

138

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS SOMATICOS Y  
DE EXCRECION SECRECION DEL CISTICERCO DE  
*Taenia solium* POR MACROFAGOS

**T E S I S**

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

**DAVID GUILLERMO PEREZ ISHIWARA**



MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## R E S U M E N

El estudio de la respuesta inmune en las diversas relaciones huesped-parásito ha demostrado ser de gran utilidad, para conocer los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, las partes del sistema inmune que confieren inmunidad y las acciones que emplean los parásitos para evadir al sistema inmune.

A este respecto el estudio de la respuesta inmune en la cisticercosis se ha caracterizado por alcanzar un grado de desarrollo bastante aceptable en la respuesta humoral, sin embargo, poco se sabe acerca de la respuesta inmune celular, donde solamente se han realizado algunos análisis sobre la capacidad de respuesta celular inespecífica *in vivo*, así como estudios de transformación blastoide de linfocitos en respuesta a mitógenos. Así la importancia relativa de los diferentes antígenos en la estimulación de una respuesta celular dirigida, se desconoce, este conocimiento puede ser de gran importancia para la valoración del efecto de este parásito sobre el estado inmunológico del hospedero, así como para el desarrollo de posibles vacunas o estímulos inmunoproliféricos.

Para que se genere una respuesta inmune celular es necesario que las células presentadoras de antígenos (macrófagos) primero los procesen, para luego presentar a los linfocitos T los antígenos procesados en asociación a las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad. Constituyendo el objetivo principal del presente trabajo el estudiar el procesamiento antigénico de los antígenos somáticos y de excreción-secreción efectuado por las células presentadoras de antígenos (CPAs).

Se realizaron experimentos de contacto permanente y de pulso y seguimiento con antígenos somáticos (EC) y de excreción-secreción (ES), analizados por inmunoelectrotransferencia con anticuerpos policlonales anti-EC y anti-ES (se empleó la línea celular murina de macrófagos J774.1, como CPAs), el análisis mostró que los macrófagos seleccionan en un tiempo de 15 a 30 minutos, 13 bandas antigénicas de un mosaico de 40 a 45 que presentan los antígenos somáticos (EC), y las procesan en un tiempo de 30 minutos (período lag) excepto una banda de 73 kd, la cual no presentó el menor indicio de procesamiento. Con lo que respecta a los antígenos de excreción-secreción las CPAs no unen ni procesan antígenos, debido a que los cisticercos secretan al parecer un factor tóxico que disminuye su viabilidad entre un 40 y un 50%, que en condiciones naturales pudiera estar regulando negativamente la respuesta celular.

# I N D I C E

## I. INTRODUCCION

### 1.- Antecedentes sobre *Taenia solium*.

1.1. Clasificación taxonómica ..... 1

1.2. Ciclo de vida y morfología ..... 1

### 2.- Cisticercosis

2.1. Localización ..... 4

2.2. Sintomatología ..... 5

### 3.- Inmunología

### 4.- Papel del macrófago en la defensa del organismo y su interacción con el sistema inmune.

4.1. Defensa del organismo ..... 9

4.2. Procesamiento y presentación de antígenos ..... 10

## II. JUSTIFICACION ..... 15

## III. HIPOTESIS ..... 16

## IV. OBJETIVOS ..... 17

## V. METODOLOGIA

1. Cultivo celular ..... 18

### 2. Antigenos

2.1. Extracto crudo (EC) ..... 20

2.2. Excreción-secreción (ES).....	21
3. Anticuerpos	
3.1. Policlonales contra extracto crudo.....	22
3.2. Policlonales contra excreción-secreción..	22
4. Electroforesis en geles de poliacrilamida .....	23
5. Inmunolectrotransferencia .....	24
6. Perfil inmunológico de antígenos somáticos y de excreción-secreción.....	25
7. Diseño experimental .....	26
VI. RESULTADOS .....	31
VII. DISCUSION .....	37
VIII. CONCLUSIONES .....	49
IX. BIBLIOGRAFIA .....	51

## I. INTRODUCCION

La cisticercosis es una parasitosis ampliamente distribuida en países en vías de desarrollo donde predominan las malas condiciones higiénicas y una incipiente industria porcina, además de una deficiente educación. Es endémica en el sureste de Asia no islámica, la parte central y sur de Africa y en América Latina (1), siendo Brasil y México los países más afectados en el continente americano. Las características propias de esta enfermedad hacen que se considere como un problema serio para la salud pública y la economía ganadera, ya que los costos de hospitalización, atención médica, cirugía, medicamentos y la pérdida de la producción laboral que ocasiona la neuro- cisticercosis son muy elevados (2).

### 1. Antecedentes sobre *Taenia solium*

#### 1.1 Clasificación taxonómica.

PHYLUM	Platyhelminthes
CLASE	Cestoda
ORDEN	Cyclophyllidae
FAMILIA	Taenidae
GENERO	<i>Taenia</i>
ESPECIE	<i>Taenia solium</i> (linnaeus, 1758)

## 1.2. Ciclo de vida y morfología.

*Taenia solium* (Linnaeus, 1758) es un helminto hermafrodita, cuyo estadio adulto vive adherido a la pared del intestino delgado del hombre (figura 1A). Su cuerpo alargado y aplanado que mide entre 2 a 7 m de longitud, está constituido por un escólex piriforme de 1 a 2 mm de diámetro, que porta un roseto con doble hilera de ganchos y 4 ventosas musculares como órganos de fijación. El escólex se continúa con el cuello, porción germinal que da origen a los proglótidos (unidades de reproducción independiente) que conforman la siguiente y última porción corporal, el estróbilo (3). Esta región está conformada por: proglótidos inmaduros cerca del cuello, que no muestran órganos sexuales diferenciados; proglótidos maduros en la región media que exhiben órganos sexuales masculinos y femeninos; y proglótidos grávidos en la porción distal, que sólo muestran un saco uterino tubular, que presenta de 7 a 16 ramas laterales, en las cuales se encuentran entre 50,000 a 100,000 huevecillos por proglótido (4,5).

Los proglótidos grávidos, llenos de huevecillos se desprenden del estróbilo y salen junto con las heces del hospedero donde son liberados al ambiente.

Los huevecillos, que miden de 30 a 40 mm de diámetro, poseen varias envolturas que permiten al embrión sobrevivir en el ambiente (figura 1C). La capa más externa, es una membrana delgada, hialina conocida como vitelo, que usualmente se pierde en las heces; la

siguiente envoltura es el embrióforo denso, formado por pequeños bloques unidos entre sí por un cemento, que le da a los huevos su aspecto radiado característico; finalmente se encuentra la membrana oncosferal, que rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto (6). El huevo es el único estadio del parásito que está expuesto al ambiente, por lo que la desecación y las altas temperaturas son factores que disminuyen su sobrevivencia; no obstante, en estudios hechos con huevos de *T. hidatygena* y *T. saginata* se observó que pueden permanecer viables e infectantes en aguas negras, ríos o pasturas por semanas e inclusive meses (7).

Tanto el hombre como el cerdo adquieren cisticercosis por comer huevos de *T. solium* provenientes de materia fecal humana contaminada (figura 1 E,F,D). La eclosión del huevo de *T. solium* ingerido, ocurre cuando el cemento que une a los bloques del embrióforo, es digerido por las enzimas gástricas e intestinales, lo que ocasiona la disgregación del embrióforo y de la membrana oncosferal, reestableciendo de esta manera la comunicación de la oncosfera con el medio exterior (6).

Las oncosferas ya liberadas penetran la pared intestinal mediante la liberación de sustancias líticas, alcanzan vasos sanguíneos y linfáticos, a través de los cuales son transportadas a todo el organismo, y se instalan en el tejido muscular esquelético o cardíaco, tejido subcutáneo, sistema nervioso central y ojo (8). Después de la penetración de las oncósferas, el embrión



requiere de por lo menos diez semanas para desarrollarse en un cisticerco o metacéstodo, que constituye el estadio larval de *T. solium* (9,10).

El cisticerco que mide de 0.5 a 2.0 cm de diámetro, está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de líquido (figura 1 D,E), que alberga a un escólex invaginado, que al igual que el adulto, presenta 4 ventosas y un rostelo con doble corona de ganchos. El ciclo se completa cuando el hombre ingiere carne de cerdo infectada mal cocida, o cruda. Nuevamente, las enzimas y sales biliares del aparato digestivo inducen la activación del parásito, que evagina y se ancla en la pared del intestino (11) para desarrollarse en un gusano adulto -comúnmente denominado solitaria- en aproximadamente 4 meses.

