



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DE LAS ESTIRPES
CELULARES EN UNA INFECCIÓN CON
METACESTODOS DE *Taenia crassiceps*.
1.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA CELULAR
POR CITOMETRIA DE FLUJO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA:
NADIA ZEPEDA CÓRDOVA

TUTOR
DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO

2010.



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DE LA ALUMNA

Nadia
Zepeda
Córdova
55863173
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
403053564

2. DATOS DEL TUTOR

Dr.
José Luis
Molinari
Soriano

3. DATOS DEL SINODAL 1

Dra.
Ingeborg Dorotea
Becker
Fauser

4. DATOS DEL SINODAL 2

M en C
Ana Lucía
Sereno
Uribe

5. DATOS DEL SINODAL 4

M en C
Natalia Ivanovna
Copitin
Niconova

6. DATOS DEL SINODAL 5

M en C
Sandra Georgina
Solano
Gálvez

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

Caracterización de las estirpes celulares en una infección con metacéstodos de *Taenia crassiceps*. 1.- estudio de la cinética celular por citometría de flujo.

74 p
2010

GRACIAS...

... A mis papas, Arnulfo Zepeda y Ma. Esther Córdova, por darme libertad de decidir y por apoyarme e impulsarme a alcanzar mis objetivos.

... A mi papá por enseñarme el amor a la ciencia y por ser ejemplo de perseverancia.

... A mi mamá por enseñarme el valor de ser mujer, por todos sus sacrificios hechos para ayudarme a ser una mejor persona, siempre creciendo.

... A mis hermanos; a Nusko, por su protección, cuidado y por mantenerse en contacto a pesar de la distancia; a Raúl, por ayudarme a lidiar con los problemas e intentar encausar mi rumbo y a Adrián, por crecer a mi lado, su protección y todo su amor incondicional.

... A Fer por darme su amor, comprensión, cariño, confianza, por impulsarme día con día y caminar siempre juntos hacia adelante.

... A la Biól. Lucia Méndez Sánchez por ser mi confidente, muchas veces mi cómplice, por su consuelo, por todas las noches de desvelo y por su eterna amistad.

... A mis amigas Violeta, Mónica y Gabriela por compartir sueños desde la infancia.

... A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar, por todo el conocimiento brindado y por la libertad de pensamiento y expresión.

... Al Dr. José Luis Molinari por su apoyo en la realización de este proyecto, la motivación, la oportunidad y confianza de pertenecer a este grupo de trabajo.

... A la M en C Natalia Ivanovna Copitin por su apoyo incondicional, su ejemplo de disciplina y especialmente por la corrección crítica y minuciosa de esta tesis.

... A la M en C Sandra Georgina Solano por su paciencia y su tiempo al transmitirme sus conocimientos técnicos y por su continua colaboración.

... A los miembros del jurado, la Dra. Ingebor D. Becker y la M en C Ana Lucía Sereno por sus valiosas aportaciones y la revisión constructiva a este trabajo.

... A los integrantes del laboratorio 303 ote. del IFC, la Biól. Maricarmen Gonzales por su excelente amistad y compañerismo y a María Hepifania Martínez por su constante asistencia.

... A la Dra. Patricia Tato, a la Dra. Ana María Fernández y a la Dra. Lilián Hernández por proporcionarme tiempo y espacio para la realización de mis experimentos.

INDICE.

Contenidos.	Página.
Portada	I
Datos del jurado	II
Agradecimientos	III
Índice	IV
Resumen	1
Introducción	2
1. <i>Taenia solium</i> .	2
1.1 Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	2
1.2 Cisticercosis en el humano	4
2. <i>Taenia crassiceps</i> .	7
2.1 Ciclo de vida de <i>T. crassiceps</i>	7
2.2 Importancia de <i>T. crassiceps</i>	9
3. Respuesta inmune	10
4. Evasión de la respuesta inmune	10
5. Proteasas	12
5.1 Cisteín proteasas	13
5.2 Serín proteasas	14
6. Apoptosis	16
6.1 Cambios en las células apoptóticas	17
6.2 Fases de la apoptosis	18
6.2.1 Fase iniciadora	18
6.2.2 Fase efectora	18
6.2.3 Fase de eliminación o degradación	19
6.3 Caspasas	20
6.4 Vías de activación de las caspasas	21
6.4.1 Vía intrínseca	21
6.4.2 Vía extrínseca	21
Antecedentes	23
Hipótesis	25

Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
Metodología	26
1. Parásitos e infección	26
2. Obtención de células del proceso inflamatorio	28
3. Diferencial	28
4. Anticuerpos monoclonales	28
5. Tinción de células con diferentes anticuerpos	29
6. Análisis por citometría	29
7. Determinación de la actividad de la caspasa 3	30
8. Purificación de ADN celular de bajo peso molecular	31
9. Electroforesis para ADN celular	32
10. Detección de apoptosis por medio de TUNEL	32
11. Determinación de la actividad enzimática de cisteín y serín proteasas	34
12. Efecto de la cisteín proteasa secretada por cisticercos de <i>T. crassiceps</i> sobre linfocitos de bazo de un ratón hembra Balb/c sano.	35
13. Microscopía electrónica	38
14. Estadísticas	38
Resultados	40
1. Número de células	40
2. Diferencial	41
3. Macrófagos y eosinófilos	41
4. Linfocitos	44
5. Caspasa 3	47
6. Escalera ADN	48
7. TUNEL macrófagos y eosinófilos	49
8. Actividad de proteasas	52
9. TUNEL linfocitos	52
10. Microscopía electrónica	54
Discusión	56
Conclusión	60
Abreviaturas	62
Bibliografía	64

RESUMEN.

Al analizar las células peritoneales de ratones infectados con metacéstodos de *Taenia crassiceps* se encontraron diversas estirpes celulares como son: macrófagos, eosinófilos, linfocitos T y linfocitos B. Al comparar el número de células, de las diversas estirpes, con el número de células peritoneales de un ratón sano (durante 16 días), se observó que el número de macrófagos aumentó; aparecieron los eosinófilos y los linfocitos disminuyeron drásticamente.

Las células inflamatorias peritoneales de ratones infectados intraperitonealmente con metacéstodos de *T. crassiceps*, marcadas con anticuerpos monoclonales fluorogénicos anti-ratón CD4+, CD8+, CD19+ y CD14+ se analizaron por citometría de flujo. La apoptosis fue estudiada con ensayos de Annexin A/PI, TUNEL, fragmentación de ADN, actividad de Caspasa 3 y microscopía electrónica. Los resultados revelaron una apoptosis significativa de células CD4+ y eosinófilos en diferentes tiempos post-infección. Los co-cultivos de metacéstodos vivos y células de bazo de ratón sano mostraron una apoptosis significativa de células CD4+ ($P < 0.001$). La apoptosis disminuyó significativamente ($P < 0.001$) cuando se añadió E-64 (un inhibidor específico de cisteín proteasas) a los co-cultivos. Los resultados sugieren que la cisteín proteasa tiene un efecto patogénico en la cisticercosis.

Palabras clave: *Taenia crassiceps*, linfocitos, macrófagos, apoptosis, cisteín proteasa



INTRODUCCIÓN.

1. *Taenia solium*.

La infección por *Taenia solium* es una zoonosis parasitaria de gran importancia en el país. *T. solium* es un parásito de la clase cestoda del Phylum Platyhelminthes, de la familia Taenidae, es causante de la taeniosis en su estadio adulto y de la cisticercosis en su estadio larvario (Schmidt et al. 1988). La prevalencia es elevada en países en vías de desarrollo de Latinoamérica, Asia y África; y se está incrementando en países industrializados debido a la inmigración (Evans et al. 1997), en México presenta la mayor seroprevalencia en las regiones centro occidental y sureste del país (Larralde et al. 1990).

1.1. Ciclo de vida de *T. solium*.

Los humanos son los únicos hospederos definitivos de la taenia y son los únicos liberadores de huevos de taenia que pueden producir cisticercosis porcina y humana (García et al. 2005). El adulto está alojado en el intestino delgado; su cuerpo delgado, aplanado llegando a medir de 10 a 12 m de largo; se compone de 3 partes: Escolex, cuello y estróbilo; el estróbilo está dividido en proglótidos inmaduros, maduros y grávidos. Los inmaduros se caracterizan por tener los órganos de reproducción sexual no desarrollados, los maduros ya tienen los órganos de reproducción sexual maduros (en un proglótido hay testículos y óvulos por lo que puede haber autofecundación), una vez que ocurre la fecundación se producen cientos de huevos que llenan el proglótido al cual se le llama grávido. Un proglótido grávido tiene de 50,000 a 60,000 huevos fértiles (Faust et al. 1982),



cada huevo mide 40 μm . Los proglótidos grávidos se desprenden de la parte distal del gusano y son expulsados junto con las heces. En zonas rurales donde se practica el fecalismo al aire libre se contamina agua, suelo y alimentos; en estas mismas zonas hay crianza de cerdos, conocidos como de traspatio. La gente cría estos animales para que limpien el traspatio de las deyecciones humanas, ya que en estas zonas la gente defeca al aire libre. Cuando estos animales ingieren materia fecal proveniente de un paciente de taeniosis que contengan huevos del parásito, se convierten en hospederos intermediarios. Una vez en el estómago del cerdo, los huevos sufren la pérdida de su embrioforo gracias a los jugos gástricos y las oncosfera pasan al duodeno. Aquí, los jugos biliares y pancreáticos eliminan la capa de lípidos del exterior de la membrana que recubre al embrión hexacanto, permitiendo la entrada de agua y nutrientes al interior. Esto permite la activación de los embriones los cuales rompen la membrana con sus ganchos y se liberan de su envoltura (Molinari et al. 1998). Ya liberados los embriones atraviesan la mucosa intestinal y viajan por el torrente sanguíneo infectando preferentemente los músculos del cerdo. El ciclo se completa cuando el humano consume carne de cerdo parasitada con metacéstodos e insuficientemente cocida (Fig. 1).



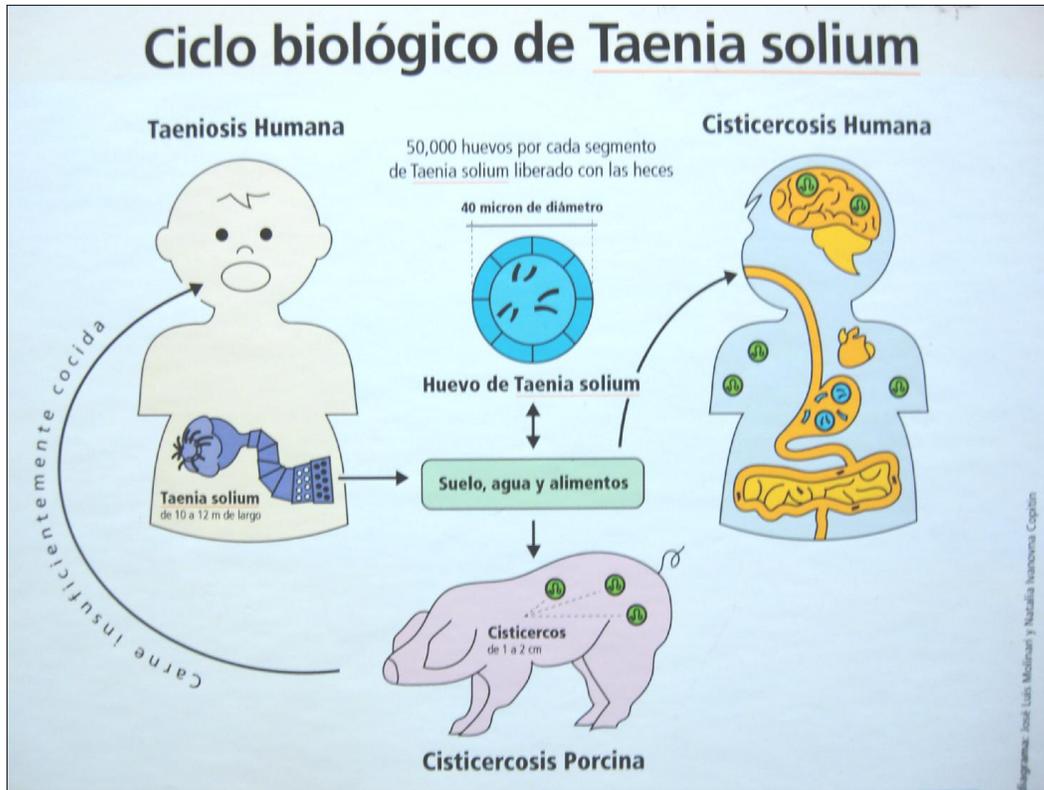


Figura 1. Ciclo de Vida de *Taenia solium* (Natalia Copitin)

1.2. Cisticercosis en el humano.

La cisticercosis causada por metacéstodos de *T. solium* (cisticerco) es una infección que afecta comúnmente a cerdos, humanos y con menos frecuencia a otros animales como perros (Ito et al. 2002). El ser humano se infecta al consumir alimentos contaminados con huevos de *T. solium* y desarrolla la cisticercosis. La neurocisticercosis (NCC) la entidad clínica más importante en el humano es más frecuente en las zonas rurales o conurbadas que rodean a las grandes ciudades que existen en el país y que generalmente implican diferentes condiciones sociales, económicas, culturales y sanitarias. Algunos factores que mantienen activas las enfermedades producidas por *T. solium* son la falta de higiene personal, el fecalismo al aire libre, la crianza rústica de cerdos, la inadecuada



inspección sanitaria de la carne, el consumo de carne de cerdo infectada y mal cocida, la venta clandestina de carne de cerdo, el contacto con una persona portadora del cestodo adulto (taeniasico), el consumo de agua contaminada y alimentos contaminados. La cisticercosis humana ocurre en muchos tejidos del cuerpo humano, pero se vuelve sintomático casi exclusivamente en el sistema nervioso central (SNC) o en el ojo (Nash et al. 1984). Cuando el cisticerco se encuentra en el SNC es causante de la Neurocisticercosis (NCC) que se caracteriza por diversos signos y síntomas como: cefalea, convulsiones, trastornos en la conducta e hipertensión intracraneana entre los más importantes.

El parásito adulto permanece durante muchos años en el intestino del ser humano sin ser detectado y sin que se exprese ningún síntoma propio de la parasitosis. Por el contrario, los metacéstodos en los músculos desencadenan una reacción inflamatoria a su alrededor entre el 1er. y 3er. mes postinfección, las células inflamatorias invaden al parásito y lo transforman de vesicular a coloidal luego a caseoso y finalmente puede calcificarse. Existe un estudio en donde se revisan 20, 206 protocolos de autopsia dentro de los cuales, 481 de estos casos presentan NCC. Cuando el parásito se encontró bien conservado, la reacción inflamatoria fue escasa. En cambio, cuando estaba muerto, la inflamación fue invariablemente granulomatosa con células gigantes multinucleadas (Villagran y Olvera, 1988). Las manifestaciones clínicas causadas por la cisticercosis dependen del número, localización, tamaño y viabilidad o estado de degeneración del metacéstodo. Frecuentemente hay múltiples metacéstodos en varios lugares y estadios por lo que los síntomas clínicos pueden variar particularmente en cada caso (García et al. 2005). Además del impacto en la salud humana, esta enfermedad, implica



también aspectos socioeconómicos a consecuencia de la discapacidad del paciente así como de los costos de su diagnóstico y tratamiento.

El diagnóstico de la NCC puede ser por imagenología: tomografía computarizada o resonancia magnética, inmunológico (ELISA) e inmuno-trasferencias. La tomografía computarizada y la resonancia magnética dan una evidencia objetiva en cuanto al número y la localización del metacétodo intracraneal, su viabilidad y la gravedad de la reacción inflamatoria contra el parásito (García et al. 2003). Los avances en el diagnóstico serológico incluyen la identificación y la síntesis de antígenos específicos para obtener resultados consistentes y altamente sensibles en formas prácticas que no dependen de un suministro continuo de materiales del parásito (García et al. 2005). La detección de antígenos circulantes del parásito reflejan la presencia de parásitos vivos, estableciendo la presencia de una infección viable en curso, en ausencia de las características radiológicas definitivas, y puede permitir verificaciones cuantitativas para un tratamiento exitoso (Estrada et al. 1985, Correa et al. 1989).

López et al. (2004) encontraron que hay una relación muy cercana entre altos niveles de IgG específica en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con NCC (detectada por medio de ensayos inmunobiológicos, ELISA y EITB, utilizando antígenos de E/S de parásito) y la presencia de metacétodos en estadio vesicular (detectado mediante tomografía computarizada y resonancia magnética). En contraste, los líquidos cefalorraquídeos de pacientes con NCC exclusivamente con estadios coloides, granulomatosos o calcificados resultaron negativos, lo mismo que LCR de pacientes con otro tipo de enfermedad neurológica. Estos resultados sugieren el uso de estos antígenos para su uso en zonas económicamente



deprimidas, donde no existe el recurso de la imagen por resonancia magnética o tomografía computarizada.

2. *Taenia crassiceps*.

La elevada frecuencia de la cisticercosis y la neurocisticercosis y las graves consecuencias que ocasionan, justifican la búsqueda de estrategias que permitan prevenirla. Debido a la dificultad de estudiar la cisticercosis en el humano y considerando las complicaciones económicas y experimentales asociadas a las investigaciones con cerdos, se adoptó un modelo de cisticercosis experimental murina, causada por *Taenia crassiceps*.

