* 59: 50-59.

-Varela-Díaz, V.M, y Coltorti, E.A. 1973. The presence of host immunoglobulins in hidatid cysts membranes. J. Parasitol. 59: 484.

- Willms, K., y Arcos, L. 1977. *Taenia solium*. host serum proteins on the cyst icercus surface identified by an ultrastrutural immuno-enzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396-401.

- Willms, K., Merchant, M. T. 1980. The inflamatory rection surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and ligh microscopic observation. Parasite Immunol. 2: 261-268.

- Willms, K., Merchant, M. T., y Diaz-Arcos L. 1982 Host-Parasite interface in the metacestode of *Taenia solium* Cisticercosis: present state of knowledge and perspectives, Academic Press Inc. pp. 397-411.

- Woodhouse, E., Flisser, A., Larralde, C., 1982. Seroepidemiology of human cysticercosis in México. En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, y F. Beltran (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Aqcademic. Press. New York. pp. 11-24.

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