## 2. Cisticercosis.

### 2.1. Localización.

La cisticercosis humana más frecuente en México es la cerebral (neurocisticercosis), debida al establecimiento de la larva en el parénquima, el espacio subaracnoideo o en las cavidades ventriculares del sistema nervioso central (snc); le sigue en frecuencia la cisticercosis ocular, debida al establecimiento del parásito dentro del globo ocular o detrás de la retina, mientras que la subcutánea y la muscular se encuentran en menos casos (9).

## 2.2. Sintomatología.

El daño que produce el cisticerco al ser humano cuando se establece en el SNC es variable; muchos de los casos de neurocisticercosis humana cursan asintomáticos (12,13), con valores que varían entre 25 y 80% debido en parte a la fuente de obtención de los datos. Sin embargo, es un hecho que muchos de los individuos que tienen cisticercos en el sistema nervioso central no presentan síntomas lo suficientemente graves como para asistir al médico y sólo son identificados en la necropsia (14). Aún entre los casos sintomáticos existe una enorme heterogeneidad en los síntomas, que son desde perturbaciones sensoriales o motoras leves, hasta la presencia de crisis convulsivas, cefalea y cuadro de hipertensión endocraneana, debido a la obstrucción de la circulación de líquido cefalorraquídeo, que en ocasiones provoca la muerte (14). Esta heterogeneidad puede deberse a diferencias en el número de parásitos, a su viabilidad o localización y a la respuesta que inducen.

## 3. Inmunología.

El estudio de la respuesta inmune en las diversas relaciones huésped-parásito ha demostrado ser de gran utilidad, para conocer los componentes del parásito que inducen una respuesta protectora, las partes del sistema inmune que confieren inmunidad y las acciones que emplean los parásitos para evadir al sistema inmune.

La respuesta inmune humoral en la cisticercosis se conoce desde hace tiempo, debido a que es la base del diagnóstico serológico de la enfermedad (15).

Con el uso de la inmunolectroforesis (IEF) se llevó a cabo la primera caracterización, en cuanto a las clases de inmunoglobulinas presentes como anticuerpos en el suero y los antígenos del parásito que estos anticuerpos reconocen; se clasificaron a los antígenos del cisticerco de acuerdo a su movilidad electroforética, definiendo de esta manera ocho antígenos denominados con las primeras letras del alfabeto. El antígeno más frecuentemente reconocido fue el antígeno denominado B (AgB), que es una proteína de secreción del parásito, formada por dos subunidades de 95-105 KDa (16,17) contra la cual el 85% de los sueros positivos tienen anticuerpos específicos.

En estudios más recientes la respuesta humoral ha sido caracterizada con métodos más sensibles y de mayor resolución. Por ELISA (del inglés Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) se determinó que los anticuerpos de clase IgG contra el extracto total del cisticerco están presentes en la mayoría de los sueros o líquidos cefalorraquídeos (LCRs) (85%), siguiéndole en frecuencia los anticuerpos de clase IgM (50%) e IgA (26%) (18).

Se ha encontrado también que los cisticercos producen antígenos que se pueden detectar en el líquido cefalorraquídeo de seres humanos o en el suero de porcinos infectados (19).

Posteriormente, con la aplicación de la inmuno-electrotransferencia (IET) para el diagnóstico de la neurocisticercosis humana, se corroboró la heterogeneidad de la respuesta inmune de los pacientes (20), usando como antígenos glicoproteínas del cisticerco de *T. solium*, purificadas por cromatografía de afinidad con lentil-lectina, se identificaron 7 glicoproteínas del parásito que son reconocidas por el suero, la saliva o el líquido cefaloraquídeo (LCR) de los pacientes con neuro-cisticercosis confirmada (21,22).

Con respecto a la respuesta celular se han efectuado algunos análisis en pacientes con cisticercosis sobre la capacidad de respuesta celular inespecífica *in vivo*, por medio de la respuesta cutánea al derivado protéico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD), se encontró que los pacientes presentan una baja respuesta celular, respondiendo sólo el 5% de ellos, en comparación al 50% de los sujetos sanos, frecuencia similar a la ya conocida para la población Mexicana (23). También se han efectuado estudios de transformación blastoide de linfocitos de sangre periférica, en respuesta a los mitógenos fitohemaglutinina (PHA), concavalina A (Con A) y fitolaca americana (PWM). El promedio de los valores de transformación blastoide con los tres mitógenos, está disminuido en los enfermos con neurocisticercosis. También se detectó en los enfermos con cisticercosis, mayor susceptibilidad a padecimientos asociados con una mala regulación de la respuesta inmune (24). De este estudio surgió la hipótesis de que el

parásito tiene la capacidad de inmunosuprimir a su huésped. Sin embargo, estos datos fueron obtenidos con muy pocas muestras; datos más recientes mostraron que la respuesta celular no siempre está disminuida, pues hay casos que responden de manera normal a mitógenos, e incluso a un extracto crudo o al antígeno B (Gorodezky, C. Comunicación personal).

Como se puede observar, el estudio de la respuesta inmune en la cisticercosis por *T. solium* ha sido desbalanceado, pues se ha caracterizado por alcanzar un grado de detalle bastante aceptable sobre la respuesta humoral, pero con poco conocimiento acerca de la respuesta celular.

Para que se genere una respuesta inmune celular contra un antígeno exógeno, es necesario que los linfocitos T reconozcan al antígeno asociado a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPAs). Existen diversas estirpes celulares que pueden funcionar como CPAs: los linfocitos B, las células de Langerhans, las células dendríticas, las células endoteliales, las células epiteliales, los fibroblastos y las células presentadoras por excelencia, los macrófagos.

#### 4. Papel del macrófago en la defensa del organismo y su interacción con el sistema inmune.

##### 4.1. Defensa del organismo.

El descubrimiento de la fagocitosis (Elie Metchnikoff en 1880) por una gran célula denominada macrófago, inició una era de intensa investigación acerca del papel que juega esta célula en la defensa contra agentes infecciosos.

Inicialmente se le consideró simplemente como un "basurero del ambiente extracelular"; sin embargo, en la actualidad es claro que el monocito/macrófago, es una célula muy compleja, altamente secretora, que participa en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en un proceso inflamatorio; que tiene funciones microbicidas, que incluyen no sólo el ataque directo de los microbios sino también la secreción de productos celulares, que activan a otras células que a su vez asisten en la eliminación de los patógenos (figura 2).

Entre los principales mecanismos de defensa que poseen están los mecanismos microbicidas intracelulares, en los que después de la ingestión del organismo patógeno, los macrófagos normalmente lo eliminan utilizando dos vías:

a) Oxígeno independiente, por acidificación del fagosoma por fusión lisosomal y b) oxígeno dependiente, por la generación de metabolitos tóxicos de la molécula de oxígeno (25,26,27). También

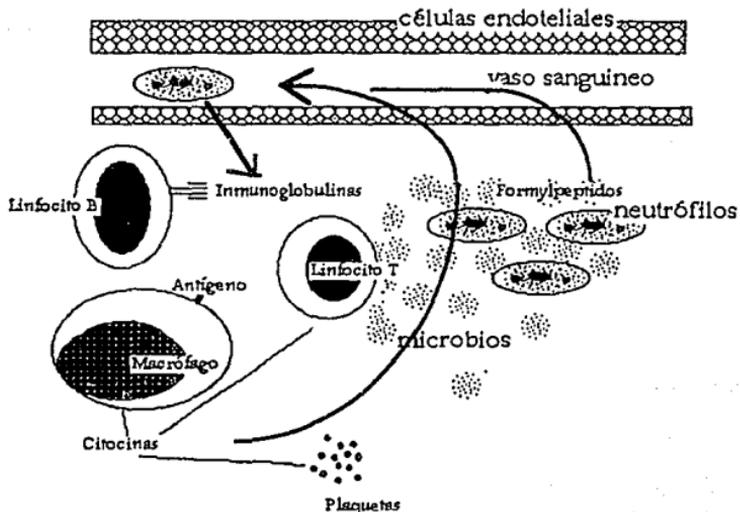


Figura 2. Participación del macrófago en la defensa del organismo, reclutando neutrófilos y monocitos en un proceso inflamatorio; secretando citocinas que activan a otras células; atacando directamente a microorganismos y activando y desencadenando la respuesta T celular (presentación antigénica). (Traducido de referencia 34).

pueden directa o indirectamente dañar a organismos que no pueden fagocitar; un ejemplo de esto es el daño provocado a la esquistosómula de *Schistosoma mansoni* donde los macrófagos incubados con suero inmune, fueron capaces de unir y matar a las esquistosómulas (28), determinándose que el daño era mediado por la IgE, pero que la IgE sin la presencia de macrófagos no la mataba (29). Este mecanismo de daño del macrófago mediado por la IgE, observado inicialmente en tremátodos, se ha encontrado también en algunos nemátodos (30,31). Aunque existe poca evidencia *in vivo*, este mecanismo parece contribuir de manera importante en la defensa del organismo contra algunas infecciones parasitarias (32).