2.1. Ciclo de vida de *T. crassiceps*.

T. crassiceps pertenece al phylum platelminte, clase cestoda, cuya fase adulta habita en el intestino del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) de Europa y Norteamérica, aunque también se han encontrado en otros cánidos como coyotes, perros y ocasionalmente en gatos (Gourbal et al. 2001, Wünschmann et al. 2003). El parásito adulto llega a medir de 70 a 140 mm de largo y 2.4 mm de ancho. Presenta un escolex constituido por cuatro ventosas y un rostelo o corona formado por dos anillos de 32 a 36 ganchos rostelares ordenados en 2 filas. Los ganchos grandes que miden de 155 a 187 μm y los ganchos chicos que miden de 107 a 142 μm tienen unas cuchillas largas que son características de la especie. El gusano llega a la madurez sexual a las 6 semanas y los huevos son expulsados junto con las heces del hospedero. Pequeños roedores ingieren estos huevos, al eclosionar, los embriones migran al sitio de desarrollo, generalmente a un foco



subcutáneo o a la cavidad pleural y comúnmente menos a la cavidad abdominal (Freeman, 1962). El parásito pasa a la fase de metacéstodo, conocida también como *Cysticercus longicollis* (Freeman, 1962), para posteriormente multiplicarse asexualmente por gemación. Cuando un cánido se alimenta de un roedor infectado, se completa el ciclo, el metacéstodo llega al intestino delgado del cánido y pasa a la fase de adulto (Fig. 2).

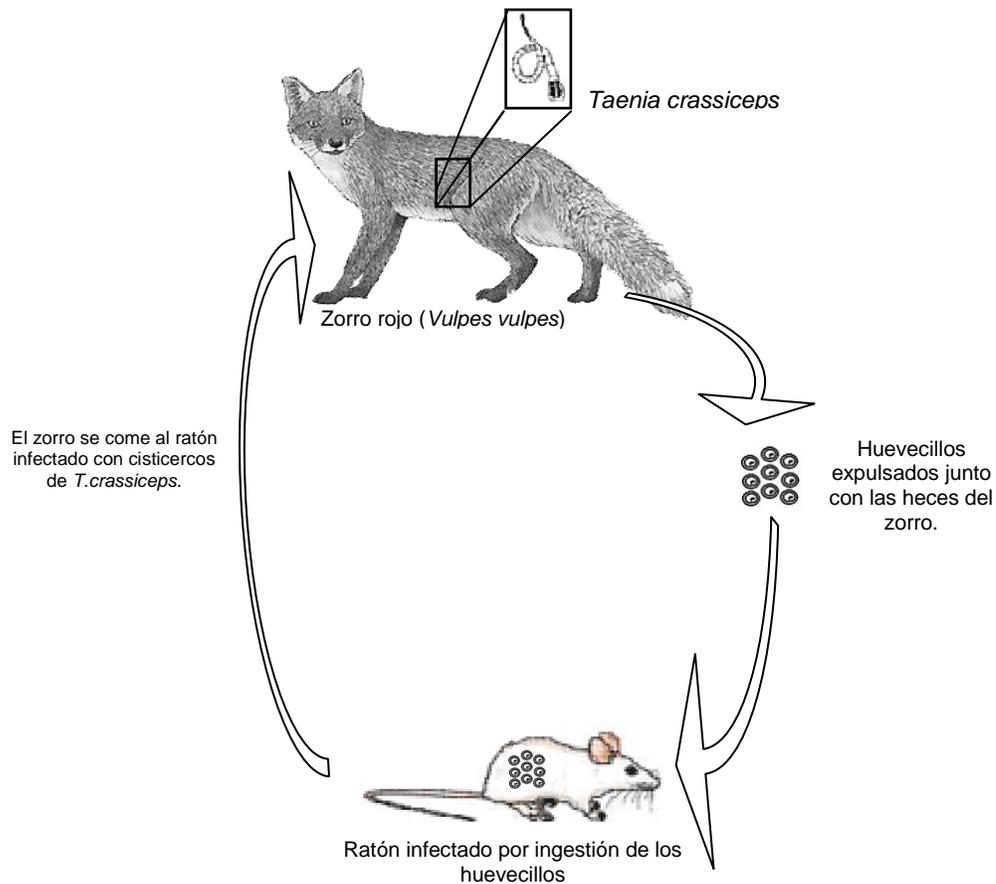


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia*



2.2. Importancia de *T. crassiceps*.

El modelo murino se adoptó porque tiene varias ventajas por ejemplo, el metacéstodo de *T. crassiceps* crece natural y experimentalmente en el ratón, lo cual es fácil de manejar en el laboratorio, presenta un tipo de reproducción por gemación que permite obtener en 2 – 3 meses una gran cantidad de parásitos para su estudio y aplicaciones de manera extensa (Hernandez, 1998), no mata a su hospedero aún cuando continúa multiplicándose hasta que la carga parasitaria supera al peso del propio ratón después de meses de infección. Se pueden obtener grandes cantidades de antígeno, que se podría usar para el diagnóstico inmunológico de cisticercosis por *T. solium*. Espindola et al. (2005) purificaron dos proteínas de 18 y 14 KD de *T. crassiceps*, obtenidas con una cromatografía de inmunoafinidad; 43 muestras de pacientes con NCC confirmada (23 muestras de líquido cefalorraquídeo y 20 muestras de suero) fueron analizadas mediante un ensayo inmunológico (ELISA), usando como antígeno las proteínas purificadas y obteniéndose una sensibilidad del 100%. Ishida, et al (2006) utilizaron como antígeno una glicoproteína de *T. crassiceps*, la cual mostró una sensibilidad del 80% y mejor especificidad que antígenos de *T. crassiceps* de líquido vesicular en el diagnóstico de la NCC mediante un ELISA.

Los metacéstodos de *T. crassiceps* raramente infectan al humano, se han presentado algunos casos clínicos, principalmente en personas que conviven mucho con perros en comunidades rurales y en personas inmuno-suprimidas por enfermedades como el VIH. (François et al. 1998)



3. Respuesta inmune.

La respuesta inmune está asociada con altos niveles de eosinofilia, leucocitosis y una disminución notable de las células cebadas en el peritoneo de ratones inoculados con el parásito (Freeman, 1964). Se ha sugerido que la respuesta temprana Th1 es mejor para controlar el crecimiento del parásito y la respuesta tardía Th2 es inefectiva. Estudios realizados en otros modelos de parásitos helmintos, han mostrado que la respuesta Th2 favorece la resistencia de la infección (Locksley, 1994). Rodriguez - Sosa et al. (2004) hicieron un estudio en donde demostraron que al infectar ratones STAT6^{-/-} con *T. crassiceps*, estos desarrollaban una fuerte respuesta tipo Th1 en ausencia de una respuesta Th2 y controlaron la infección; también infectaron ratones STAT4^{+/+} y STAT4^{-/-}, los primeros controlaron la infección, después de varias semanas de infección se encontraron pocos parásitos en el peritoneo y los segundos fueron susceptibles a la infección probablemente por la incapacidad de sus macrófagos de producir adecuadamente citocinas pro-inflamatorias y óxido nítrico. La respuesta tardía de tipo Th2 es compatible con la reproducción permisiva al parásito.

Es probable que tanto la respuesta inmune asociada a la parasitosis como la composición genética del hospedero jueguen un papel fundamental en la patología de esta enfermedad, aunque muchos de los mecanismos involucrados son aún desconocidos.

4. Evasión de la respuesta inmune.

Se ha mostrado que algunos parásitos helmintos, incluyendo los cestodos, secretan productos que tienen efectos inmunorreguladores en sus hospederos



(Spolski et al. 2000). Por ejemplo, las secreciones de *Brugia malayi* inhiben la proliferación de células T a través de la inducción de una población supresora de células del exudado peritoneal (Allen et al. 1998). La regulación de la respuesta inmune del hospedero es un mecanismo común en las infecciones por parásitos. Los productos de secreción/excreción (E/S) de nemátodos, tremátodos y céstodos contribuyen a las estrategias de evasión inmune de los parásitos a través de mecanismos que incluyen el cambio de células y de ligandos sobre la superficie, alteración de la función de linfocitos, macrófagos, granulocitos, modulación del complemento y otras respuestas inflamatorias del hospedador (Lightowlers et al.1988).

Molinari et al. (1990) aislaron una molécula de bajo peso molecular (<3500 Da), de los productos de excreción / secreción de los metacéstodos de *T. solium*, al que llamaron factor de cisticerco (CF). Cultivaron linfocitos esplénicos humanos estimulados con fitohemaglutinina con diferentes dosis de CF y encontraron una disminución significativa en la incorporación de timidina (^3H), lo cual quiere decir que hubo una disminución significativa en la capacidad de proliferación de estos linfocitos.

Los productos de E/S de los metacéstodos de *T. crassiceps* regulan la respuesta inmune del hospedero. Los productos de E/S obtenidos de metacéstodos de infecciones tempranas o agudas inhiben la proliferación de los linfocitos T CD4 y su producción de citocinas. Sin embargo, los productos obtenidos a partir de metacéstodos de la fase crónica inducen un aumento de la respuesta proliferativa así como de la producción de IL-4 e IFN-gamma en linfocitos T (Spolski et al. 2000).



5. Proteasas.

Las proteasas son enzimas degradantes que catalizan la hidrólisis total de las proteínas, representan uno de los 3 grupos más grandes de enzimas y ejecutan una gran variedad de funciones desde nivel celular hasta nivel de órgano y organismo para regular la homeostasis y la inflamación. Son responsables de procesos complejos dentro de la fisiología normal de las células así como también en condiciones patológicas anormales además, representan más del 5% del genoma humano. Muchos parásitos patógenos que habitan en el intestino, rico en suplementos nutricionales, producen proteasas para aumentar su potencial patogénico (Wolfe, 2001).

Las proteasas juegan un papel crítico en muchos procesos fisiológicos y patológicos (catabolismo, coagulación de la sangre, crecimiento y migración celular, reparación tisular, desarrollo en la morfogénesis, en el proceso de inflamación, en el crecimiento de tumores y metástasis, activación de zimógenos, liberación de hormonas, traspotación de proteínas secretadas a través de la membrana celular, etc). En general, las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de proteínas grandes a moléculas más pequeñas para que después sean absorbidas por las células, mientras que las proteasas intracelulares participan en la regulación del metabolismo (Rao. et al. 1998).

Las proteasas están subdivididas en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo del sitio de acción. Las exopeptidasas tienen su sitio de unión cerca del amino o carboxilo terminal del sustrato, mientras que las endopeptidasas tienen su sitio de unión lejos del amino y carboxilo terminal del sustrato. Basándose en los grupos funcionales en el sitio de acción, las proteasas



se clasifican en 4 grupos: cisteín-proteasas, aspartico-proteasas, serín- proteasas y metalo-proteasas (Hartley, 1960).

5.1 Cisteín-proteasas

Las cisteín-proteasas están presentes en organismos procariontes y eucariontes y se han reconocido alrededor de 20 familias de cisteín proteasas, cuya actividad depende del par catalítico que consiste en una cisteína y una histidina. El orden de estos amino ácidos difiere en algunas familias (Barett, 1994). Generalmente, las cisteín-proteasas solo se activan en presencia de agentes reductores como el HCN (Cianuro de hidrógeno). En base a su cadena lateral específica, se pueden dividir en 4 grupos: tipo papaína, tipo tripsina con preferencia en la ruptura de los residuos de arginina y específicas para ácido glutámico. Las cisteín-proteasas tienen un pH neutro, sin embargo algunas de ellas como las proteasas lisosomales se activan en pH ácido. Son susceptibles a agentes sulfidrilos como el PCMB (*p*-cloromercuribenzoato) pero no les afecta el DFP (diisopropylfluorofosfato) y los agentes metalo-queloides (Rao et al. 1998).

Las cisteín-proteasas catalizan la hidrólisis del ácido carboxilo a través de un doble desplazamiento en el proceso en el que hay formación ácido-base y la hidrólisis del acyl-thiol intermedio. El mecanismo de acción de las cisteín proteasas es muy similar al de las serín proteasas. La papaína derivada de plantas se considera el arquetipo de éstas y constituye un buen modelo para esta familia. La papaína cataliza la hidrólisis de uniones por péptidos, amino ester, thiol ester y thiono ester. El proceso de catalización está descrito en la figura 3.



La papaína está formada por una sola cadena proteínica plegada para formar dos dominios conteniendo una hendidura para unir el sustrato. El cristal de la papaína confirma el par Cys25 – His159 creando una tercia Cys-His-Asn en la proteasa, la cual es análoga a la arreglo Ser-His-Asp encontrado en las serín proteasas.

5.2 Serín proteasas.

Las serín proteasas son caracterizadas por la presencia de una serina en su sitio activo. Son numerosas y se encuentran en virus, bacterias y eucariontes, lo que sugiere que son vitales para el organismo. El mecanismo de catalización se lleva a cabo por una tercia de aminoácidos: serina – aspartato – histidina. Las serín proteasas son reconocidas por su inhibición irreversible por 3,4-dichloroisocoumarin (3,4-DCI) y di-isopropilfluorofosfato (DFP). Son activas en pH neutro y alcalino (de 7 a 11). Sus puntos isoeléctricos generalmente están entre pH 4 y 6 (Rao et al. 1998). Las endopeptidasas de serina se pueden clasificar en tres grupos basados en su preferencia por el sustrato primario: tipo tripsina, tipo quimiotripsina y tipo elastasa. El mecanismo de hidrólisis llevado a cabo por las serín proteasas es muy parecido al mecanismo de las cisteín proteasas. La hidrólisis del péptido conlleva un paso de acetilación seguido de uno de desacetilación (Fig. 4).



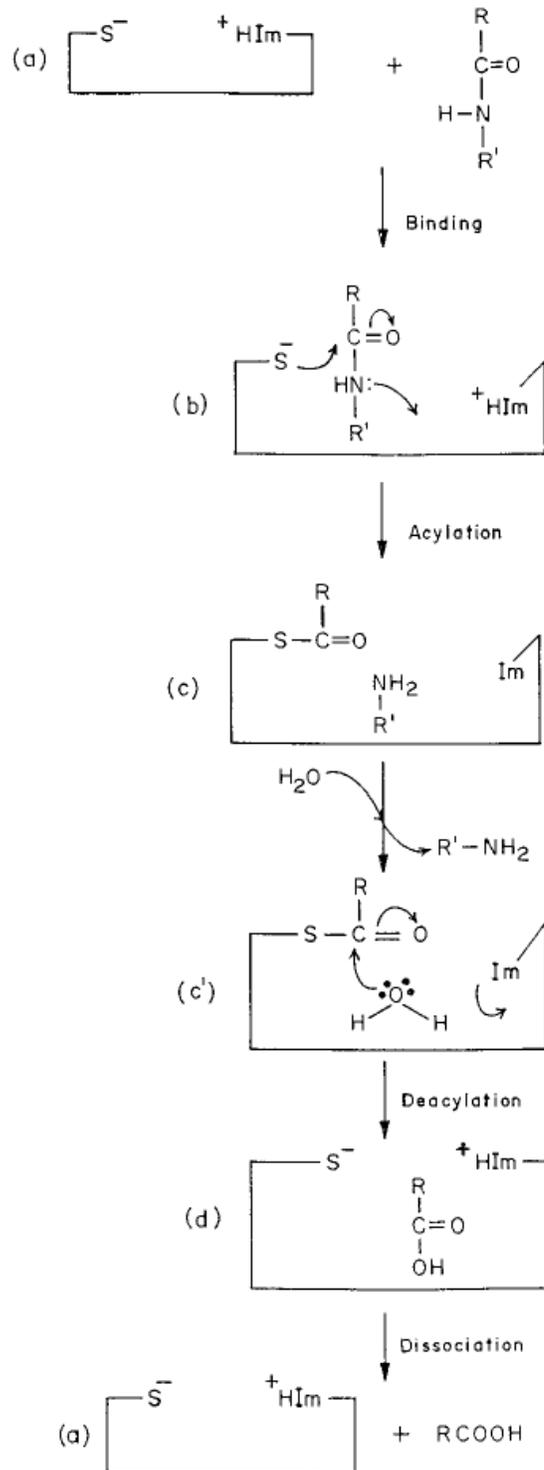


Fig. 3. Mecanismo de catalización por la cisteína proteasa, papaína. (a) Unión no covalente de la enzima libre y el sustrato para formar el complejo (b). Esto es seguido por la acilación de la enzima (c), con la formación y liberación del amino $R'-NH_2$. En el siguiente paso, la deacylación, la enzima $-acyl$ reacciona con la molécula de H_2O (c') para liberar el $RCOOH$ (d), para continuar con la regeneración de la enzima (Rao et al. 1998).



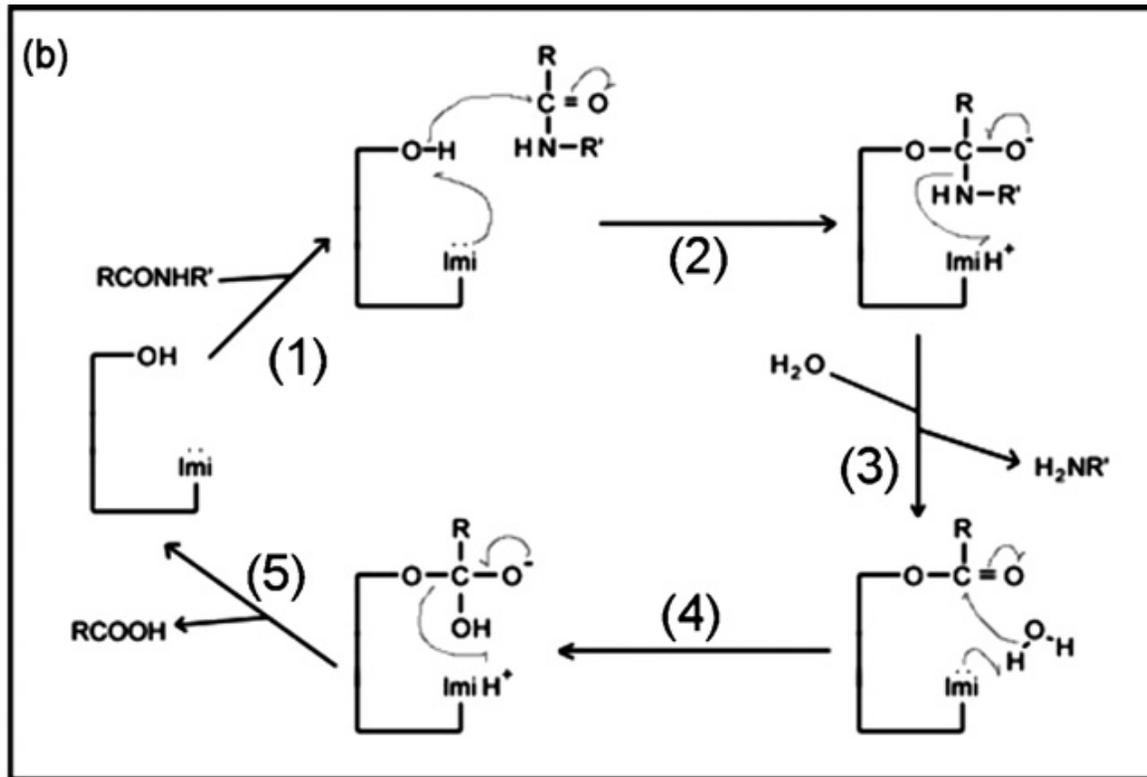


Fig. 4. Mecanismo de hidrólisis de proteínas llevada a cabo por una serín proteasa. (1) Unión al sustrato, (2) atracción nucleofílica por el grupo hidroxilo de la serina en la unión del grupo carbonilo para formar un estado de transición tetraédrico. (3) rearrreglo resultante de la formación de una enzima acyl intermedia y la liberación del péptido carbonilo terminal. Una molécula de agua se une al sitio activo, (4) la atracción nucleofílica por el agua en el acyl intermedio resulta en la formación de un tetraedro transicional, (5) rearrreglo resultante de la liberación del fragmento N-terminal y la reformación del sitio activo (Jones et al. 2008).

6. Apoptosis.

Datan reportes del siglo XIX donde anatomistas describen la muerte celular relacionada con la metamorfosis de los renacuajos e insectos. En 1885 Walter Flemming describió alteraciones nucleares, las cuales nombró picnosis. Luego de una serie de estudios embriológicos en 1951 se estableció que la muerte celular tiene un papel especial durante la ontogenia normal de los vertebrados y algunos invertebrados (Lockshin et al. 2001). Finalmente en 1972, la palabra apoptosis fue



introducida formalmente por Kerr y Willie para describir una forma especial de muerte celular controlada por genes durante el desarrollo embrionario, en el recambio tisular, en tejidos normales y en circunstancias nocivas y/o patológicas celulares (Salgado, 2004). La apoptosis es un proceso innato y evolutivamente conservado en el cual las células desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (Hengartner, 2000). La muerte celular desempeña un papel fundamental en la multitud de fenómenos biológicos y es indispensable en la homeostasis tisular, en la embriogénesis, en la metamorfosis y en la modulación del aparato inmune (Weingärtner et al. 2008).

6.1. Cambios en las células apoptóticas.

Las células que se mueren por apoptosis experimentan característicos cambios morfológicos: se encogen, se condensan, el citoesqueleto colapsa, la cubierta nuclear se desensambla y la cromatina nuclear se condensa, hay fragmentación del ADN de manera específica en el espacio internucleosomal produciendo fragmentos de 180 – 200 pares de bases o sus múltiplos (Hsueh et al. 1994 y 1996). Esta fragmentación se lleva a cabo en dos pasos, el primero es la escisión en fragmentos de 50,000 pares de base aproximadamente y después se generan fragmentos de 180 pares de bases (Sen, 1992). Además, se liberan varios factores, como el citocromo C al citoplasma y se activan las caspasas. La superficie de las células forma vesículas que contienen organelos, y si la célula es grande, a veces se fragmenta en cápsulas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos. Hay una alteración en la asimetría de la membrana, es decir, cambios



en la orientación de fosfolípidos, de esta manera la fosfatidilserina es expresada hacia la cara externa de la membrana plasmática (Jones et al. 1997). La fosfatidilserina sirve como marcador, el cual es detectado por la proteína Annexina V; específica para este fosfolípido. También sirve como señal para las células vecinas y macrófagos para que fagociten a la célula que está muriendo, de esta manera se evita que haya una respuesta inflamatoria (Fadok et al. 1998)

Las células que se mueren accidentalmente en respuesta a un trauma o a falta de suministro de sangre, lo hacen por un proceso llamado necrosis. Las células necróticas se hinchan y estallan, derramando su contenido sobre sus células vecinas y provocando una respuesta inflamatoria (Lockshin et al. 2001).

6.2. Fases de la apoptosis.

6.2.1. Fase iniciadora.

La apoptosis es desencadenada por dos diferentes señales, intracelulares o extracelulares. Ambas activan una cascada intracelular de procesos que comprenden el incremento en los niveles de radicales de oxígeno y Ca^{2+} , la producción de Par-4 y la translocación de los miembros pro-apoptóticos de la familia de proteínas Bcl-2 a la membrana mitocondrial (Rangnekar, 1998; Cheema et al. 2003).

6.2.2. Fase efectora.

En esta fase la célula pierde contacto con las células vecinas y el citoplasma se contrae provocando una disminución en el tamaño celular. Los organelos



citoplasmáticos permanecen intactos, sin embargo, en la mitocondria se dan cambios como la reducción del potencial transmembranal, el desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones, la liberación del citocromo C al citosol y el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (Kroemer et al. 1997).

La liberación de citocromo C está controlada por proteínas de la familia bcl-2: las inhibidoras de la apoptosis (Bcl-2 y Bcl-xL) previenen la liberación, mientras que las promotoras de la apoptosis (Bax, Bak, Bid, Bcl-2 y Bim) inducen la liberación del citocromo C. Este es un evento rápido (menos de 5 minutos) completo y cinéticamente invariable. Se sabe que siempre es anterior a la exposición de la fosfatidilserina y la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Goldstein et al. 2000). El citocromo C se une con el factor activador de proteasas 1 (APAF-1), la procaspasa 9 y el ATP o dATP formando un complejo llamado "apoptosoma". Dentro del apoptosoma se activa la caspasa 9, la que a su vez activa a la caspasa 3 para pasar a la última fase (Yan et al. 2005).

6.2.3. Fase de eliminación o degradación.

La activación de las procaspasas puede ser prevenida por la unión de proteínas inhibidoras de la apoptosis que a su vez son inhibidas por la proteína Smac/DIABLO (De Laurenzi et al. 2000). Finalmente la cromatina nuclear se condensa y se fragmenta. Las vesículas de la membrana plasmática se separan y forman los cuerpos apoptóticos. Aunque la muerte celular ocurre de manera constante en un organismo, las células que están muriendo por apoptosis son rara



vez vistas *in situ* debido a que son rápidamente removidas por las células vecinas o fagocíticas (Wyllie et al. 1980).

6.3. Caspasas.

La apoptosis depende de una cascada proteolítica intracelular mediada por caspasas (por sus siglas en ingles: **c**itosolic **a**spartate **s**pecific **p**roteasas). Son proteasas que tienen una cisteína en el sitio activo y segmentan a sus proteínas blanco específicamente en el ácido aspártico. Son sintetizadas en la célula como precursores inactivos llamados pro-caspasas, las cuales se activan mediante la segmentación proteolítica. Esta segmentación ocurre en uno o dos ácidos aspárticos específicos y es catalizado por otra caspasa activa. Una caspasa activa está conformada por una subunidad grande y una chica que forman un heterodímero y dos dímeros se ensamblan para formar un tetrámero activo. Hasta el momento se han identificado al menos 14 caspasas, de las cuales 11 se encuentran en el humano (Riedl et al. 2004). No todas las caspasas median la apoptosis, hay algunas caspasas como las 1, 4 y 5 que actúan en la respuesta inmune e inflamatoria y la mayoría, caspasas 2, 8, 9 y 10 (caspasas iniciadoras) y caspasas 3, 6 y 7 (caspasas ejecutoras), regulan la apoptosis (Crow et al. 2004). Las caspasas ejecutoras segmentan y activan otras pro-caspasas ejecutoras, así como también proteínas blanco en las células que se encargan de fragmentar al ADN y otras que afectan al citoesqueleto y la adhesión célula-célula. Una vez que la cascada de caspasas inicia es irreversible la apoptosis (Alberts et al. 2008).



6.4. Vías de activación de las caspasas.

6.4.1 Vía intrínseca (Mecanismo mediado por la mitocondria)

Es activada por estrés y otras señales que provocan la translocación de miembros pro-apoptóticos de la familia bcl-2, como Bax, a la mitocondria, lo que provoca la liberación de factores mitocondriales, pérdida de potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. El citocromo C junto con Apaf-1 y la procaspasa 9 forman el apoptosoma. Este último facilita el procesamiento de la procaspasa 9, la cual inicia la activación de las caspasas efectoras, entre las más importantes se encuentra la caspasa 3. También hay liberación de la proteína que antagoniza a las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) denominada Smac/DIABLO (Labeledzka et al. 2006).

La irradiación, los glucocorticoides y ciertos quimioterapicos pueden inducir la apoptosis de células diana por el mismo mecanismo bioquímico (Abbas et al. 2004).

6.4.2. Vía extrínseca (Mecanismo mediado por receptores de muerte).

Es desencadenada por una señal pro-apoptótica que involucra los receptores de muerte de la superficie celular como TNF y FAS. Los receptores inductores de muerte mejor definidos pertenecen a la familia de las proteínas con dominios extracelulares ricos en cisteína homólogos (Singh et al. 1998)

Un ejemplo de la vía extrínseca es cuando Fas L se une a su ligando Fas lo cual provoca su trimerización. Esta unión conduce al reclutamiento del complejo DISC (death inducing signaling complex). Este complejo cuenta con proteínas adaptadoras que permiten la unión de la procaspasa 8 favoreciendo su activación



y a su vez la activación de las caspasas 3, 6 y 7 (Hengartner, 2000 y Thompson, 1995). La caspasa 8 también puede activar Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) e inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 para activar la vía intrínseca (Thompson, 1995).

Con los métodos actuales de biología molecular, inmunohistoquímica y microscopia electrónica es posible diferenciar las dos vías de la apoptosis y con ello estudiar el papel que desempeñan en los procesos normales y patológicos (Majno et al. 1995).



ANTECEDENTES.

Infecciones con metacéstodos de *Taenidos* han mostrado que inducen inmunosupresión en ratón (Good et al. 1976). Rubio et al. (1997) inmunizaron con antígenos de *Salmonella typhimurium* a dos grupos de ratones, en uno de ellos los ratones se encontraban parasitados con *Taenia crassiceps* mientras que el otro grupo sirvió como testigo no infectado. Se incluyó un grupo testigo parasitado no inmunizado. Posteriormente, todos los ratones fueron infectados con *S. typhimurium*. Se encontró que los ratones infectados con *T. crassiceps*, no fueron capaces de producir una respuesta inmune efectiva contra una infección con *S. typhimurium*, pues murieron en un 80%, e incluso los niveles de bacteremia fueron muy altos, en comparación con los ratones del 2º grupo, los cuales lograron sobrevivir 100% a la infección por *S. typhimurium* y los niveles de bacteremia se redujeron significativamente. Los autores sugieren que la incapacidad de montar una respuesta inmune efectiva a pesar de estar vacunados contra *S. typhimurium*, puede deberse a la presencia de una sustancia producida por el parásito que induce un estado de inmunosupresión en su huésped favorable para la supervivencia del primero.

Posteriormente Spolski et al. (2000) encontraron que productos de excreción-secreción (E/S) de metacéstodos de *Taenia crassiceps* obtenidos del líquido peritoneal de ratones en una fase temprana de la infección, suprimieron la proliferación de células T *in vitro*, así como también la producción de IFN-gama e IL-4. Por el contrario, los productos de E/S de metacéstodos en una fase tardía de la infección, no tuvieron efectos de supresión.



Por otro lado, Molinari et al. (2000) observaron que linfocitos T CD4 obtenidos de bazo de ratón en presencia de secreciones de metacéstodos de *T. solium* con actividad de cisteín-proteasa disminuyeron *in vitro* significativamente su número respecto del de sus testigos. Más adelante, Tato et al. (2004) reportaron apoptosis de células esplénicas T CD4+ de ratón sano que es inducida por la cisteín-proteasa de *T. solium in vitro*. La apoptosis no se observó cuando se añadió E- 64 (un inhibidor de cisteín-proteasas).

Con el objeto de conocer si la apoptosis de linfocitos reportada por Tato et al (2004) ocurre también *in vivo*, Solano et al. (2006) estudiaron la reacción inflamatoria alrededor de metacéstodos de *T. solium* en cisticercosis porcina. Los resultados mostraron mediante estudios con annexina-V/Yoduro de propidium, citometría de flujo y de microscopía electrónica, que en la reacción inflamatoria adyacente a metacéstodos había linfocitos apoptóticos. La presencia de actividad de cisteín-proteasa en el lavado de células inflamatorias sobre un sustrato fluorogénico específico (Z Phe-Ala-AFC), reforzó la noción de que la cisteín proteasa del parásito induce apoptosis de linfocitos a su alrededor.



HIPOTESIS.

Si la cisteín-proteasa de *T. solium* induce apoptosis en células CD4+ *in vitro*, entonces la cisteín-proteasa secretada *in situ* por metacéstodos de *T. crassiceps* debe inducir apoptosis en células inflamatorias CD4+ peritoneales de ratones infectados.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar y cuantificar las estirpes celulares en el peritoneo de ratones infectados con metacéstodos de *Taenia crassiceps*, identificando si son apoptóticas y si esta apoptosis es causada por la cisteín proteasa producida por los metacéstodos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Caracterizar y cuantificar las estirpes celulares en el infiltrado inflamatorio peritoneal de ratones infectados con metacéstodos de *Taenia crassiceps* durante los primeros 16 días post-infección.
2. Identificar apoptosis en diferentes estirpes celulares.
3. Estudiar si hay actividad de cisteín-proteasa en el líquido peritoneal de ratones infectados con *T. crassiceps*.
4. Experimentar si el líquido peritoneal con actividad de cisteín-proteasa induce apoptosis en linfocitos T y B, y si ésta apoptosis se evita con el uso de algún inhibidor de cisteín-proteasas (E 64).
5. Identificar y cuantificar la presencia de Caspasa 3 en células peritoneales de ratones infectados con *T. crassiceps*.
6. Estudiar el estado del ADN de células peritoneales de ratones infectados con *T. crassiceps*., mediante electroforesis de ADN.
7. Realizar estudios de microscopía electrónica con la finalidad de buscar células peritoneales inflamatorias con características típicas de apoptosis, de ratones infectados con *T crassiceps*.



METODOLOGÍA.

1. Parásitos e infección

Se utilizaron metacéstodos de *Taenia crassiceps* de la cepa WFU, cultivadas intraperitonealmente en ratones hembras Balb/c con pases sucesivos cada 66 días post-infección (Fig.5A). Los metacéstodos se obtuvieron lavando el peritoneo de cada ratón con 15 ml de solución amortiguadora de fosfatos, PBS 1X (Roche) + 10 µl de heparina sódica (Laboratorios microlab. S.A. de C.V.). El lavado se recuperó en un tubo cónico (Falcon) de 50 ml y se mantuvo en hielo. El sobrenadante se separó y se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12). El sedimento se desechó y el sobrenadante se guardó a – 20° C. Los metacéstodos se lavaron 3 veces con 10 ml PBS 1X. Se seleccionaron metacéstodos de 2 mm de diámetro (Fig. 5B). Se infectaron 12 ratones hembras Balb/c de 22 g. A cada ratón se le inyectaron intraperitonealmente 20 metacéstodos. La infección se hizo mediante una jeringa de 1ml con una aguja de calibre 14. Los metacéstodos que sobraron se almacenaron a -20 °C,





A



B

Fig. 5. Huésped y parásito. A) Ratones hembras Balb/c infectados con *T. crassiceps* de 66 dpi. B) Metacístodos de *T. crassiceps* que se encontraban en el peritoneo de los ratones.