Por otro lado, en su interacción con el sistema inmune desempeñan como se mencionó un papel primordial y crítico como células accesorias en la presentación de antígenos para la activación de las células T, actualmente este proceso es una de las áreas de mayor interés en la inmunoparasitología ya que es la base de la respuesta celular.

#### 4.2. Procesamiento y presentación de antígenos.

Los linfocitos T, a diferencia de los B -que se unen directamente al antígeno, a través de las inmunoglobulinas-, reconocen antígenos casi siempre de naturaleza proteica por medio de un receptor heterodimérico expresado en su superficie, constituido por dos cadenas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  (33). Este receptor, pertenece a la familia de las inmunoglobulinas; sin embargo, la

diferencia principal estriba en que el receptor es incapaz de unirse directamente a un antígeno libre, sino que lo reconoce asociado o en combinación con una molécula del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) clase I o II (del inglés, Mayor Histocompatibility Complex), expresados en las membranas celulares de las células presentadoras de antígenos (CPAs).

Para que el reconocimiento se lleve a cabo, el antígeno debe ser parcialmente digerido en el interior de la CPA, a péptidos capaces de unirse a la molécula del MHC.

Las moléculas MHC denominadas HLA en el humano y H-2 en ratones son glucoproteínas expresadas en la superficie celular de los vertebrados. Las moléculas clase I, denominadas en el ratón H-2K y H-2D y en el humano HLA-A, B, y C, son glucoproteínas heterodiméricas constituidas por una cadena pesada ( $\alpha$ ), con peso molecular aproximado de 45 Kd, formada por tres dominios extracelulares, una región hidrofóbica transmembranal y una cola intracitoplásmica corta. La cadena  $\alpha$  se asocia en forma no covalente en la superficie celular a una cadena invariable de  $\beta$  2-microglobulina (34).

Por otra parte las moléculas clase II son también heterodímeros expresados en la superficie celular formados por una cadena  $\alpha$  y una  $\beta$ , cada una de ellas con dos dominios extracelulares, uno transmembranal y uno intracitoplásmico. Sus

pesos moleculares son 31-35 y 27-29 Kd respectivamente (36). A diferencia de las moléculas clase I, que son expresadas por la mayoría de las células nucleadas, las glucoproteínas clase II sólo están presentes en algunas células que participan en la respuesta inmune y que comparten entre ellas la capacidad de funcionar como CPAs (35).

Las moléculas clase I y II del MHC tienen un alto grado de polimorfismo, a tal grado, que el número de alelos existentes para cada una de estas moléculas es mayor que para cualquier otra proteína conocida (36). El polimorfismo de las moléculas del MHC, así como el hecho de que el receptor del linfocito T reconoce la combinación de un péptido inmunogénico con una molécula clase I o clase II del MHC, confiere a la respuesta de los linfocitos T, una de sus características fundamentales, la restricción genética por el MHC.

Aunque las características fisicoquímicas de unión del péptido con las moléculas clase I o II parecen ser muy semejantes, ambas difieren tanto en el fenotipo de linfocitos con que interactúan, como en el origen de los péptidos que presentan; esto es, las moléculas clase I son reconocidas por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y presentan péptidos derivados de proteínas endógenas, como proteínas virales, tumorales, o de la misma célula; mientras que las moléculas clase II presentan péptidos derivados de proteínas exógenas que toma la CPA por endocitosis y son reconocidas por los

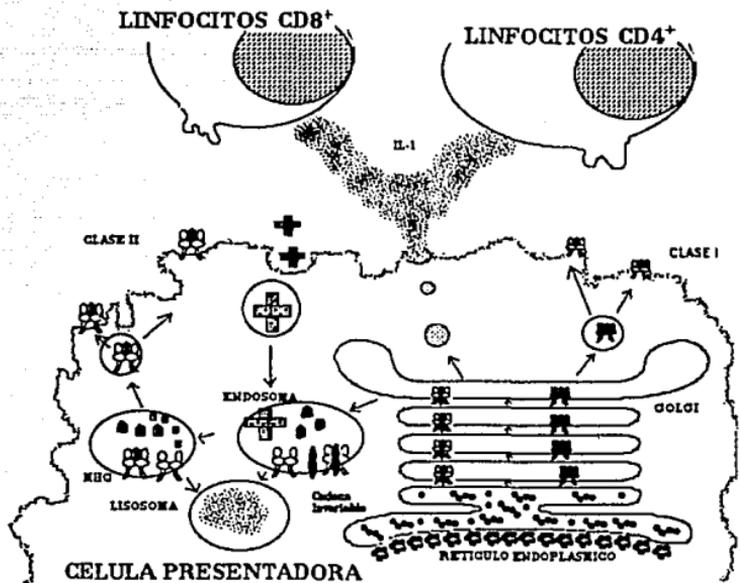
linfocitos CD4<sup>+</sup> (figura 3) (37).

Sin embargo investigaciones recientes han demostrado que estas vías de procesamiento y presentación antigénica (figura 4) no son tan estrictas ya que existen evidencias como la de las proteínas del virus de la Influenza, que son procesadas por la vía endógena y que sin embargo, se pueden asociar a las moléculas clase II, para estimular linfocitos CD4; existen otros ejemplos como el virus de la Hepatitis B y el VIH, en los que siendo antígenos endógenos son procesados en un compartimiento endosomal (vía exógena), para ser presentados por moléculas MHC clase II (38).

El procesamiento de un antígeno, cuya consecuencia final es la unión de los péptidos antigénicos derivados de las proteínas, con las moléculas clase I y II del MHC ocurre intracelularmente.

La ruta de toma y presentación de antígenos exógenos puede ser vista de la siguiente manera (figura 3).

El antígeno interactúa con la superficie del macrófago directamente vía receptores sensibles a tripsina (39) o por receptores Fc/C3 ("selección antigénica") y es interiorizado en fagosomas. Los fagosomas que contienen al antígeno, se fusionan después con un compartimiento endosoma-lisosomal donde ocurre una degradación parcial. Algunos de los fragmentos del antígeno, producidos por acción lisosomal, son liberados y reciclados a la superficie del macrófago por un proceso activo de exocitosis (40),



**Figura 3. Eventos intracelulares que ocurren durante el procesamiento y presentación de antígenos. (Modificado y traducido de referencia 38).**

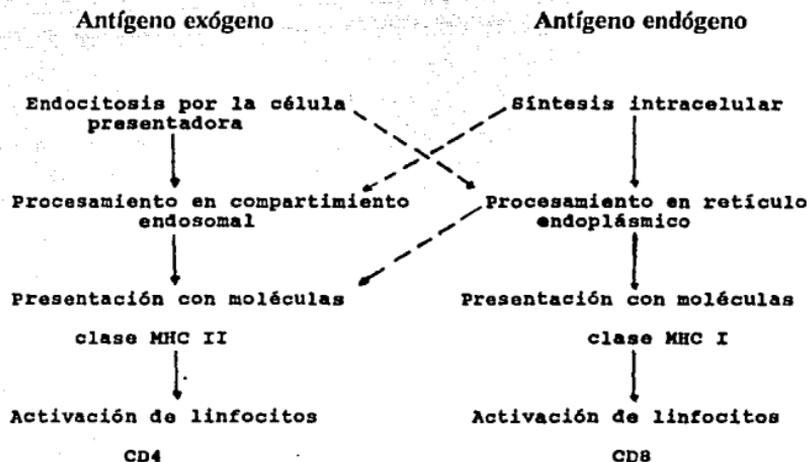


Figura 4. Vías en el procesamiento y presentación de antígenos. (Traducido de referencia 38).

mientras que otros fragmentos que poseen alta afinidad para las glucoproteínas del MHC clase II, permanecen en un compartimiento endosomal tardío, donde las moléculas clase II después de asociarse a un tercer polipéptido denominado cadena invariable en el retículo endoplásmico son translocadas al parecer por proteínas de choque térmico PBP 72/74 (41). Ya dentro del endosoma a consecuencia de las enzimas proteolíticas y de la acidez, la cadena invariable (Ii) se disocia del heterodímero clase II  $\alpha\beta$ , momento en el cual se les asocia el péptido inmunogénico (que al parecer estabiliza la estructura terciaria de la molécula) siendo transportado posteriormente el complejo Ag-MHCII formado a la superficie celular donde será reconocido por el receptor de la célula T (figuras 3,5).