2. Obtención de células del proceso inflamatorio.

Se sacrificaron 2 ratones sanos de la misma cepa y de la misma edad, como testigos y 2 ratones infectados a los 3, 6, 9, 12 y 16 días post-infección (dpi). Se lavó el peritoneo de cada ratón con 10 ml de RPMI pH 7.2 (SIGMA). El lavado se recuperó en un tubo falcon de 15 ml y se mantuvo en hielo. Se separó el líquido de los metacéstodos (los metacéstodos se lavaron 3 veces con PBS 1X y se almacenaron a -20 °C) y el líquido se centrifugó a 1,500 rpm por 10 min (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12). Los sobrenadantes se guardaron a -20 °C para su posterior análisis y los sedimentos se resuspendieron en 500 µl de RPMI en el caso de los ratones infectados, y en 200 µl en el caso de los ratones testigos. Se verificó la viabilidad de las células de cada ratón tiñéndolas con azul de Tripano (SIGMA). Las células se mantuvieron en hielo hasta su uso.

3. Diferencial.

Se hizo frotis de células peritoneales de ratones sanos y de ratones infectados de 9 días post-infección (dpi). Los frotis, teñidos con hematoxilina/eosina, fueron examinados por 3 hematólogos del Hospital General. Las medias \pm desviaciones estándar se obtuvieron de 3 cuentas diferentes y en cada una se contaron 600 células.

4. Anticuerpos monoclonales.

Se utilizaron 5 diferentes anticuerpos para identificar las diferentes estirpes celulares en la reacción inflamatoria: anti-CD4 PerCP, anti-CD8 PE, anti-CD19 PE,



anti-CD14 PE y anti-CD14 FITC (BD Pharmigen). Para detectar la apoptosis se utilizó el kit de Annexin-V-FLUOS siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche).

5. Tinción de las células con diferentes anticuerpos.

Se hicieron 6 tinciones diferentes por ratón. Se utilizaron 6 tubos de clitómetro para cada ratón y en cada tubo se puso 1 millón de células en 1 ml de RPMI. Las células se centrifugaron a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min. El sobrenadante se desechó, el sedimento se resuspendió en el sobrenadante restante (100 µl) y los anticuerpos fluoresceinados se agregaron de la siguiente manera: Tubo 1 – anti-CD8 PE y anti-CD14 FITC; Tubo 2 – anti-CD4 PerCP y anti-CD19 PE; Tubo 3 – anti-CD8 PE y Annexin; Tubo 4 – anti-CD4 PerCP, Annexin y IP; Tubo 5 – anti-CD14 PE y Annexin y Tubo 6 – anti-CD19 PE y Annexin. Se incubaron todos los tubos por 30 min. en agitación (Velocidad No. 2 de agitadora horizontal Water Bath Shaker modelo 406015, American Optical), en oscuridad y a temperatura ambiente. A cada tubo se le agregó 1 ml de RPMI y se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 min (C.C. SOL-BAT Mod. J-12). Se desechó el sobrenadante, los botones celulares se volvieron a resuspender en 1 ml de RPMI y se analizaron en citómetro de flujo (Becton Dickinson)

6. Análisis de Citometría.

El citómetro de flujo FACSCalibur permite analizar de forma simultánea diversas características celulares, lo que proporciona información de varios parámetros de cada una de células que se analizan. Los valores de calibración fueron: FSC –



1.60, SSC - 389, FL1 - 579, FL2 – 462, FL3 – 465. Compensación: FL1-FL2 – 0.6, FL2-FL1 – 163, FL2-FL3 – 15.4 y FL3-FL2 – 9.1. Se analizaron 10,000 células por cada experimento, se obtuvieron gráficos FSC (tamaño) y la SSC (granularidad), así como también para conocer el número de células y la apoptosis de cada estirpe mediante fluorescencia: FL1 – Annexin FITC y anticuerpos anti-CD14 FITC; FL2 – IP PE, anti-CD8 PE, anti-CD19 PE y anti-CD14 PE y FL3 – anti-CD4 PerCP.

7. Determinación de la actividad de la caspasa 3.

Se utilizó Apo Alert® Caspasa Fluorescent Assay Kits (Clontech) para detectar apoptosis mediante la actividad de la caspasa-3. Se analizaron células de peritoneo de ratones infectados con *T. crassiceps* intraperitonealmente de 9, 12 y 16 dpi. Como células testigo positivo, C+, y testigo negativo, C-, se usaron células U937 las cuales fueron inducidas a apoptosis con camptotecina (SIGMA). Por cada 2×10^6 de células U937 se agregaron 5 μ l de camptotecina (5 μ g/ml) más 1ml de RPMI con 10% de suero bovino fetal, SBF (GIBCO) y se incubaron a 37 °C por 4 h. Se usaron 2×10^6 células del peritoneo de un ratón sano para comparar la actividad de la caspasa-3 de éste mismo, contra la caspasa-3 de los ratones infectados. También se usaron 2×10^6 células de cada ratón infectado y se depositaron en un tubo eppendorf (1.5 ml) correspondiente. Cada experimento se hizo por duplicado como se indica en el cuadro 1. Se agregaron 50 μ l de Cell Lysis Buffer a cada tubo, se incubaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron 10 min a 12,000 rpm a 4 °C (centrifuga BECKMAN Microfuge E™). Los sobrenadantes se trasladaron a tubos nuevos, se agregó el inhibidor de la



caspasa-3 DEVD-CHO (Asp – Glu – Val – Asp – Aldehido) a cada uno de los tubos incluyendo al del testigo con células U937 (C-). Los tubos se incubaron en hielo por 30 min, a cada tubo se le agregó 50 µl de 2x Reaction Buffer/DTT a cada tubo y 5 µl del sustrato DEVD-AFC 1 mM (Asp – Glu – Val – Asp – 7 – amino – 4 – trifluoromethyl coumarin). Los tubos se incubaron en baño maría, a 37 °C por 1 hora, luego se trasladaron las muestras a una placa para fluorómetro Floroscan FL y se leyeron a 400 nm de excitación y 505 nm de emisión.

Cuadro 1. Cantidades de reactivos utilizados para cada muestra del ensayo de actividad de la Caspasa-3.

Células (2×10^6)	Inhibidor (μ)	Buffer (μ)	Sustrato (μ)
U937 (C+)	-	50	1
U837 (C-)	1	50	1
Ratón sano	-	50	1
Ratón infectado	1	50	1
Ratón infectado	-	50	-
Ratón infectado	-	50	1

8. Purificación de ADN celular de bajo peso molecular.

Se utilizaron 2×10^6 células del peritoneo de ratones infectados con metacéctodos de 9, 12 y 16 dpi. Como testigo negativo se utilizaron células de peritoneo de un ratón sano y como testigo positivo se utilizaron células U-937 inducidas a apoptosis con camptotecina como se indica en el punto 7 de la metodología. Posteriormente, las células obtenidas del peritoneo de cada ratón, se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis (100 mM NaCl, 10 mM tris pH 8,



25 mM EDTA pH 8, 0.5% SDS y 0.1 mg/ml proteinasa K (Sigma)) + 50 µg/ml de RNAsa (Sigma) y se incubaron a 37 °C por 4 h. Después se realizaron extracciones de ADN consecutivas con 500 µl de fenol saturado/ fenol/ cloroformo/ alcohol isoamilico (25:24:1) y cloroformo/alcohol isoamilico (25:1 v/v), centrifugando en cada paso a 14,000 rpm durante 30 min. El ADN se precipitó con acetato de sodio 0.3 M, MgCl₂ 10 mM y un volumen igual de isopropanol para posteriormente dejar toda la noche a -20 °C. El ADN fue concentrado a 14,000 rpm por 30 min., lavado 2 veces con etanol al 70%, secado y resuspendido en Tris 10 mM (pH 7.4). La concentración del ADN se cuantificó por el método de la difenilamina (SIGMA) como lo indica Colowick (1957).

9. Electroforesis para ADN celular.

La electroforesis del ADN se realizó en geles de agarosa al 1.5% a 70 – 80 volts por 1.5 hrs. Se utilizó buffer de TBE al 0.5% y se cargaron 15 µg de ADN para cada muestra. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se realizó la captura de las imágenes con ayuda de luz ultravioleta.

10. Detección de apoptosis por medio de TUNEL.

El TUNEL (por sus siglas en inglés: Deoxynucleotydyl transferase- medated dUTP nick-end labelling) es una técnica precisa, rápida, simple y no radioactiva para detectar y cuantificar células apoptóticas; consiste en la inserción de oligonucleótidos marcados con fluoresceína al ADN fragmentado. Para este fin se utilizó el *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche). Se usaron células de peritoneo de un ratón hembra Balb/c como control y células del peritoneo de



5 ratones infectados con *T. crassiceps* de 12 dpi. Se lavó peritoneo de cada ratón con 15 ml de PBS 1X + 10 μ l de heparina sódica. Se centrifugaron los líquidos a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min, los sobrenadantes se separaron y se almacenaron a -20 °C y las células se resuspendieron en 200 μ l en el caso de las células del ratón control, y en 500 μ l en el caso de las células del ratón infectado. Las células se tiñeron con azul de trypano (190 μ l + 10 μ l del volumen total de cada muestra) y se contaron con ayuda de un hemocitómetro. Se usaron 4 tubos de fondo redondo de poliestireno (12 x 75 mm especiales para su lectura en el citómetro de flujo) para cada ratón, rotulados con los números 1, 2, 3 y 4 agregando 1×10^6 células del ratón al tubo que correspondía. Al tubo 1 de cada ratón se le agregaron 2 μ l de anti-CD14 PE, al tubo 2- 2 μ l de anti-CD4 PE, al tubo 3- 2 μ l de anti-CD8 PE y al tubo 4- 2 μ l de anti-CD19 PE. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación por 30 min (Agitadora horizontal Water Bath Shaker). A cada tubo se le agregó 1ml de PBS 1X y todos los tubos se centrifugaron a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min. Los sobrenadantes se desecharon, se agregó 1ml de PBS 1X a cada tubo y los tubos se volvieron a centrifugar a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min. Los sobrenadantes se desecharon, a cada tubo se le agregó 1 ml de paraformaldehído (Merck) al 4% en PBS 1X y todos los tubos se incubaron 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y en agitación (Agitadora horizontal Water Bath Shaker). Todos los tubos se centrifugaron a 1500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min. Los sobrenadantes se desecharon, se agregó 1 ml de PBS 1X a cada tubo y nuevamente se centrifugaron a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12)



por 10 min. Se desecharon los sobrenadantes. A cada tubo se le agregó 1ml de FACS™ Permeabilizing Solution 2 (10) 1:10 v/v y se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad y en agitación (Agitadora horizontal Water Bath Shaker). Luego se centrifugó a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min. Los sobrenadantes se desecharon y se agregó 1 ml de PBS 1X a cada tubo para volver a centrifugar a 1500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min. A cada tubo se le agregaron 20 µl del mix de TUNEL y se incubaron a 37 °C por 1 hora agitando ligeramente cada 15 minutos. Por último a cada tubo se le añadió 1 ml de PBS 1X y se centrifugaron a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min, se desecharon los sobrenadantes y a cada tubo se le agregó 1ml de PBS 1X. Los tubos se analizaron en el citómetro de flujo FACSCalibur.

11. Determinación de la actividad enzimática de cisteín y serín proteasas.

Para detectar la presencia y la actividad enzimática de las cisteín y serín proteasas secretadas por el cisticerco de *T. crassiceps*, se utilizó como sustrato el Z – Phe – Arg – AFC (Z – Phe – Arg – 7 – amino – 4 – trifluoromethyl coumarina) (Enzyme System Products) el cual es degradado por ambas enzimas. Se diluyeron 5 mg del sustrato en 1 ml de Dimetil Sulfoxido (DMSO) (Sigma). Los líquidos peritoneales almacenados a -20 °C de los lavados peritoneales, se descongelaron y se tomó 1ml de cada uno para medir su densidad óptica a 280 nm en un Spectronic 1001 plul (Milton Roy). Se analizaron los sobrenadantes de ratones infectados de 3, 6, 9 y 12 dpi y se utilizó como control el sobrenadante del lavado peritoneal de un ratón hembra Balb/c sano. Se tomaron 80 µg de cada muestra.



Como testigo de la cisteín proteasa se usó papaína (Roche) y como testigo de la serín proteasa se usó tripsina (Roche). Para inhibir la actividad de las cisteín proteasas, incluyendo a la papaína, se usó 0.0005 M de E-64, así como 0.0005 M de pefabloc SC (Roche) para inhibir la actividad de las serín proteasas, incluyendo a la tripsina. Se hizo un ensayo por día y se utilizó una placa para Floroscan FL. Primero se puso el Buffer de fosfato de sodio + EDTA 2 mM + L-cisteína 5 mM, luego la enzima de líquidos peritoneales, luego los inhibidores (E-64 y pefabloc), todo junto se incubó durante a 37°C por 15 min y por último se agregó 1 µl de sustrato en cada pozo, el volumen total fue de 200 µl por pozo. Cada muestra se analizó por duplicado. Se midió la actividad en los líquidos peritoneales (tanto del ratón testigo como del infectado) sin inhibidores, con E-64, con pefabloc y con ambos inhibidores. Se comparó la actividad de la cisteín proteasa con la de la papaína y la actividad de la serín proteasa con la de la tripsina, así como también la actividad de ambas proteasas del ratón infectado contra las del ratón testigo. La actividad de proteasas se puede medir cuando aumenta la intensidad de fluorescencia debida a la liberación de amino-coumarina al agregar el sustrato. El análisis se hizo en un Fluoroskan Ascent FL (Labsystems) con una excitación de 400 nm y una emisión de 505 nm.

12. Efecto de la cisteín proteasa secretada por metacéstodos de *T.crassiceps* sobre linfocitos de bazo de un ratón hembra Balb/c sano.

Para obtener los metacéstodos se sacrificaron 4 ratones infectados con *T. crassiceps* 33 dpi y se lavó peritoneo de cada ratón como ya se mencionó anteriormente. El lavado se recuperó en un tubo cónico (Falcon) de 50 ml, se



eliminó el sobrenadante y se lavaron los metacéstodos 3 veces con 10 ml de PBS 1X. Se desechó el sobrenadante y se seleccionaron metacéstodos con 2 mm de diámetro aproximadamente. En 2 tubos cónicos de 15 ml se depositaron 200 metacéstodos en cada uno. En un tubo se agregó 1 ml de RPMI con L-cisteína 15 mM (Sigma) y en el otro 1 ml de RPMI con L-cisteína 15 mM y 5 μ l de E-64 5 mM. Se incubaron a 37 °C por 80 min. Por otro lado, se sacrificaron 4 ratones hembras Balb/c sanas y se les extrajo el bazo en condiciones de esterilidad, éste se perfundió con 15 ml de RPMI en una caja petri para posteriormente recolectarlo en un tubo cónico de 15 ml, el material se dejó reposar en hielo durante 5 minutos para eliminar los detritus gruesos y se decantó a otro tubo. Cada bazo se perfundió por separado. Se centrifugaron los 4 tubos con células a 1,500 rpm por 10 min (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en el restante para adicionar 1 ml de RPMI con 10% de SBF. Se colocaron 3 ml de histopaque 1077 (Sigma) a cada uno de los 4 tubos y se añadieron las células sobre el histopaque. Inmediatamente después se centrifugaron a 400 g por 30 min en una centrifuga DAMON/IEC DIVISION. Se recuperó la interfase y se colocó en RPMI para completarlo a 15 ml. Se centrifugaron a 200 g por 10 min, se desechó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1 ml de RPMI con L-cisteína 15 mM, se tiñeron con azul de tripano y se contaron en hemocitómetro. Una población de 5×10^6 linfocitos suspendida en 2 ml de RPMI conteniendo L-cisteína 15mM se puso en el fondo de pozos por cuadruplicado (placa de 6 pozos Transwell, Costar) con membrana de poliéster de 0.4 μ m. En uno de los pozos se colocaron 200 metacéstodos + RPMI con L-cisteína 15 mM, en otro 200 metacéstodos +RPMI con L-cisteína 15 mM +



E-64 0.015 μ M. En ambos casos se agregaron 2 ml de RPMI en la parte superior de cada pozo (Fig. 6). La caja se incubó a 37 °C por 4 h. Se retiraron los metacéstodos, las células se recuperaron y se transfirieron a tubos de citometría (Falcon). Se centrifugaron a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 min, los sobrenadantes se desecharon. Las células de cada tubo se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X, se centrifugaron a 1,500 rpm por 10 min y se desecharon los sobrenadantes. Las células se resuspendieron en el PBS 1X sobrante (100 μ l) y el contenido de cada tubo se repartió en 2 partes iguales para teñirlos por separado con anti-CD4 PerCP y anti-CD8 PE como se indica en el cuadro 2. Uno de los tubos con células de ratones sanos se usó como testigo por lo tanto al dividirlo, una de las partes se utilizó como testigo (+) y la otra como testigo (-). Ambos testigos se mantuvieron en hielo durante la tinción de las demás muestras.

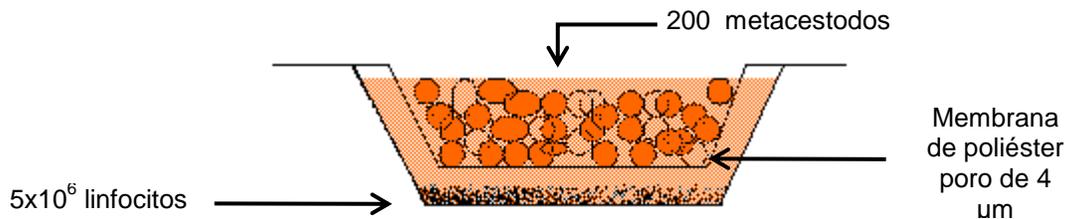


Fig. 6. Co-cultivos de metacéstodos de *T. crassiceps* y linfocitos esplénicos de un ratón sano.

Cuadro 2. Tinción de linfocitos, tratados con metacéstodos de *T. crassiceps*, con los anticuerpos anti-CD4 PerCP y anti-CD8 PE.

Células	Tubo 1	Tubo 2
Células + cisticercos + RPMI	4 μ l anti-CD4 PerCP	4 μ l anti-CD8 PE
Células + cisticercos + RPMI + E-64	4 μ l anti-CD4 PerCP	4 μ l anti-CD8 PE
Células + RPMI	4 μ l anti-CD4 PerCP	4 μ l anti-CD8 PE



Los tubos teñidos con anti-CD4 y anti-CD8 se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación (Agitadora horizontal Water Bath Shaker). A cada tubo se le agregó 1 ml de PBS 1x, se centrifugaron a 1,500 rpm (Centrifuga clínica SOL-BAT Mod. J-12) por 10 minutos y se desecharon los sobrenadantes. Por último, todos los tubos (incluidos el Control+ y el Control-), se trataron como lo indica el protocolo del *In Situ* Cell Death Detection Kit. El Control+ fue tratado con 3000 unidades de DNAsa A (Sigma) + 1 mg/ml de BSA (Albúmina) (Sigma) + 2 ml de Tris HCL pH 7.5 50 mM y el Control- se trató con 1 mg/ml de BSA + 2 ml de Tris HCL pH 7.5 50 mM. Los resultados se analizaron en un citómetro de flujo FACS Calibur mediante los parámetros FSC vs. SSC, FL1 vs. FL2 y FL1 vs. FL3.

13. Microscopia Electrónica.

Células peritoneales de ratón control (sano) y de ratón infectado se fijaron con 2.5% de glutaraldehído en buffer cacodilato (pH 7.2, 4°C). Posteriormente se fijaron con OsO₄ embebidos en Epon. Se hicieron cortes ultrafinos y se tiñeron con acetato de uranio ligado a citrato. Estos cortes se analizaron en un microscopio de transmisión Jeol 1200 Ex 11.

14. Estadísticas

Las medias \pm DE fueron calculadas para representar números y porcentaje de diversos tipos de células peritoneales de ratones sanos o infectados. El porcentaje de células apoptóticas se obtuvo de acuerdo a la siguiente fórmula: media de células apoptótica x 100 / media de las células no apoptóticas + la media de



células apoptóticas. Para determinar la significancia entre las medias del control y las células apoptóticas en cultivos con metacéstodos de *T. crassiceps* y entre la significancia del control y las células T apoptóticas en cultivo con metacéstodos de *T. crassiceps* en ausencia o presencia de E-64, se utilizó la prueba de Xi-cuadrada con corrección Yate. Se consideró significativo el valor de P menor a 0.05. Se utilizó el programa Graph Pad Instat.



RESULTADOS.

1. Número de células.

El número de células infiltradas al peritoneo aumenta a lo largo de los días post-infección. Comparado con el control (3.7×10^6), a los 3 días post-infección (dpi) ya se nota un ligero aumento en el número de células (6.4×10^6). Conforme la infección avanza un mayor número de células arriba al peritoneo llegando así a 56×10^6 células a los 9 dpi. La llegada de nuevas células se estabiliza hasta llegar a los 16 dpi en donde hay 57.5×10^6 células (Fig. 7).

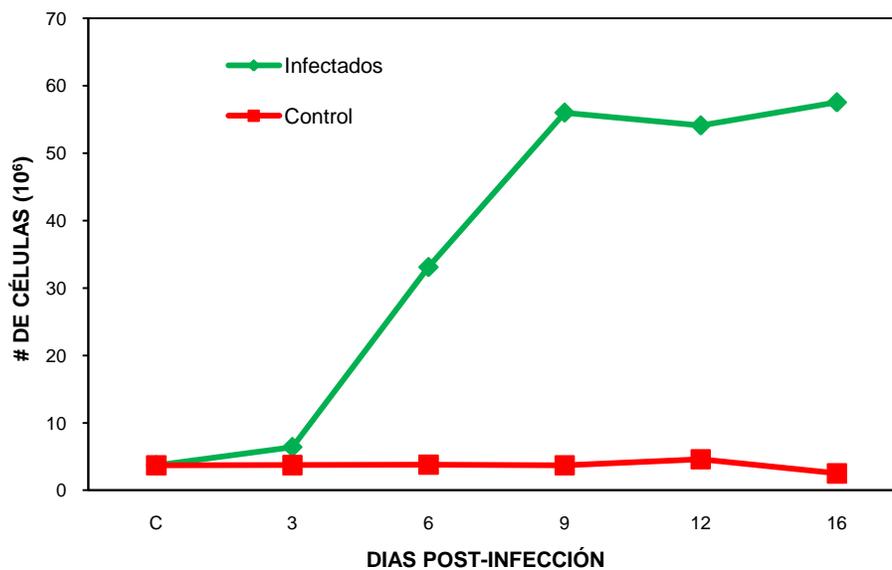


Fig. 7. Número de células intraperitoneales totales en ratones control y ratones infectados con metacéstodos de *T. Crassiceps* en diferentes días post-infección.



2. Diferencial

Comparando el porcentaje de células del peritoneo en un ratón sano y en un ratón con 9 dpi, se puede observar que en el ratón sano los macrófagos, constituyen el 30% del total de las células; mientras que en el ratón infectado éstos aumentan hasta un 49%. En el caso de los monocitos hay un 4% en el sano y un 9% en el infectado. Lo que más destaca en la diferencial es que en el ratón sano no se encuentran eosinófilos en el peritoneo, mientras que en el ratón infectado hay un aumento importante de ellos (26%). Otro punto importante, es lo que pasa con los linfocitos. En el ratón sano hay un 64% de ellos, mientras que en el ratón infectado este porcentaje baja drásticamente a un 19% (Fig. 8).

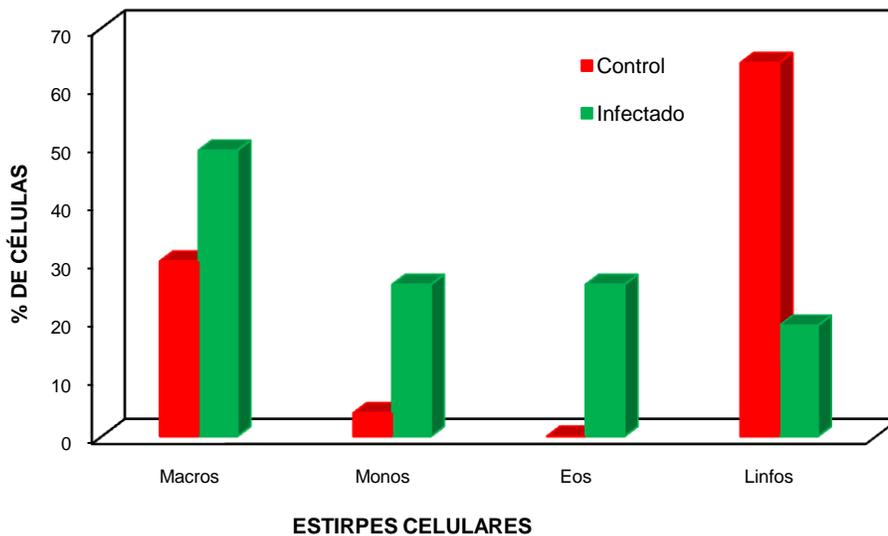


Fig. 8. Porcentaje de las células peritoneales de un ratón sano y un ratón infectado con metacéstodos de *T. crassiceps* de 9 dpi.

3. Macrófagos y eosinófilos

En el lavado peritoneal de un ratón infectado con *T. crassiceps* de 12 dpi, se observan por citometría de flujo 3 poblaciones de células: 1 – linfocitos, 2 – macrófagos y 3 – eosinófilos (fig. 9A). Al incubar las células 4 hrs en una caja petri



a 37°C, los macrófagos se adhirieron al fondo, mientras que los linfocitos y eosinófilos quedaron suspendidos en el sobrenadante (fig. 9B). En los gráficos con fluorescencia, los macrófagos aparecen teñidos cuando las células no fueron incubadas (fig. 9C, cuadrante superior izquierdo) y no aparecen cuando las células sí fueron incubadas (Fig. 9D, cuadrante superior izquierdo), los macrófagos se adhirieron al vidrio de la caja petri, es por eso que en el sobrenadante solo aparecen los linfocitos y los eosinófilos (fig. 9B).

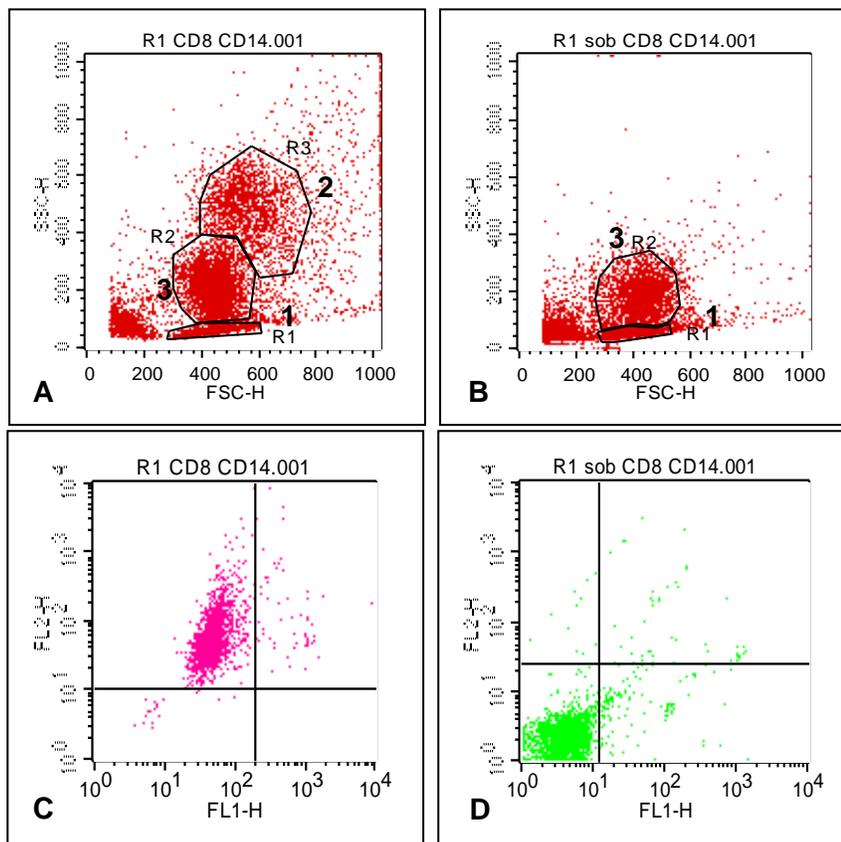
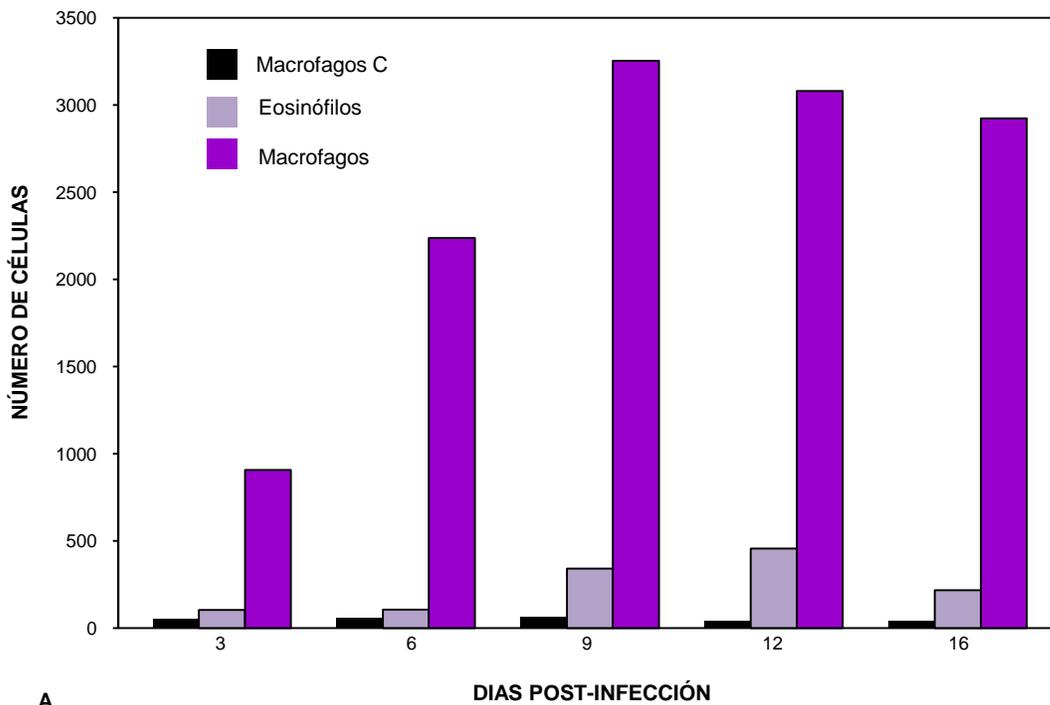


Fig.9. Análisis por citometría de flujo de células intraperitoneales de un ratón infectado con *T. crassiceps* de 12dpi. A y B) 1-linfocitos, 2-macrófagos, 3-eosinófilos. C) Fluorescencia de células CD14 correspondientes al gráfico A. D) Fluorescencia de células CD14 correspondientes al gráfico B.



Se tomaron muestras de 1×10^6 de células peritoneales de ratones infectados con cisticercos de *T. crassiceps* a los 3, 6, 9, 12 y 16 días post-infección y se tomaron lecturas de 10,000 células por experimento. En el caso de los macrófagos y eosinófilos se observó un incremento en el número de células para ambas estirpes celulares, aunque los macrófagos lo hicieron en mayor medida que los eosinófilos (fig. 10A). El porcentaje de eosinófilos apoptóticos aumentó de manera importante hasta un 71.5% a los 6 dpi. En el caso de los macrófagos, el porcentaje de apoptosis se mantiene entre un 4.4 y un 8% (fig. 10B).



A



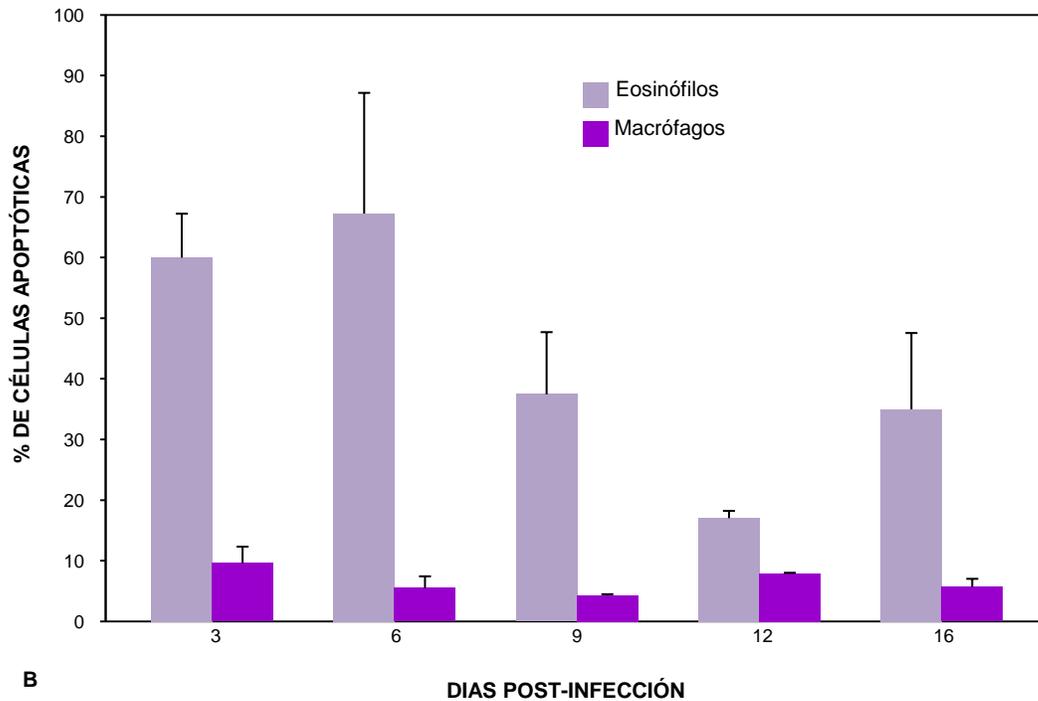


Fig. 10. Análisis por citometría de flujo de células peritoneales de ratones hembras *Balb/c* infectados con *T. crassiceps* de diferentes días post-infección. A) Células CD14+ (macrófagos y eosinófilos) en muestras de 10,000 células. Macrófagos C= macrófagos de un ratón sano. B) Porcentaje de células CD14+ apoptóticas (eosinófilos y macrófagos) medidos con Annexin A/PI en muestras de 10,000 células.

4. Linfocitos

Se tiñeron los linfocitos T CD4 con anti-CD4 PerCP y los CD8 con anti-CD8 PE, así como también los linfocitos B con anti-CD19 PE. El número de linfocitos en el ratón control es considerablemente mayor que en los ratones infectados a los 9 dpi (Fig. 11a y 11e). En cada una de las estirpes se observa como el número de células disminuye drásticamente a los 12 dpi comparados con el número de células del ratón sano. Los linfocitos B (CD19+) son los que disminuyen en mayor medida, de 1880 células bajan a 63 células (Fig. 11d y h). En el caso de los linfocitos T, los CD4+ bajan de 669 a 107 (Fig. 11b y f) y los CD8+ bajan de 250 a 41 (Fig. 11c y g).