Una vez reconocido el complejo MHC-Ag, los linfocitos T proliferan para llevar acabo varias funciones : por un lado, como células efectoras, que lisan células blanco sobre cuya membrana se halla el antígeno (en el caso de que sean presentadas por MHC I), o células T que regulan, modulan y/o amplifican la respuesta de los linfocitos B, de otros linfocitos T, así como activar la función fagocítica inespecífica de otros tipos celulares.



## II. JUSTIFICACION

El estudio de la respuesta inmune celular en la cisticercosis se ha limitado a realizar algunos análisis sobre la capacidad de respuesta celular inespecífica *in vivo* (23), así como a realizar estudios de transformación blastoide de linfocitos en respuesta a mitógenos.

De esta manera, la importancia relativa de los diferentes antígenos (e incluso de diferentes epítomos) en la estimulación de la respuesta celular en esta parasitosis se desconoce, este conocimiento puede ser de gran importancia para la valoración del efecto de este parásito sobre el estado inmunológico del hospedero, así como para el desarrollo de posibles vacunas o estímulos inmunoproliféricos. Originándose en este sentido, la importancia del análisis de la unión y el procesamiento de antígenos del parásito efectuados por los macrófagos (CPAs).

### III. HIPOTESIS

Teniendo como antecedente que para que la presentación antigénica a linfocitos T se efectúe, es necesario que los antígenos a presentar sean previamente procesados por las células presentadoras de antígenos (CPAs); se puede esperar que los macrófagos (CPAs) seleccionen y procesen antígenos somáticos (EC) y de excreción-secreción (ES) del cisticerco de *Taenia solium* de manera diferencial.

#### **IV. OBJETIVOS**

##### **Objetivo general.**

Reconocer antígenos del cisticerco de *Taenia solium* que pudiesen ser importantes en la respuesta celular.

##### **Objetivos particulares.**

- a) Identificar el patrón de selección antigénica efectuado por las CPAs (macrófagos).
- b) Determinar que antígenos son procesados, así como el tiempo que requiere este fenómeno (tiempo de procesamiento).

## V. METODOLOGIA

### 1. Cultivo celular

Se empleó la línea celular murina de macrófagos J774.1, cuyas características se muestran en la siguiente tabla. (42).

Tabla 1. Características citoquímicas de la línea celular murina J774.1.

Estirpe	Tipo celular	Origen	Características
J.774	Línea celular de Macrófagos	Sarcoma de células reticulares	Receptor Fc* Expresión IA* Receptor C3b* Enzimas: Esterasa* Peroxidasa Lisozima* 5'nucleosidasa* Aminopeptidasa

\* Positiva

La línea se cultivó en medio DMEM (medio Mínimo Esencial modificado por Dulbecco) (Gibco laboratories, U.S.A.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 U/ml de penicilina G sódica, 100 µg/ml de estreptomycin, aminoácidos no esenciales

(Gibco) y 20 mM de glutamina (Gibco).

El manejo de los cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar (Veeco). Se sembraron aproximadamente  $1 \cdot 10^6$  células en cajas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, con un volumen de 7 ml de medio suplementado y  $2 \cdot 10^6$  células por caja de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> con un volumen de 27 ml de medio. Se emplearon cajas de cultivo Corning.

Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en atmósfera húmeda con una mezcla de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Diariamente los cultivos se revisaron al microscopio invertido (Zeiss), se vigiló la morfología celular, así como las posibles fuentes de contaminación bacteriana y/o fúngica. Se realizaron cambios de medio, cuando éste viraba de anaranjado a amarillo, lo que indicaba un cambio en el pH por acidificación. Cuando los cultivos se encontraban confluentes, esto es, cuando la proliferación celular era máxima, se resembraban en cajas nuevas o bien se congelaban a -196 C en dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% en SFB a una concentración de entre 5 y 7 millones de células/ml de mezcla de congelación (DMSO 10%, SFB 90%).

La viabilidad de las células en cultivo fue verificada periódicamente por exclusión al azul tripano (Gibco) al 0.04% en solución salina 0.15 M, amortiguada con fosfatos 0.01 M, pH 7.4 (PBS). (43). Los cultivos celulares se mantuvieron durante la realización completa del trabajo experimental.

## 2. Antígenos

### 2.1 Extracto crudo (EC).

Se preparó extracto crudo del metacéstodo de *T. solium* según una modificación de la técnica descrita por Espinoza y cols (44): se obtuvo carne fresca de cerdo infestada con cisticercos, éstos se disectaron del músculo, sin cápsula inflamatoria, y se puncionaron para eliminar el líquido vesicular, se congelaron inmediatamente en hielo seco para almacenarlos a  $-70\text{ C}$ . Los cisticercos previamente pesados se maceraron congelados en un mortero, añadiendo 2 ml de una solución de inhibidores de proteasas (Fenilmetilsulfonil fluoruro, PMSF, 0.006%; Parahidroximercurobenzoato, PHMB, 0.04%) en agua bidestilada; la mezcla se homogenizó perfectamente, añadiendo 1 ml de PBS 10x por cada 10 ml de volumen de la mezcla. Posteriormente se centrifugó a 30,000 rpm durante una hora a 4C, y se recuperó el sobrenadante; el precipitado se resuspendió en PBS, se sonicó 2 veces a 7 Hz durante 1 minuto, para centrifugar nuevamente; una vez terminado el tiempo de centrifugación, se recuperó el sobrenadante, y se mezcló con el obtenido en la primera centrifugación; el sobrenadante (EC) obtenido se fraccionó en alícuotas de 2 ml y se congeló a  $-70\text{C}$ , en un ultracongelador Revco hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó con el equipo comercial de Bio-rad.

## 2.2 Productos de excreción-Secreción (E-S).

Se obtuvieron cisticercos de *T. solium* de cerdos infestados. Se seleccionaron aquellos que fueron disectados sin cápsula inflamatoria y sin daño en la vesícula; se lavaron con PBS 5 veces, para eliminar los fragmentos de tejidos y fluidos del hospedero. Posteriormente, en una campana de flujo laminar Veeco, se continuó el proceso de lavado, esta vez alternando 5 lavados, de 5 minutos cada uno con PBS estéril, con 5 lavados de PBS estéril-antibióticos (200 U/ml de penicilina G sódica, 300 µg/ml de estreptomycin). En placas de cultivo celular de 24 pozos se colocaron en promedio de 15 a 20 cisticercos por pozo, con medio de cultivo RPMI o DMEM y 100 U/ml de antibióticos sin SFB. Las placas de cultivo se incubaron a 37C durante un periodo de 18 a 20 hrs, al término del cual se recuperaron los sobrenadantes (E-S), se fraccionaron en alícuotas y se congelaron a -70C hasta su uso; el cultivo de cisticercos se continuó hasta los 4 días, cosechando el sobrenadante cada 24 horas. (se realizaron 2 cultivos de cisticercos provenientes de diferentes cerdos). La concentración de proteínas se determinó con el equipo comercial Bio-rad.

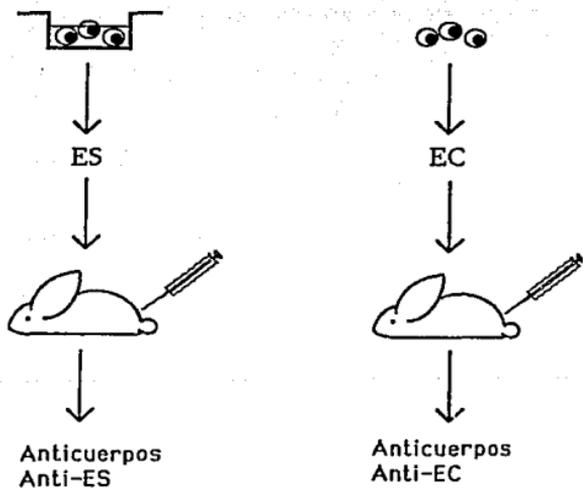
### **3. Anticuerpos**

#### **3.1 Anticuerpos policlonales contra antígenos del extracto crudo (EC).**

Se inmunizaron dos conejos adultos Nueva Zelanda, bajo el siguiente esquema de inmunización: 2 mg de EC mezclado con adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea; a los 7 días se retó con la misma concentración de EC, con adyuvante incompleto, por la misma vía; finalmente se reestimuló con 1 mg de EC por vía intramuscular. Previo a cada inmunización, se sangró al animal, para valorar el título de anticuerpos por ELISA; en el momento en que se obtuvo un título adecuado se sacrificó al animal por punción cardiaca para obtener el suero hiperinmune (figura 6).

#### **3.2 Anticuerpos policlonales contra antígenos de excreción-secreción(E-S).**

Un conejo adulto Nueva Zelanda, fue inmunizado bajo el mismo esquema de inmunización empleado para el EC, con la variante de usar 800 µg de E-S como componente inmunogénico. Previo a cada inmunización, se sangró al animal, para valorar el título de anticuerpos por ELISA; en el momento en que se obtuvo un título adecuado se sacrificó al animal por punción cardiaca para obtener el suero hiperinmune (figura 6).



**Figura 6.** Esquema de inmunización para obtener anticuerpos anti-EC y anti-ES en conejo.

#### 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Esta metodología permite la separación de proteínas con diferente peso molecular y consiste en un sistema discontinuo constituido por dos geles, con diferente concentración de acrilamida. La muestra se concentra después de pasar por el gel superior (gel concentrador) y se separa en el gel inferior (gel separador) obteniéndose una mejor definición de bandas (45). La composición de ambos geles se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Reactivos para preparar geles de poliacrilamida SDS al 11%.

REACTIVO	GEL SEPARADOR (ml)	GEL CONCENTRADOR (ml)
Acrilamida 30%/bis 0.8%	13.35	3.5
Tris/base 2M pH 8.8	7.28	-
Tris/HCl 2M pH 6.8	-	0.65
SDS 10%	0.364	0.1
Persulfato de amonio	10 mg	5 mg
Agua destilada	13.96	11.5
Temed	36 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Una vez preparado el gel separador, se vertió rápidamente entre las placas de vidrio de 16\*20 cm (con separadores de 1.5 mm) de una cámara de electroforesis Protean II (Bio-Rad), evitando la formación de burbujas. Una vez que el gel polimerizó, se preparó el gel concentrador (superior), se vertió rápidamente sobre el gel separador, y se colocó el peine de teflón para 15 carriles, se dejó polimerizar para luego retirar el peine. Se colocaron en los carriles formados, las muestras celulares de los experimentos realizados (previamente congelados).

Montado el dispositivo, la electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente constante de 10 mA por 14 hrs, o bien 35 mA por un periodo de 4 a 5 hrs.

##### 5. Inmunoelectrotransferencia (IET).

Al término de la electroforesis, se armó la cámara de transferencia (Idea Scientific), como se muestra en la figura 7. Los geles se colocan cuidadosamente entre la membrana de nitrocelulosa y el papel filtro. La cámara se llenó con amortiguador de transferencia (tris 0.025M, glicina 0.192M, metanol al 20%) y se dejaron correr 2 hrs a 14 volts y 480 mA (46).

La membrana de nitrocelulosa resultante de la electrotransferencia se tiñó con rojo de ponceau 0.2% (sigma) en ácido tricloroacético 3% para verificar la efectividad de la

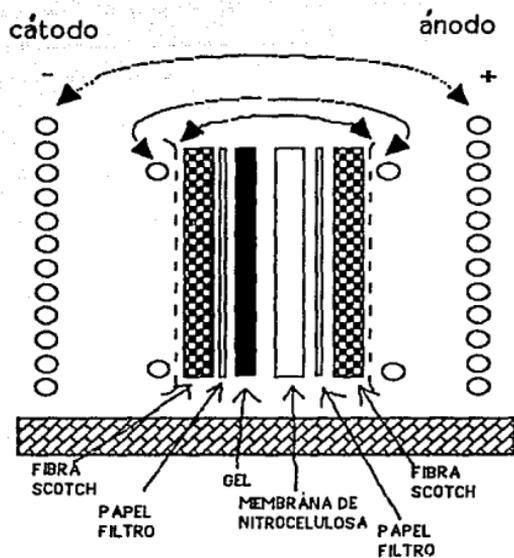


Figura 7. Diagrama de la cámara para transferir proteínas en geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa.

transferencia; se bloqueó con leche descremada al 5% en PBS tween 0.05% a 4C durante 24 hrs; se lavó 3 veces con PBS tween y 2 veces con PBS (10 min cada lavado); se incubó con los anticuerpos policlonales (anti-EC, para experimentos con antígenos somáticos y anti-ES, para los experimentos con antígenos de excreción-secreción), diluidos 1:25 en PBS tween durante 2 hrs a 37C; se repitieron los lavados (3 PBS tween, 2 PBS) y se incubaron durante 2 hrs con proteína A acoplada a peroxidasa (Sigma) diluida 1:500 en PBS tween; se lavó extensivamente (3 PBS tween, 5 PBS); para finalmente revelar la reacción, con el cromógeno 4 cloro-1-naftol (25 mg) disuelto en 5 ml de metanol, 25 ml de PBS y 25 µl de peróxido de hidrógeno (sustrato) al 30% incubado por un periodo de 10 a 15 min. La reacción se paró lavándose con agua al momento de visualizar las bandas.

#### 6. Perfil inmunológico de antígenos somáticos (EC) y excreción-secreción (ES) en inmunolectrotransferencia (IET).

Tanto los antígenos somáticos como los productos de excreción-secreción obtenidos, fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 11%. Se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-EC o anti-ES, y se revelaron con proteína A-peroxidasa y la solución de cromógeno/sustrato, como se describió anteriormente.

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Obtención de células del cultivo celular.

Para la realización de los experimentos de contacto permanente y de pulso y seguimiento, se utilizó aproximadamente una caja de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> por experimento. Se extrajeron las células (CPAs), se centrifugaron a 1200 rpm en una centrifuga Beckman J-6B durante 10 minutos a temperatura ambiente, se recuperó el botón celular al término de la centrifugación y se resuspendió en 5 ml de medio DMEM sin SFB; la viabilidad celular se cuantificó por exclusión al azul tripano y el número celular en una cámara de Neu-Bauer (Propper M.F.G.).

### Experimentos preliminares para estandarizar la concentración de antígeno.

Se realizaron experimentos dosis/respuesta para estandarizar la concentración que se empleó tanto en los experimentos de contacto permanente, como en los de pulso y seguimiento. Se colocaron  $5 \times 10^5$  células por tubo, con distintas concentraciones de extracto (100, 200, 300 y 500 µg/ml) para cada tiempo probado (tiempos cortos de 2 y 15 min), incubándose a 37C; se colocó como control del sistema, un tubo con antígeno y medio para corroborar

que el antígeno no se pega inespecíficamente al tubo (procesado con la misma metodología empleada para los tubos experimentales).

Finalizados los tiempos de incubación, los tubos se mantuvieron a 4C. Posteriormente se lavó el antígeno no tomado por los macrófagos, por centrifugación a 1200 rpm, 10 minutos a 4C, se repitió el procedimiento 4 veces con cambio de tubo y medio, al término de los cuales el botón celular fue colocado en mezcla de muestra para electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS 0.1%, EDTA 2mM, glicerol al 10%, Tris-HCl 0.05 M, azul de bromofenol y 2-mercaptoetanol 4mM), se hirvieron durante 5 min y se congelaron a -70C en un ultracongelador (Revco), hasta su posterior análisis.

**Experimentos de contacto permanente con antígenos somáticos (EC) y con antígenos de excreción-secreción (ES).**

Se colocaron  $5 \times 10^5$  células en tubos de ensayo cónicos de 10 ml, con los antígenos EC, o con los antígenos ES, el sistema se llevó a un volumen final de un mililitro, se incubaron a 37C durante diferentes tiempos (2, 15, 30, 45, 60 minutos)(figura 8).