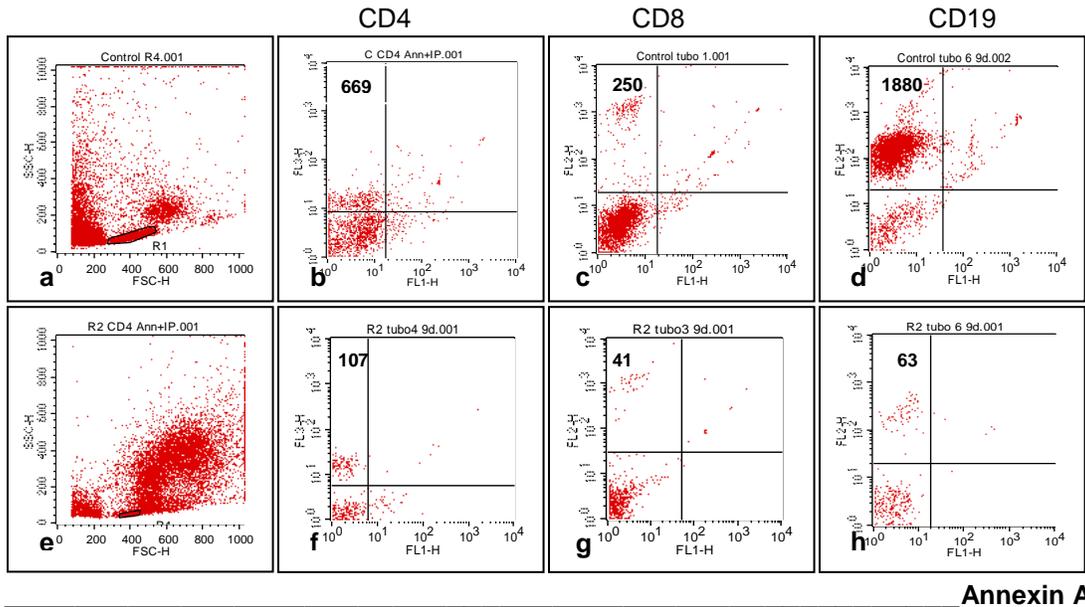
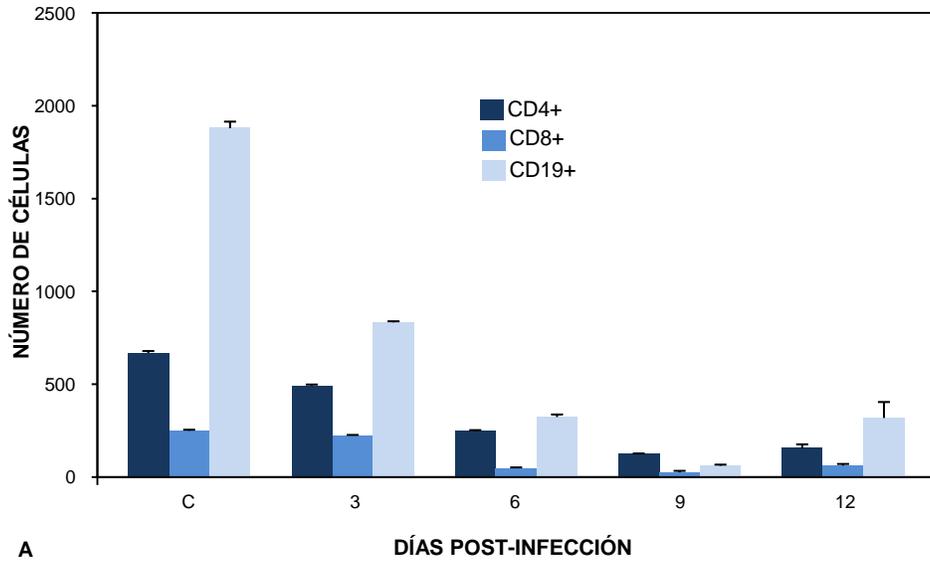


Fig. 11. Análisis por citometría de flujo de células intraperitoneales de un ratón sano (a – d) y un ratón infectado con *T. crassiceps* de 9 dpi (e – h). CD4: b y f, CD8: c y g y CD19: d y h.

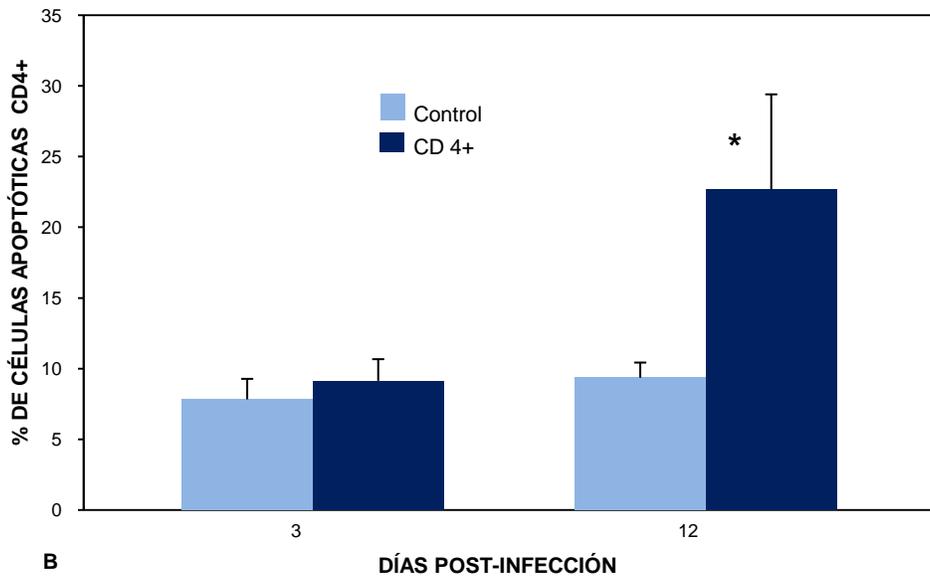
Desde los 3 dpi el número de linfocitos T y B baja considerablemente y no deja de disminuir hasta llegar a los 9 dpi. A los 12 dpi aumentan ligeramente (Fig. 12A). No se encontró apoptosis en células CD8+ y CD19+ (dato no mostrado). En cuanto a las células CD4+, solo se encontró apoptosis a los 3 y 12 dpi. El porcentaje de células apoptóticas CD4+ a los 12 dpi (22.7%) es significativamente mayor ($P < 0.05$) con respecto al control, 9.36% (Fig. 12B).

Se realizó un experimento sacrificando 5 ratones de 12 dpi en donde se confirmó la drástica disminución de linfocitos CD4+, CD8+ y CD19+, en comparación con el número de linfocitos peritoneales que hay en un ratón sano (Fig. 12C).





A



B



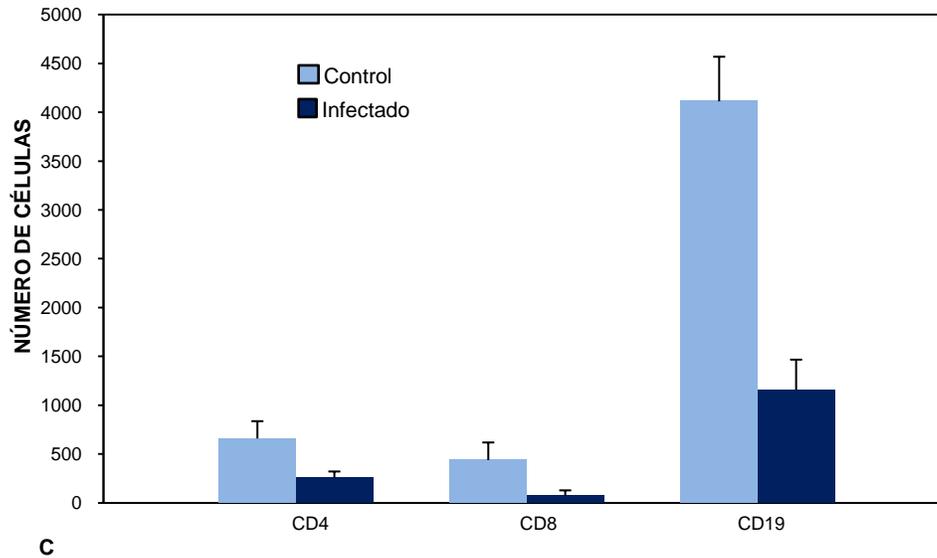


Fig. 12. Análisis por citometría de flujo de células peritoneales de ratones hembras Balb/c infectados con *T. crassiceps* de diferentes días post-infección. A) Células CD4+, CD8+ y CD19+ en muestras de 10,000 células. B) Porcentaje de células CD4+ apoptóticas medidas con Annexin A/Pi en muestras de 10,000 células. * P<0.05 vs. control. C) Media del número de células CD4+, CD8+ y CD19+ de 5 ratones infectados de 12 dpi en muestras de 10000 células)

5. Caspasa 3

Se midió la actividad de la caspasa 3 en células del peritoneo a los 6, 9 y 16 dpi. Como testigo positivo (C+) se usaron células U937 induciéndolas a apoptosis con camptotecina. El control negativo no mostró actividad (dato no mostrado). Para inhibir la actividad de la caspasa 3 se usó DEVD-CHO (Asp – Glu – Val – Asp - Aldehído) que es sustrato específico de esta enzima. Se encontró una actividad importante de esta enzima a los 6, 9 y 16 dpi. A los 9 y 16 dpi incluso es más alta que la del control positivo. Esta actividad disminuyó totalmente al estar en contacto con su inhibidor específico (Fig. 13).



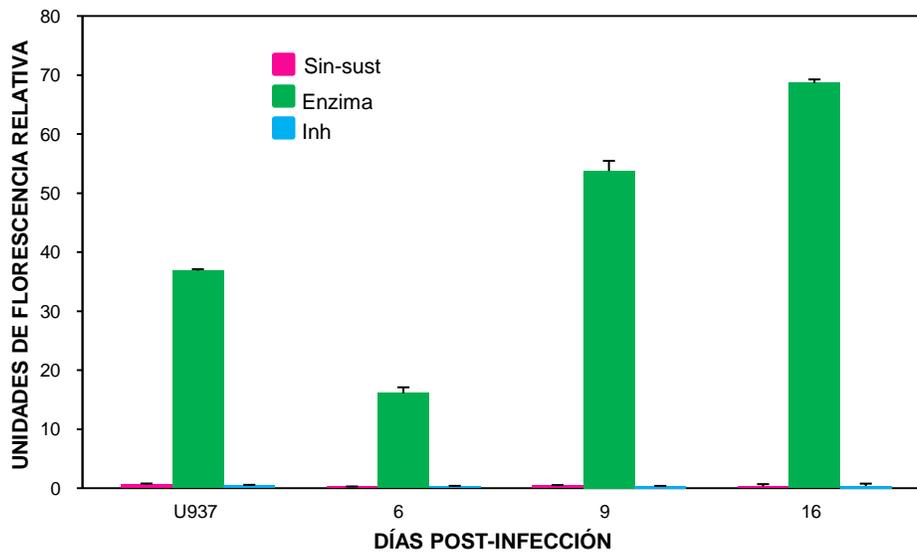


Fig. 13. Actividad de Caspasa 3. Las barras representan la actividad de caspasa 3 en células peritoneales de ratón infectado con metacéstodos de *T. crassiceps* en unidades de fluorescencia. Sin-sust = sin sustrato. Enzima = células mas sustrato de caspasa-3 (DEVD-AFC). Inh = con inhibidor de caspasa 3. No se encontró actividad de caspasa3 en ratones control ni en blancos (dato no mostrado). Se usaron células U937 apoptóticas como controles positivos.

6. Escalera de ADN

Se ha reportado que la proteína PAK2 (p21 – actived kinase 2) es la encargada de activar a la CCP32 (Human active caspase 3) (Rudel et al. 1997). Esta proteína es la que induce la fragmentación del ADN en una célula apoptótica. En la figura 14 se puede ver que a los 9 y 12 dpi hay una fragmentación clara del ADN en las células peritoneales de ratones infectados. Mientras que a los 16 dpi se observa una imagen de necrosis. El testigo negativo (C-) no presenta ningún bandeo por lo que en las células peritoneales de éste, no hay apoptosis. Esto sugiere que la apoptosis de las células de los ratones infectados es causada por la presencia de metacéstodos de *T. crassiceps*.



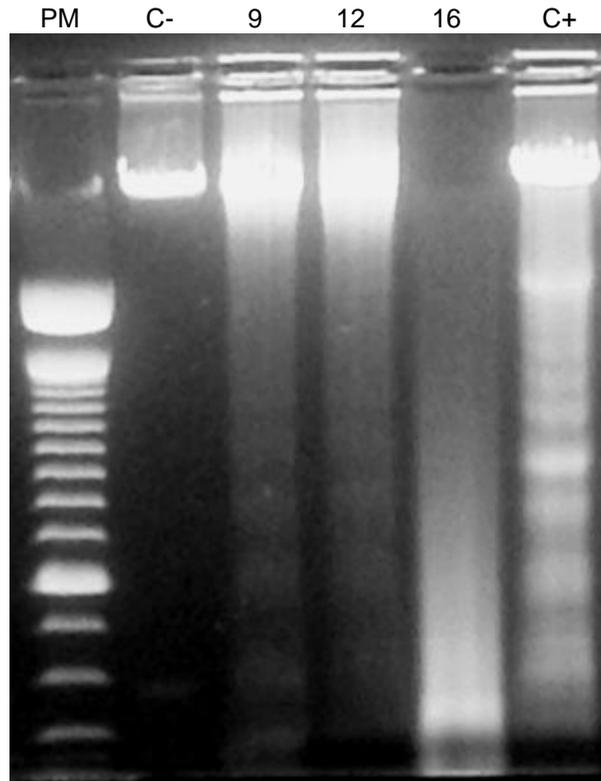


Fig. 14. Fragmentación del ADN. PM = Peso molecular estándar; C- = Células peritoneales de un ratón sano; 9, 12 y 16 = Células peritoneales de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* de 9, 12 y 16 dpi. y C+ = Células U937 inducidas a apoptosis con camthotencina.

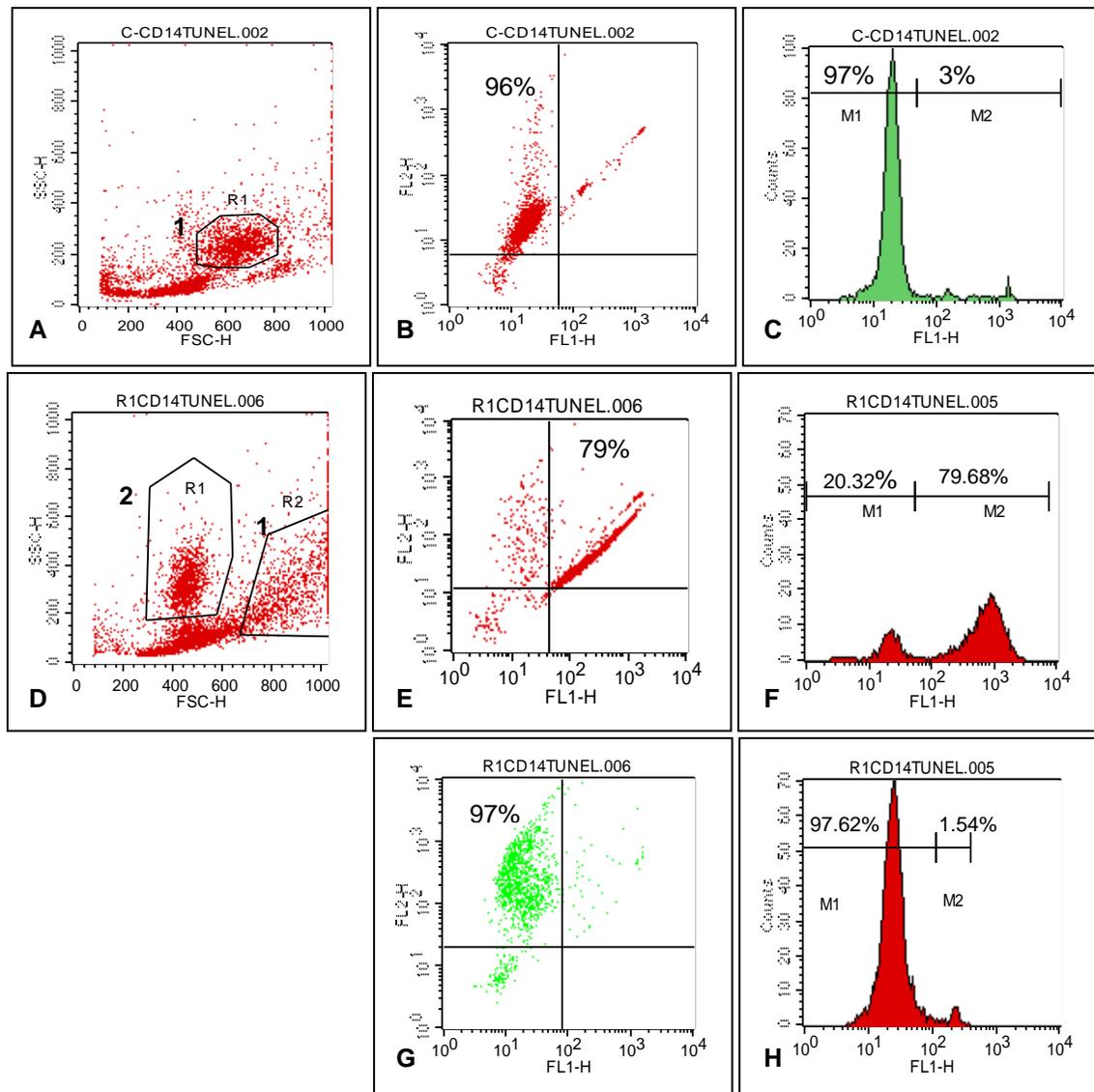
7. TUNEL macrófagos y eosinófilos.

En las células del peritoneo de un ratón sano, solo se encontraron macrófagos y linfocitos, como ya se había visto en la Fig. 9. 1 = macrófagos y 2 = eosinófilos. En macrófagos CD14+ no se encontró apoptosis (Fig. 15B), es por eso que en el histograma del parámetro FL1, la mayoría de los eventos (97%) están en la región M1 (Fig. 15C). Los eosinófilos del ratón infectado con metacéstodos de *T. crassiceps* con 12 dpi resultaron apoptóticos en su mayoría (Fig. 15E) por lo que en el histograma del parámetro FL1 de este gráfico, el 79% de los eventos aparecen en la región M2 (Fig. 15F). En el caso de los macrófagos del ratón



infectado el porcentaje de células CD14+ apoptóticas es muy bajo, al igual que el del ratón testigo, como se puede apreciar en la figura 15G y H. Esto confirma lo observado en la figura 10B en donde se aprecia el alto porcentaje de eosinófilos apoptóticos y el bajo porcentaje de macrófagos apoptóticos. Todo esto detectado con anti-Anexin A-FITC.





TUNEL

Fig. 15. Análisis por citometría de flujo de células intraperitoneales de ratón CD14+ apoptóticas a los 6 dpi infectados con *T. crassiceps*. Células peritoneales de un ratón sano (testigo) y un ratón infectado de 6 dpi. (A y D). 1 = macrófagos y 2 = eosinófilos. Valor de fluorescencia de células control CD14+ (B y C). Valores de fluorescencia de eosinófilos CD14+ apoptóticos (E y F). Valores de fluorescencia de macrófagos CD14+ (G y H). La apoptosis fue medida con TUNEL. Medias de eosinófilos apoptóticos de 5 ratones infectados: $88.5\% \pm 7.18\%$ (2238 ± 926). Medias de macrófagos no apoptóticos de 5 ratones infectados: $95.5\% \pm 1.5\%$ (3377 ± 797)



8. Actividad de proteasas.

Se encontró que en los sobrenadantes de los ratones infectados hay actividad de proteasa entre 8 y 10.4 UFR, a los 6 dpi se observó la mayor actividad. Al agregar el E-64, la actividad disminuye un 50% en todos los casos. La actividad disminuye un 80% al agregar pefabloc y un 90% cuando se agregan ambos inhibidores (Fig. 16).

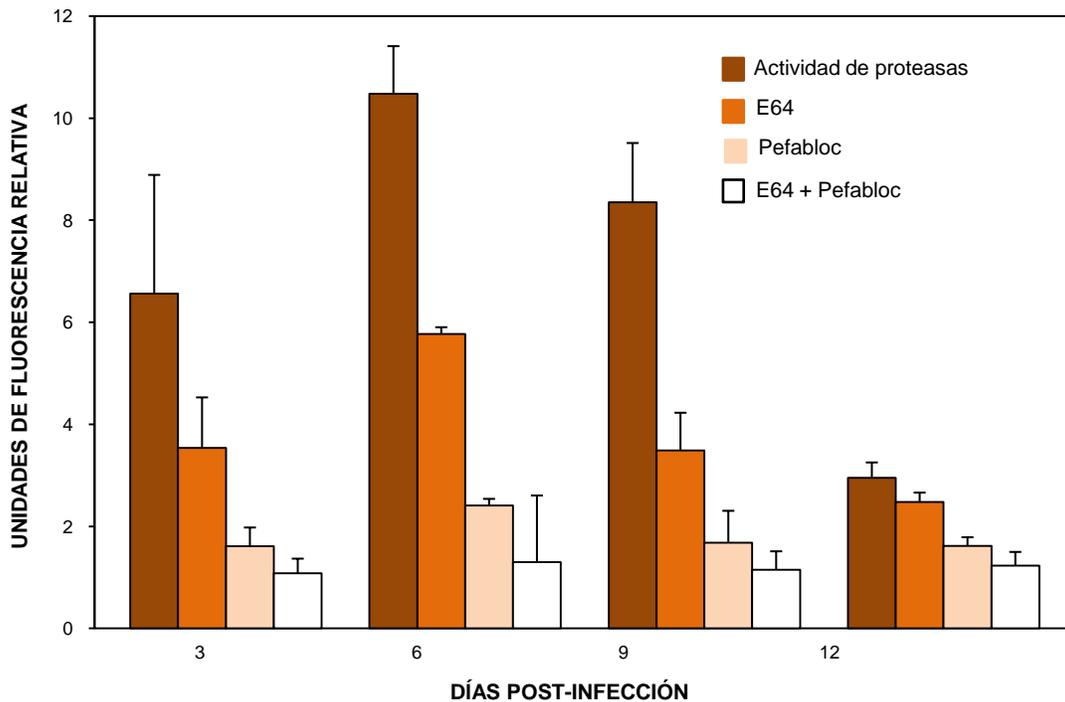


Fig. 16. Actividad de la cisteín y serín proteasas en fluidos peritoneales de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps*, así como también la inhibición de las mismas por sus inhibidores correspondientes.

9. TUNEL linfocitos.

Para conocer el efecto de la cisteín proteasa sobre linfocitos sanos, se cocultivaron células de bazo CD4 y CD8 de un ratón sano y metacéstodos de *T. crassiceps*. En los resultados se observó que los linfocitos T CD4 sanos presentan



apoptosis en 1% (Fig. 17 A), cuando estas células se ponen en contacto con la E/S de los metacéstodos presentan un 7.3% de apoptosis (Fig. 17 B) y cuando los metacéstodos son preincubados con E-64, la apoptosis baja a 4.3% (Fig. 17 C). Para los linfocitos T CD8, el efecto es parecido, las células sanas presentan 1.5% de apoptosis, las células en contacto con E/S de los metacéstodos presentan una apoptosis de 12.7% y cuando se preincuban los metacéstodos con E-64, la apoptosis es de 6.5% (Fig. 17 D –F). El pefabloc no disminuyó la apoptosis en las células (dato no mostrado). Los linfocitos CD19+ no mostraron signos de apoptosis (dato no mostrado).

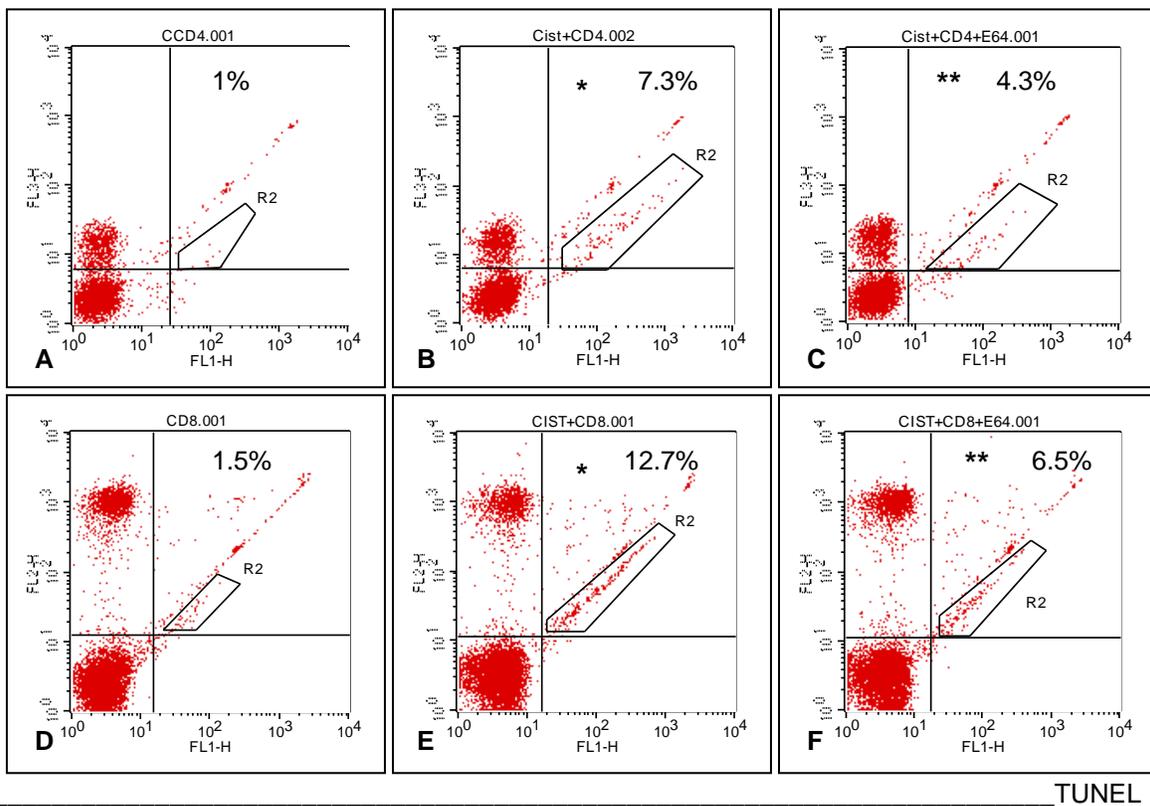


Fig. 17. Co-cultivos de células esplénicas CD4+ y CD8+ de un ratón sano Balb/c con metacéstodos de *T. crassiceps*. Porcentaje de apoptosis de células CD4+ y CD8+ (A y D); de células CD4+ y CD8+ en co-cultivo con metacéstodos de *T. crassiceps* (B y E), y co-cultivos de células CD4+ y CD8+ con metacéstodos adicionados con E-64 (C y F). * P<0.001 de células CD4+ y CD8+ cultivadas con metacéstodos vs. células testigo. ** P<0.001 de células CD4+ y CD8+ cultivadas con metacéstodos vs. células CD4+ o CD8+ cultivadas con metacéstodos en presencia de E-64. Los gráficos son la representación de 3 experimentos diferentes.



10. Microscopía electrónica

Las células peritoneales de un ratón infectado con metacéstodos de *T. crassiceps*, presentan signos de muerte celular programada tales como: cromatina condensada, cuerpos apoptóticos, estrangulación y fragmentación del ADN. Así lo revelan resultados del análisis de estas mediante microscopía electrónica. Los macrófagos, linfocitos y eosinófilos presentan cromatina condensada y en algunos casos cuerpos apoptóticos dentro y fuera de las células (Fig. 18B). Se encontró también un macrófago fagocitando un cuerpo apoptótico el cual presenta cromatina compactada y numerosas vacuolas (Fig. 18C). En cuanto a los linfocitos, se encontró uno que presenta estrangulación y fragmentación de ADN, así como también cromatina compactada y cuerpos apoptóticos (Fig.18D). Las células peritoneales de un ratón sano se ven sin daño membranal y no presentan signos de apoptosis (Fig.18A).



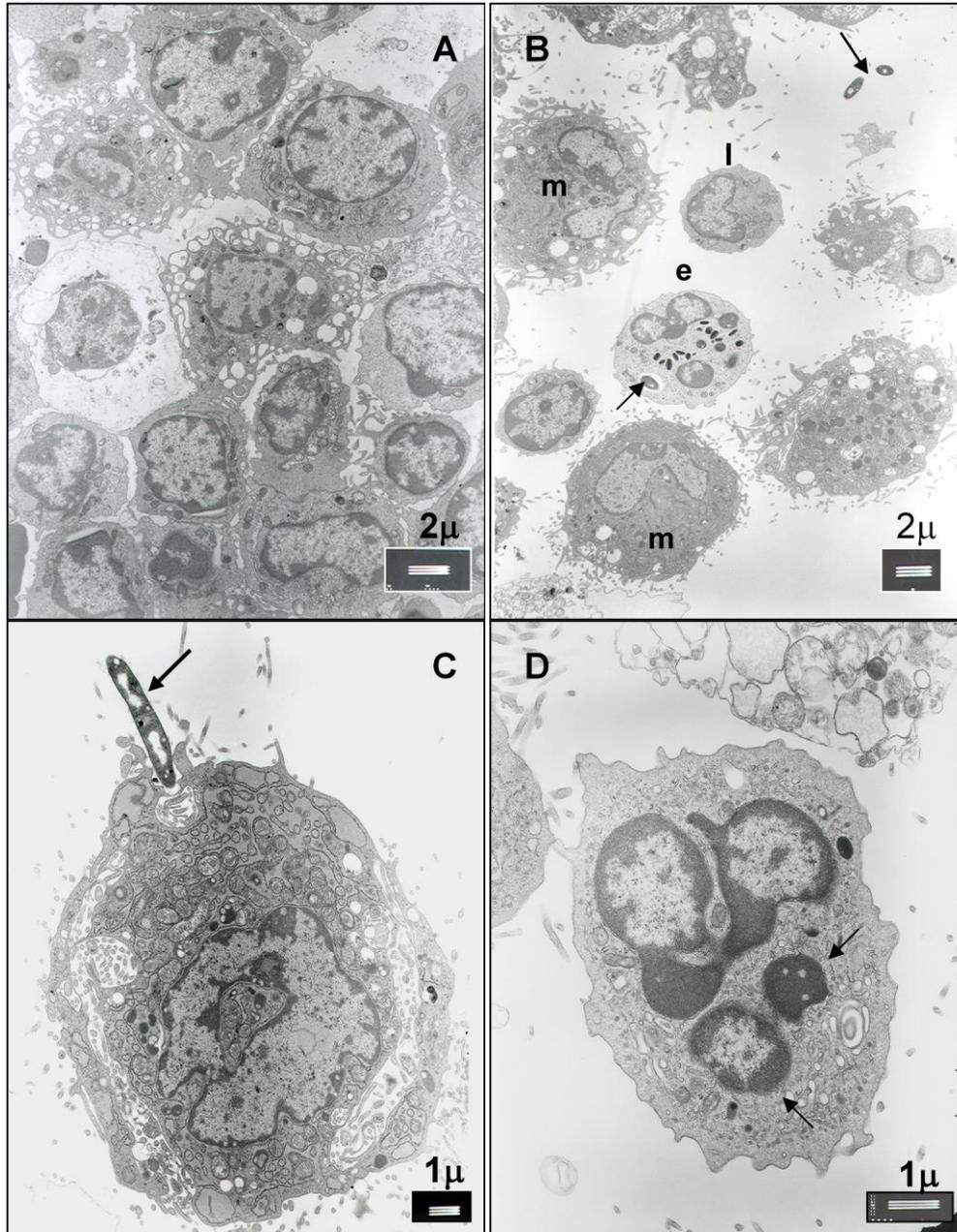


Fig. 18. Microscopía electrónica de células peritoneales de un ratón sano y un ratón infectado con metacéstodos de *T. crassiceps*. A) Micrografía de una célula peritoneal e un ratón sano la cual muestra estructuras intactas. B) Micrografía de células peritoneales de un ratón infectado: l=linfocitos, m=macrófagos y un e=eosinófilos con signos evidentes de apoptosis nuclear. Las flechas señalan cuerpos apoptóticos. C) Micrografía de un macrófago fagocitando un cuerpo apoptótico (flecha) con señales de apoptosis nuclear. D) Micrografía de un linfocito exhibiendo cromatina compacta, estrangulación y fragmentación del núcleo y cuerpos apoptóticos (flecha)

DISCUSIÓN.

Los resultados de la investigación mostraron que el número de células que hay en el peritoneo de los ratones infectados con metacéstodos aumenta considerablemente en comparación al número de células en un ratón sano (3.7×10^6), como se muestra en la figura 7. Al hacer un estimado del número de células mediante la microscopía óptica se encontró que la mayor parte de estas células a los 9 dpi son macrófagos, monocitos y eosinófilos. Por el contrario los linfocitos se encuentran reducidos a más de la mitad con respecto al ratón control (Fig. 8).

Al someter las células de 3, 6, 9, 12 y 16 dpi al análisis por citometría de flujo, se observó como el número de eosinófilos y de los macrófagos aumentaron considerablemente con respecto al testigo. Sin embargo al analizar estas células con Annexin A y TUNEL se encontró la presencia de apoptosis en los eosinófilos sobre todo en los de 6 dpi, mientras que los macrófagos mantienen sus niveles de apoptosis a lo largo del tiempo post-infección (Fig. 10A y B). En la prueba de TUNEL se comprobó la apoptosis de eosinófilos en ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps* de 12 dpi en un 97%, mientras que los macrófagos solo sufren apoptosis en un 1.5% (Fig. 15). En el caso de los linfocitos T Y B hay una drástica disminución (CD4, CD8 Y CD19) a lo largo del tiempo de infección (Fig. 11 y 12), pero al hacer la prueba de apoptosis por Annexin A solo la encontramos en las células CD4, como lo reportan Solano et al. (2006) en infecciones porcinas por *T. solium*. Esto habla de que tanto las células protectoras como las efectoras del sistema inmune del hospedero son inducidas a apoptosis.