Finalizados los tiempos de incubación los tubos se mantuvieron a 4C para disminuir la actividad metabólica, inhibiendo de esta manera la endocitosis. Posteriormente se lavó el antígeno no tomado por los macrófagos por centrifugación a 1200 rpm, 10 min a 4C, se repitió este procedimiento 4 veces con cambio de medio frío y de tubo. Al término de los lavados el sobrenadante fue decantado, y se

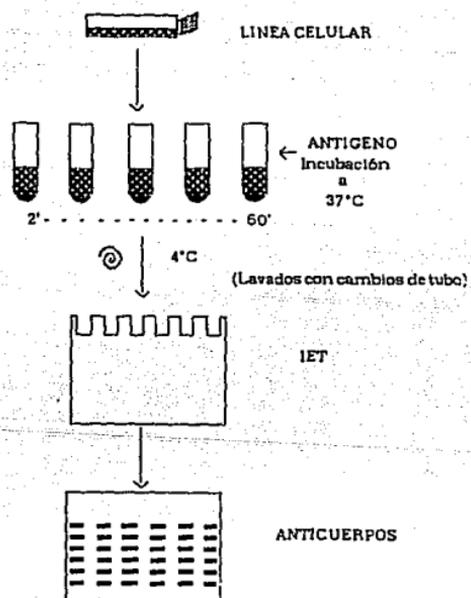
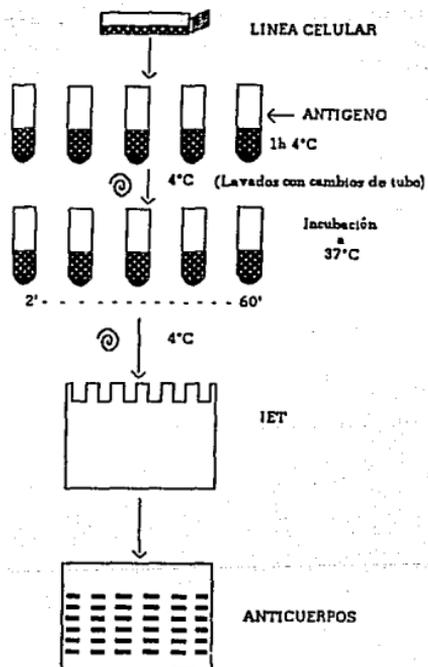


Figura 8. Diseño de los experimentos de contacto permanente.

agregó al botón celular resultante, mezcla de muestra para electroforesis en geles de poliacrilamida. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos en baño María, al término de lo cual, se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , en un ultracongelador (Revco), hasta su análisis.

#### **Experimentos de pulso y seguimiento con antígenos somáticos (EC) y con antígenos de excreción-secreción (ES).**

El sistema diseñado para los experimentos de pulso y seguimiento (figura 9), consistió en colocar  $5 \cdot 10^5$  células en tubos de ensayo cónicos de 10 ml, dándoles un pulso de antígeno (EC o ES) de una hora, incubados a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el pulso, se lavó el antígeno no asociado a los macrófagos por centrifugación a 1200 rpm, 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , en una centrífuga Bekman J-6B, este procedimiento fue realizado 4 veces con cambio de medio y tubo (todo a temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ ). Al término de los lavados al botón celular se le colocó 1 ml de medio y se incubaron los tiempos correspondientes (2, 15, 30, 45, 60 min) a  $37^{\circ}\text{C}$ , con intervalos de agitación de 10 minutos. Concluidos los tiempos de incubación, se centrifugó nuevamente 10 min a 1200 rpm, a  $4^{\circ}\text{C}$ , agregando al botón celular resultante, mezcla de muestra para electroforesis en geles de poliacrilamida; se hirvieron 5 min en baño María y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador Revco hasta su análisis.



**Figura 9. Diseño de los experimentos de pulso y seguimiento.**

## **Análisis de los experimentos de contacto permanente y de pulso y seguimiento.**

Las muestras celulares de los distintos experimentos de contacto permanente y de pulso y seguimiento, tanto de antígenos somáticos (EC) como de excreción-secreción (ES), fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 11%. Transferidos a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con los anticuerpos policlonales anti-EC o anti-ES, y finalmente se revelaron con proteína A-peroxidasa y la solución de sustrato/cromógeno según la metodología descrita anteriormente.

## **Ensayos de viabilidad celular con los productos de excreción-secreción.**

Se realizaron ensayos de viabilidad celular con diferentes concentraciones de los productos de excreción-secreción (0, 10, 100, 200, 300, 500  $\mu$ g) cosechados de dos días distintos del segundo cultivo, con una concentración inicial de 686  $\mu$ g/ml y de 1300  $\mu$ g/ml. Se colocaron  $5 \cdot 10^5$  células en tubos de ensayo cónicos de 10 ml, con los antígenos ES, se llevó el sistema a un volumen final de un mililitro con medio DMEM, y se incubaron a 37C durante 15 y 45 minutos, al término de la incubación se cuantificó la viabilidad celular en un microscopio óptico (Zeiss) por exclusión al azul tripiano (Gibco), se cuantificó por duplicado el número celular en

una cámara de Neu-Bauer (Propper, M.F.G.).

Paralelamente a la cuantificación celular se centrifugaron los tubos a 1200 rpm en una centrifuga Bekman J.6B y se recuperó el botón celular, se realizaron 4 lavados con cambios de medio y tubo, por centrifugación a 1200 rpm después de cada lavado, finalmente se le agregó al botón resultante mezcla de muestra para electroforesis y se procesaron por inmunoelectrotransferencia, según metodología descrita anteriormente.

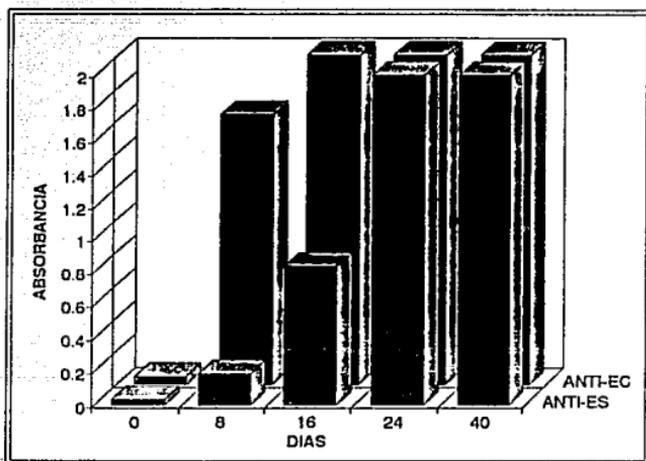
## VI. RESULTADOS

La producción de anticuerpos en la respuesta a la inmunización con antígenos somáticos (EC) y productos de excreción-secreción (ES), se muestra en la figura 10. Como se observa, el esquema de inmunización empleado funcionó adecuadamente ya que una semana después de la inmunización intramuscular se obtuvieron anticuerpos que dieron absorbancia mayor de 2 para ambos antígenos.

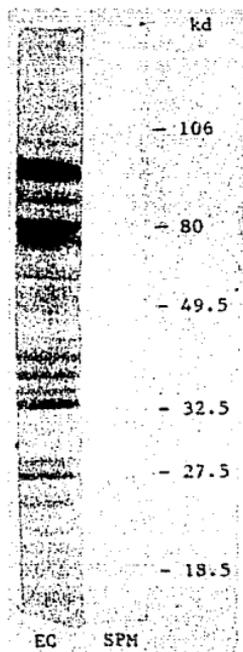
El patrón inmunogénico obtenido del EC de *T. solium* en IET está constituido por 40 a 45 bandas en un rango de pesos moleculares de 25 -115 Kd. (figura 11).

Una vez conocido el mosaico antigénico del EC en IET, se procedió a realizar los experimentos preliminares (ensayos dosis/respuesta) a tiempos cortos (45 min), para conocer la cantidad de antígeno necesaria que nos permitiera detectar la unión de antígenos por los macrófagos (APCs) con el sistema utilizado. Se obtuvo una mejor señal a partir de 300 µg/ml de EC, como se puede observar en la figura 12, donde a concentraciones menores, la definición y el número de bandas antigénicas que el sistema reconoce fue menor.

La unión de los antígenos por parte de los macrófagos y por tanto la especificidad de detección y funcionamiento del sistema, se corroboró por el hecho de que en los antígenos trabajados con la



**Figura 10. Título de anticuerpos contra antígenos somáticos (Anti-EC) y contra productos de excreción-secreción (Anti-ES) por ELISA ; Dilución del suero hiperinmune 1:1000; conjugado: Anti-conejo peroxidasa, 1:500.**



**Figura 11. Patrón inmunogénico del extracto crudo de *Taenia solium* por IET.**

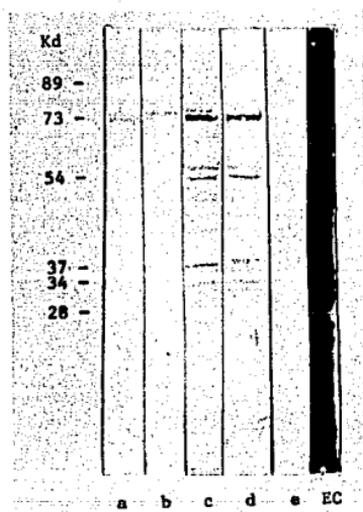


Figura 12. Ensayo dosis-respuesta, con distintas concentraciones de extracto crudo (EC), con un tiempo de contacto de 45 min. (a) 10; (b) 100 µg; (c) 200 µg; (d) 300 µg; (e) control.

misma metodología pero en ausencia de macrófagos no se observó ninguna señal por IET. (figura 12,e).

Los ensayos de contacto permanente con extracto crudo a 37C (figura 13) mostraron que los macrófagos "seleccionan" 13 bandas antigénicas de un mosaico de 40 a 45 : un grupo de bajo peso molecular de entre 27 a 38 Kd; un duplete de aproximadamente 54 Kd y un grupo de peso molecular alto de 73 a 90 Kd. El tiempo de unión<sup>1</sup> fue de 15 a 30 minutos. A tiempos menores y desde los tiempos iniciales, los macrófagos toman preferentemente la banda antigénica correspondiente a 73 Kd, comenzando a tomar algunas otras bandas de los grupos antes mencionados, en el testigo (MOS sin antígeno) no se observó ninguna señal.

El estudio de la unión de antígenos por parte de los macrófagos a 4C, temperatura a la cual se inhibe la fagocitosis (revelándose únicamente lo que el macrófago logra captar en forma pasiva), mostró un patrón de selección antigénica semejante donde la mayor parte de los antígenos se unieron a un tiempo de 30 minutos; sin embargo, cabe señalar que la unión a tiempos menores de 60 minutos fue menor que en los ensayos a 37C, quizá por cambio en la afinidad de los receptores de membrana del macrófago. De igual manera, desde los tiempos iniciales se observó que el macrófago tiene una gran afinidad por la banda de 73 Kd (figura 14).

<sup>1</sup> Tiempo que requieren los macrófagos (APCs) para seleccionar los antígenos.

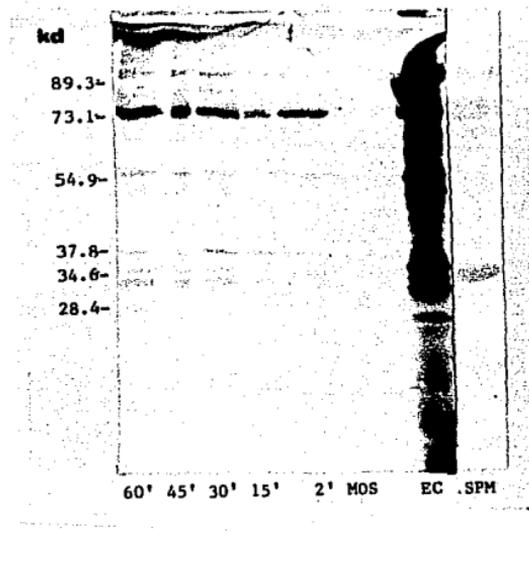


Figura 13. Ensayo de contacto permanente con extracto crudo a distintos tiempos (en minutos).

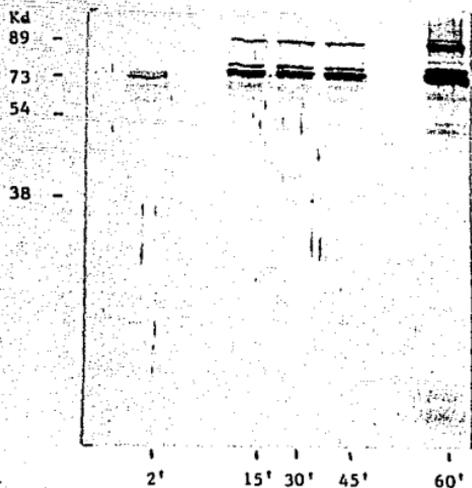


Figura 14. Ensayo de contacto permanente con extracto (EC) a 4C. a distintos tiempos (en minutos).

Al analizar el procesamiento de los antígenos a través de los ensayos de pulso y seguimiento (figura 15), se puede observar que los antígenos seleccionados en los ensayos de contacto permanente, que corresponden al menor tiempo de los ensayos de pulso y seguimiento (T=2 min, figura 15), empiezan a ser procesados a los 15 minutos, para ser procesados casi en su totalidad a los 30 minutos. Se procesaron tanto el grupo de antígenos de bajo peso molecular, como el duplete de 54 Kd y el grupo de peso molecular alto, exceptuando la banda correspondiente a los 73 Kd, de la que no se observó el menor indicio de procesamiento.

Cabe señalarse que en este tipo de experimentos no se lograron detectar bandas correspondientes a pesos moleculares bajos, que evidenciaron la presencia de los péptidos generados en el procesamiento efectuado por las CPAs.

Los antígenos de excreción-secreción presentaron un patrón de bandeo por IET, de aproximadamente 16 bandas inmunogénicas de entre 20 a 86 Kd, siendo 4 de ellas (85,59,43 y 28 Kd) las más inmunoreactivas (figura 16,b).

En los ensayos de contacto permanente a 37C realizados con los productos de excreción-secreción obtenidos del primer cultivo, con una concentración inicial de 406 µg/ml, se observó una "selección" de 12 bandas efectuada por los macrófagos, desde los tiempos más cortos (T=2 min); excepto un triplete de entre 36 y 43 Kd que lo

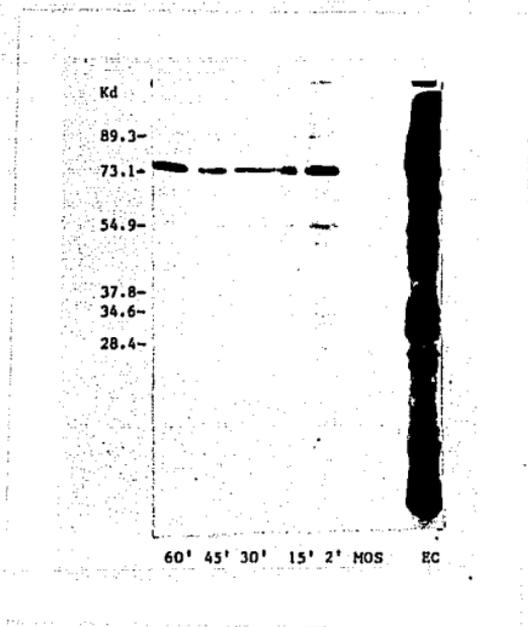


Figura 15. Ensayo de pulso (60 min) y seguimiento con extracto crudo (EC) del cisticerco a distintos tiempos (en minutos).

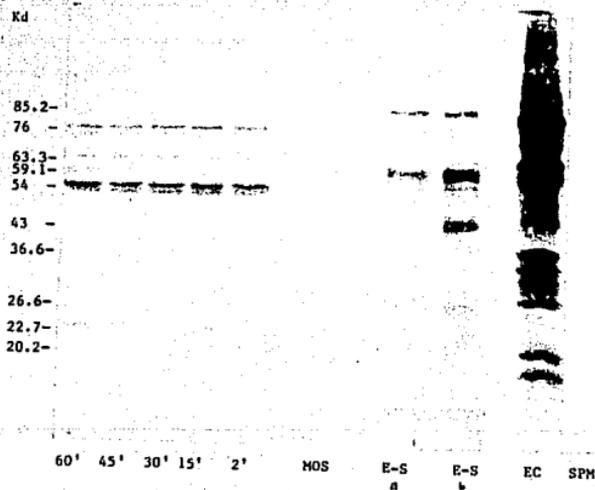


Figura 16. Ensayo de contacto permanente con antígenos de excreción-secreción (ES) obtenidos del primer cultivo de cisticercos a distintos tiempos (en minutos). (a) antígeno liofilizado; (b) antígeno congelado.

empiezan a seleccionar muy ligeramente hasta los 30 minutos de incubación (figura 16). Como se puede observar existen dos grupos de bandas que unen con especial avidez; un duplete correspondiente a los 54 Kd, y un grupo de 63 a 85 Kd.

Cabe hacer notar que los antígenos seleccionados por los macrófagos no corresponden de manera general a los antígenos determinados como inmunodominantes en el mosaico antigénico de los antígenos de E-S por IET.

Por su parte los ensayos de pulso y seguimiento de antígenos de excreción-secreción, no revelaron diferencias tan evidentes en cuanto al procesamiento de antígenos con respecto al tiempo, como ocurrió con el extracto crudo (figura 17); esto es, la desaparición (el procesamiento) de las bandas antigénicas con el transcurso del tiempo fue menor, fueron procesadas solamente: el duplete de 54 Kd, un par de bandas de 59 y 43 Kd que son seleccionados pobremente y el par de bandas de peso molecular bajo correspondientes a 20 y 22 Kd. Por otro lado, no hubo procesamiento aparente del grupo de antígenos de peso molecular alto (78 a 83 Kd).

Con la finalidad de definir mejor las bandas de peso molecular bajo y de detectar los péptidos generados, los experimentos de pulso y seguimiento se probaron en geles de acrilamida al 15% (figura 18), se detectó una banda adicional característica de entre 16 y 18 Kd que no corresponde a las seleccionadas por los macrófagos en los ensayos de contacto permanente.