La apoptosis puede ocurrir por dos vías: Vía intrínseca (o mitocondrial) y vía extrínseca. En este caso se trata de la vía extrínseca. Al activarse involucra receptores de membrana ricos en cisteína (Sigh, 1998), que desencadenan una cascada de caspasas que inducen la liberación del citocromo C en la mitocondria y Apaf 1. Entre las caspasas, la más importante es la caspasa 3. Se encontró un incremento de la actividad de la caspasa 3 en células peritoneales de ratones infectados con metacéstono de *T. crassiceps* a los 9 y 16 dpi, lo cual confirma la presencia de apoptosis en las células (Fig. 13). También se observó la fragmentación del ADN de células peritoneales en ratones con 9 y 12 dpi (Fig. 14). Cuando la caspasa 3 es activada mediante PAK2, ésta induce la fragmentación del ADN (Rudel et al. 1997). Esto sólo se observa en ratones infectados ya que en el ratón testigo no aparece ningún bandedo que indique que haya células apoptóticas en el peritoneo. Entonces, la apoptosis en células peritoneales de ratones infectados puede deberse a la presencia de los metacéstonos y/o a alguno de sus productos de excreción.

El metacéstono de *T. crassiceps* secreta sustancias al medio exterior, entre las cuales están las proteasas descritas en el presente trabajo. White et al. (1997) reportaron una cisteín y una aspartico proteasas secretadas por *T. crassiceps*. Entre las funciones de estas proteasas estaría proporcionar nutrientes al parásito. El grupo de White (1997) ha reportado que la cisteín proteasa digieren IgG in vitro, lo que sugiere que esta proteasa pudiera estar involucrada en evasión inmune. Otros autores han observado inmunosupresión inducida por el parásito, ya que han encontrado disminución de la proliferación de linfocitos T in vitro y una intensa disminución de respuesta inmune a antígenos protectores obtenidos de



Salmonella typhimurium contra una infección con *S. Typhimurium* virulenta, respectivamente (Sciutto et al. 1995; Rubio et al. 1998). Sin embargo los productos secretados por los parásitos, con los que regulan la respuesta del hospedero no han sido bien estudiados. Existen reportes de que algunas sustancias secretadas por el parásito que disminuyen la proliferación de células T *in vitro* para evadir al sistema inmune del hospedero. Spolski et al. (2000) encontraron que productos de excreción/ secreción, inhiben la proliferación de linfocitos T en una infección temprana con metacéstodos de *Taenia crassiceps*. Se ha descrito una cisteín proteasa de *T. solium* que induce apoptosis en células T murinas *in vitro* (Tato et al. 2004; Solano et al. 2006)

En los resultados presentados aquí, hubo un incremento en la actividad de las proteasas de E/S de parásito, sobre todo a los 6 dpi (Fig. 16). Se detectó la presencia de 2 proteasas, la cisteín proteasa y la serín proteasa, ya que su actividad disminuyó al aplicar sus respectivos inhibidores específicos. El parásito debe utilizar las proteasas secretadas al medio, como mencionamos anteriormente tanto para romper proteínas en péptidos pequeños para poder absorberlos y de esta manera nutrirse, así como también para lograr evadir el sistema inmune de hospedero induciendo a apoptosis células como los linfocitos T, CD-4, CD-8 y a los eosinófilos. Esto último se puede apreciar en la figura 17 en donde podemos observar que al cultivar *in vitro*, células sanas con metacéstodos de *T. crassiceps* tratados y no tratados con E-64, que cuando los metacéstodos secretan libremente al medio las proteasas, la apoptosis de los linfocitos CD4+ y CD8+, aumenta a 7.3% y 12.7% respectivamente; mientras que las células cultivadas con



metacéstodos tratados con E-64 la apoptosis disminuye a 4.3% y 6.5% respectivamente.

Se ha reportado que los macrófagos que han fagocitado células apoptóticas, inhiben la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF – α , IL- 1 β , IL y GM – csf, y que ésta secreta mas citocinas anti inflamatorias incluyendo IL – 19 y TGF – β (Fadok et al. 1999, Voll et al. 1997). En este estudio se observaron macrófagos con cuerpos apoptóticos fagocitados, así como también condensación de la cromatina, estrangulación y fragmentación del núcleo y la presencia de cuerpos apoptóticas en el medio. Estas células muestran claramente su estado apoptótico (Fig. 18).



CONCLUSIÓN.

Los ratones infectados con *T. crassiceps* sufren cambios considerables. Al cuantificar las células que se encuentran en el peritoneo de ratones infectados con metacéstodos de *T. crassiceps*, se encontró un aumento significativo conforme los días post-infección avanzan. Cuando estas células se caracterizaron, fue notable que el número de macrófagos y monocitos se incrementaron de manera significativa, mientras que por el contrario, el número de linfocitos T y B disminuyen drásticamente. De la misma forma, al tercer día, se detectó una nueva población celular, eosinófilos que pudieron haber aparecido antes de este tiempo. Cuando se estudiaron las actividades de las cisteín y serín proteasas del líquido peritoneal de ratones infectados, se encontró una alta actividad de ambas proteasas y al retarlas con sus respectivos inhibidores, esta actividad se redujo significativamente.

Al buscar apoptosis en las células, se identificó una gran presencia de la Caspasa 3 a los 6, 9 y 16 dpi, así como también, al realizar una electroforesis del ADN de células del peritoneo de ratones infectados de 9 y 12 dpi se encontró que el ADN estaba fragmentado. Fueron notables los signos característicos de las células apoptóticas mediante microscopía electrónica; se detectó cromatina compacta, estrangulación y fragmentación del núcleo y cuerpos apoptóticos.

Cuando se tiñeron los macrófagos y eosinófilos mediante la técnica de TUNEL, se identificó una apoptosis significativa en los eosinófilos. Con esta misma técnica se detectó apoptosis en linfocitos CD4+ y CD8+ de ratones sanos, cuando estos son enfrentados a las secreciones de metacéstodos en *T. crassiceps*; esta apoptosis disminuye significativamente cuando los metacéstodos son incubados con E-64



(un inhibidor específico de la cisteín proteasa). Esto sugiere que la apoptosis de estos linfocitos se debe a la presencia de la cisteín proteasa secretada por el parásito. La apoptosis de células inflamatorias debe ocurrir también en la cisticercosis humana y porcina.



ABREVIATURAS.

°C	Grados centígrados
3,4-DCI	3, 4 - dichloroisocoumarin
³ H	Triteada
ADN	Ácido desoxirribonucléico
APAF-1	Factor activador de proteasas 1
Asn	Asparagina
ATP	Adenosin trifosfato
Bcl-2	Linfoma de células B 2
Caspasas	Citosolic aspartate specific proteasas
CCP32	Human active caspase 3
CF	Factor de cisticerco
Cys	Cisteina
DEVD-AFC1	Asparagina – glutamina – valina – asparagina – aldehido
DEVD-CHO	Asparagina – glutamina – valina – asparagina – 7 – amino – 4 – trifluoromethyl coumarin
DFP	Di - ispropylfluorofosfato
DIABLO	Direct IAP- binding protein with low PI
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimetil Sulfoxido
E/S	Excreción / Secreción
E-64	N – [N – (L – 3 – Trans – carboxirane – 2 – carbonyl) – L – leucyl] - agamatine
EDTA	Ethylenediamineteraacetate
EITB	Enzyme linked immunoelectro transfer blot
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FAS	Citocina CD95
FITC	Fluoresceína
FSC	Forward Scattered
HCN	Cianuro de higrógeno
His	Histidina
IAP	Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IFN-gamma	Interferon gamma



IL-4	Interleucina 4
KD	Kilodaltones
LCR	Líquido cefalorraquideo
NCC	Neurocisticercosis
OsO ₄	Tetroxido de osmio
PAK2	p21 – actived kinase 2
PBS	Phosphate buffered saline
PCMP	p - cloromecuribenzoato
PE	Ficoeritrina
Per CP	Peridinin chlorophyll protein complex
PI	Ioduro de propidio
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Smac	Second mitochondria – derived activator of caspases
SNC	Sistema nervioso central
SSC	Side scattered
STAT – 4	Signal transducer and activator of transcription - 4
STAT – 6	Signal transducer and activator of transcription - 6
TBE	Tris / Borate / EDTA
Th1	Células T ayudantes de tipo 1
Th2	Células T ayudantes de tipo 2
TNF	Factor de necrosis tumoral
TUNEL	Deoxynucleotydyl transferase – medated dUTP nick-end labelling
UFR	Unidades de florescencia relativa
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunosuficiencia humana
Z Phe-Ala-AFC	Z fenilalanina – alanina – 7 – amino – 4 – trifluoromethyl coumarina
Z Phe-Arg-AFC	Z fenilalanina – arginina – 7 – amino – 4 – trifluoromehtyl coumarina



BIBLIOGRAFÍA.

Artículos:

Allen JE, MacDonald AS. (1998) Profound suppression of cellular proliferation mediated by the secretions of nematodes. *Parasite Immunology* 20, 241- 247.

Barett A. J. (1994). Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods Enzymol.* 244: 1-15.

Cheema SK, Mishra SK, Rangnekar VM, Tari AM, Kumar R, Lopez-Berestein G. (2003) Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J Biol Chem.* May 30;278(22):19995-20005.

Correa D, Sandoval MA, Harrison LJ, Parkhouse RM, Plancarte A, Meza-Lucas A, Flisser A. (1989) Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Nov-Dec;83(6):814-6.

Crow MT, Mani K, Nam YJ, Kitsis RN. (2004) The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* Nov 12;95(10):957-70.

De Laurenzi V, Melino G. (2000) Apoptosis. The little devil of death. *Nature.* 2000 Jul 13;406(6792):135-6.

Espíndola NM, Iha AH, Fernandes I, Takayanagui OM, Machado Ldos R, Livramento JA, Mendes Maia AA, Peralta JM, Vaz AJ. (2005) Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J Clin Microbiol.* Jul; 43(7):3178-84.

Estrada JJ, Kuhn RE. (1985) Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *J. Neurol Sci.* Nov; 71(1):39-48.

Evans CA, Gonzalez AE, Gilman RH, Verastegui M, Garcia HH, Chavera A, Pilcher JB, Tsang VC. (1997) Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* Jan;56(1):33-7.

Fadok VA, Bratton DL, Frasch SC, Warner ML, Henson PM. (1998) The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation.* Apr;5:551-562



Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. (1999) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine / paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂ and PAF. *J. Clin Invest.* Feb; 101(4):890-898.

François A, Favennec L, Cambon-Michot C, Gueit I, Biga N, Tron F, Brasseur P, Hemet J. (1998) *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? *Am J Surg Pathol.* Apr;22(4):488-92.

Freeman RS (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Can J. Zool.* May; 40: 969-990.

Freeman RS. (1964). Studies on the response of intermediate host infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (cestoda). *Can. J. Zool.* 42:367-372.

Garcia HH, Del Brutto OH. (2003) Imaging finding in neurocysticercosis. *Acta Trop.* Jun; 87(1):71-78

Garcia HH, Del Brutto OH; Cysticercosis Working Group in Peru. (2005) Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol.* Oct;4(10):653-61. Review.

Goldstein JC, Kluck RM, Green DR. (2000) A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. *Ann N Y Acad Sci.* 926:132-41.

Good AH, Miller KL. (1976) Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infect Immun.* Aug;14(2):449-56.

Gourbal BE, Righi M, Petit G, Gabrion C. (2001) Parasite-altered host behavior in the face of a predator: manipulation or not? *Parasitol Res.* 2001 Mar;87(3):186-92.

Hartley, B. S. (1960). Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29:45–72.

Hengartner MO. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature.* Oct 12;407(6805):770-6.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A. (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev.* Dec;15(6):707-24.

Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H. (1996) Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res.* 51:433-55; discussion 455-6.



Ishida MM, Peralta RH, Livramento JA, Hoshino-Shimizu S, Peralta JM, Vaz AJ. (2006) Serodiagnosis of neurocysticercosis in patients with epileptic seizure using ELISA and immunoblot assay. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Nov-Dec;48(6):343-6.

Ito A, Putra MI, Subahar R, Sato MO, Okamoto M, Sako Y, Nakao M, Yamasaki H, Nakaya K, Craig PS, Margono SS. (2002) Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. *J Helminthol.* Dec;76(4):311-4.

Jones BA, Gores GJ. (1997) Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am J Physiol.* Dec;273(6 Pt 1):G1174-88.

Jones GC, Riley GP, Buttle DJ. (2008) The role of proteases in pathologies of the synovial joint. *Int J Biochem Cell Biol.* Feb; 40 (6-7): 1199-218.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today.* Jan;18(1):44-51.

Łabedzka K, Grzanka A, Izdebska M. (2006) [Mitochondria and cell death] *Postepy Hig Med Dosw (Online).*60:439-46.

Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Scitutto E. (1990) Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med.* Sep;114(9):926-8.

Lightowlers MW, Rickard MD. (1988) Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology.* 1988;96 Suppl:S123-66.

Lockshin RA, Zakeri Z. (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Jul;2(7):545-50.

Locksley RM. (1994) Th2 cells: help for helminths. *J Exp Med.* May 1;179(5):1405-7.

López JA, García E, Cortes IM, Sotelo J, Tato P , Molinari JL. (2004) Neurocysticercosis: relationship between the developmental stage of metacestode present and the titre of specific IgG in the cerebrospinal fluid. *Ann Trop Med Parasitol.* Sep;98(6):569-79.

Majno G, Joris I. (1995) Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* Jan;146(1):3-15.



Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Cázares JML. (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann Trop Med Parasitol.* Jan;84(3): 205-8

Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P. (2000) *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes in vitro. *Exp Parasitol.* 2000 Mar;94(3):133-42.

Molinari JL, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M, Sepúlveda J. (1998) Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol Res.* 84(3):173-80.

Nash TE, Neva FA. (1984) Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N Engl J Med.* Dec 6;311(23):1492-6.

Rangnekar VM. (1998) Apoptosis mediated by a novel leucine zipper protein Par-4. *Apoptosis.* Mar;3(2):61-6.

Rao M, Tanksale A, Ghatge M, Deshpande V. (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* Sep;62(3):597-635.

Riedl SJ, Shi Y. (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Nov;5(11):897-907.

Rodríguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI. (2004) A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun.* Aug;72(8):4552-60.

Rubio M, Tato P, Govezensky T, Molinari JL. (1998) Depressed immunity to a *Salmonella typhimurium* vaccine in mice experimentally parasitized by *Taenia crassiceps*. *Vet Parasitol.* Jan 31;74(2-4):179-89.

Rudel T, Bokoch GM. (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science.* Jun 6;276(5318):1571-4.

Sen S. (1992) Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1992 Aug;67(3):287-319.

Singh A, Ni J, Aggarwal BB. (1998) Death domain receptors and their role in cell demise. *J Interferon Cytokine Res.* Jul;18(7):439-50.

Solano S, Cortés IM, Copitin NI, Tato P, Molinari JL. (2006) Lymphocyte apoptosis in the inflammatory reaction around *Taenia solium* metacestodes in porcine cysticercosis. *Vet Parasitol.* 2006 Aug 31;140(1-2):171-6.



Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE. (2000) Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* Jun;22(6):297-305.

Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL. (2004) A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res.* Feb;92(3):197-204. Epub 2003 Dec 3.

Thompson CB. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science.* Mar 10;267(5203):1456-62.

Villagran J, Overa JE. (1988) Cisticercosis Humana Estudio Clínico y Patológico de 481 Casos de Autopsia. *Patología* 26 149-156

Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* Nov 27;390(6658):350-1.

Weingärtner J, Lotz K, Faltermeier A, Driemel O, Kleinheinz J, Gedrange T, Proff P. (2008) The role of apoptosis in early embryonic development of the adenohypophysis in rats. *Head Face Med.* Jul 23;4:13.

White AC Jr, Baig S, Chappell CL. (1997) Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts. *Mol Biochem Parasitol.* Apr;85(2):243-53.

Wünschmann A, Garlie V, Averbeck G, Kurtz H, Hoberg EP. (2003) Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. *J Vet Diagn Invest.* Sep;15(5):484-8.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.

Yan N, Shi Y. (2005) Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:35-56.

Libros:

Abbas AK, Lichtman AH. (2004) Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2° edición. W. B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Alberts B, Wilson J, Hunt T. (2008) Molecular biology of the cell. 5° edición. Garland Science. New York, USA.

Colowick SP, Kaplan NO. (1957) Methods in enzymology. Volume III. Academic Press INC, Publishers. New York, USA.



Faust EC, Russell PF, Jung RC. (1982) Helmintos e infecciones helmínticas. En: Parasitología Clínica. Salvat Editores, S. A. Primera edición. Barcelona, España.

Schmidt DG, Meyer CM, Oslen OW. (1988) Essentials of Parasitology. 4° edición. Brown Publishers. Fowa. USA.

Wolfe M. (2001) Terapéutica de los trastornos digestivos. Ed. Mc Graw Hill. México, D.F.

Tesis:

Hernandez Gonzalez, Rutila Marisela. (1998) Antígenos recombinantes de *Taenia crassiceps*: identificación y caracterización de antígenos relevantes en la relación hospedero-parásito. Facultad de Ciencias, División de estudios de posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México.

Salgado Delgado, Roberto Carlos. (2004) Relación entre la apoptosis y el mecanismo de atresia folicular en ovario de rata. Facultad de ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