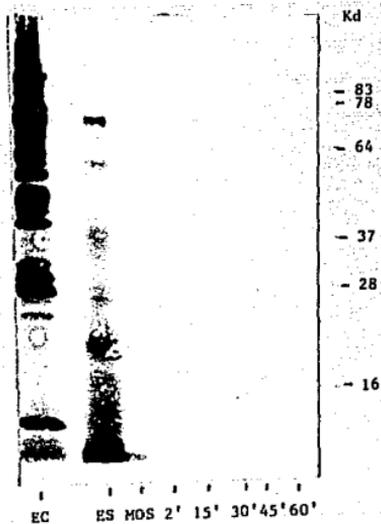


Figura 17. Ensayo de pulso (60 min) y seguimiento con antígenos de excreción-secreción obtenidos del primer cultivo de cisticercos. (SDS-page al 11%).

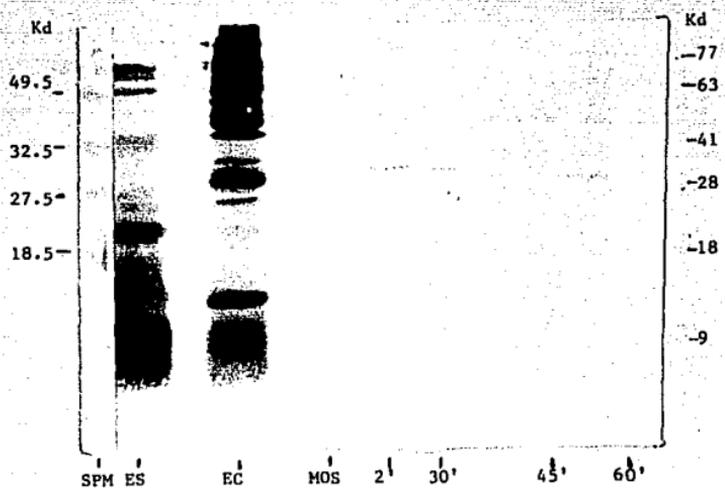


Figura 18. Ensayo de pulso (60 min) y seguimiento con antígenos de excreción-secreción obtenidos del primer cultivo de cisticercos en SDS-page al 15%.

Sin embargo, en ensayos posteriores realizados con productos de excreción-secreción de un segundo cultivo, obtenidos con una concentración inicial de 1300  $\mu\text{g/ml}$ , los macrófagos no unen ninguno de los antígenos observados en el patrón inmunogénico, excepto un grupo de bandas menor a 10 Kd y muy tenuemente una banda de 85 Kd (figura 19). Cabe hacer notar que este tipo de respuesta fue encontrada en todos los experimentos realizados con antígenos del segundo cultivo.

Por otra parte, en los experimentos de pulso y seguimiento (figura 20) con antígenos de excreción-secreción no se observó ni la banda de 85 kd, ni el grupo de menos de 10 kd que se observó en los experimentos de contacto permanente.

Con la finalidad de determinar el motivo por el cual los macrófagos no lograban unir los antígenos, se realizaron los experimentos de viabilidad celular.

Como se puede observar en la figura 21, usando productos de excreción-secreción con una concentración inicial de 686  $\mu\text{g/ml}$ , la viabilidad celular decrece en función del aumento en la concentración del antígeno, pasando de un 82% en el lote testigo, a un 65% a los 15 minutos y a un 42% a los 45 minutos con una concentración de 500  $\mu\text{g/ml}$ , esto es, un 40% de mortalidad, que en número celular significa un decremento de  $2 \cdot 10^5$  células por cada  $5 \cdot 10^5$  que se utilizan para cada tiempo y concentración probados.

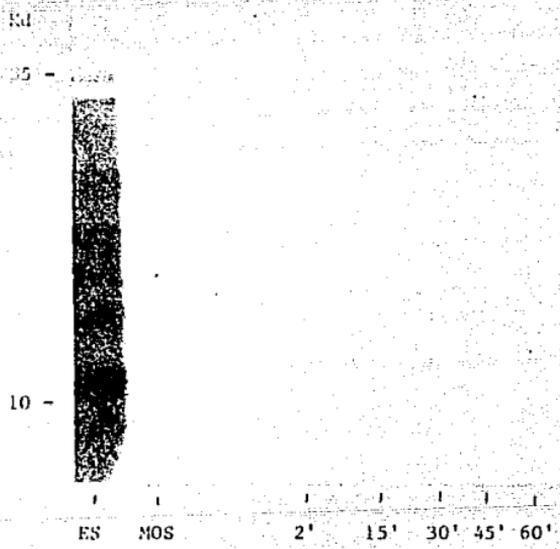


Figura 19. Ensayo de contacto permanente con productos de excreción-secreción (ES) obtenidos del segundo cultivo de cisticercos.

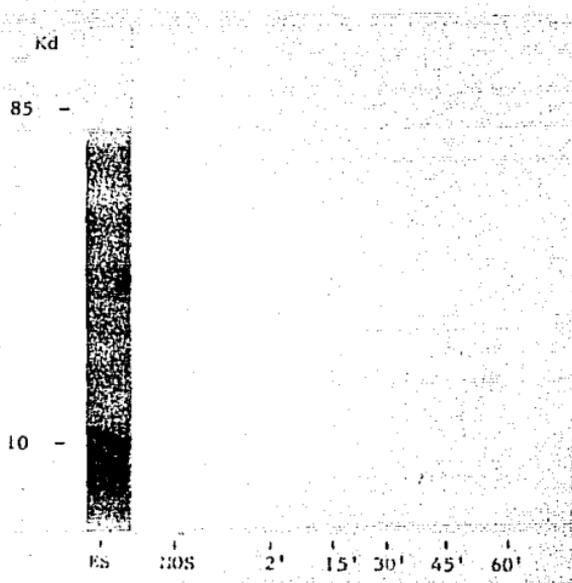


Figura 20. Ensayo de pulso y seguimiento con productos de excreción-secreción (ES) obtenidos del segundo cultivo de cisticercos.

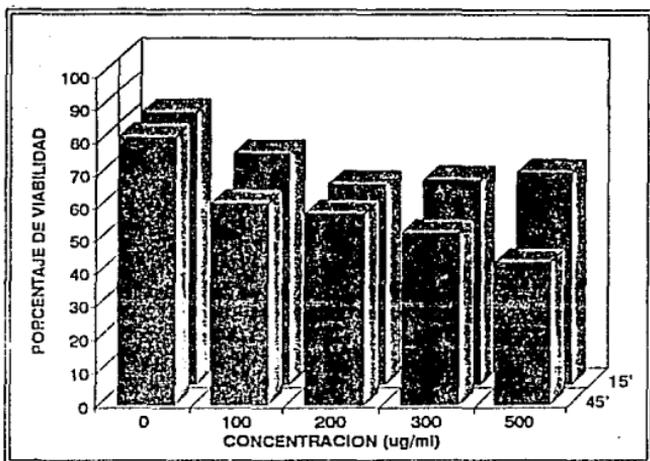
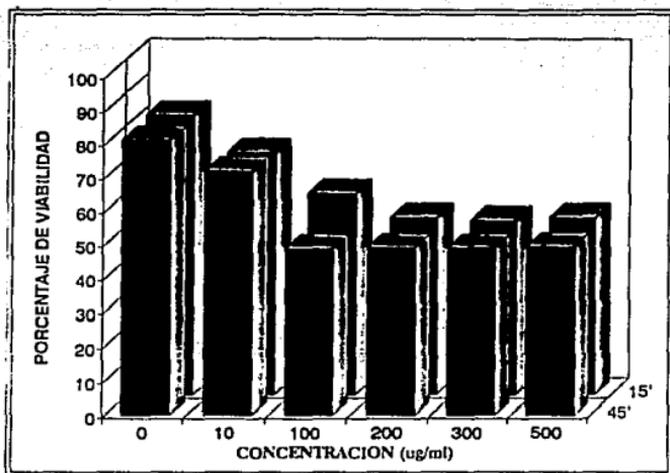


Figura 21. Efecto de la incubación durante 15 y 45 min con los productos de excreción-secreción sobre la viabilidad de los macrófagos (concentración inicial de antígeno:  $686\mu\text{g/ml}$ ).

En la figura 22 cuando se probaron productos de excreción-secreción con concentración inicial de 1300  $\mu\text{g/ml}$ , se observó que el decremento se da desde los 100  $\mu\text{g/ml}$ , decreciendo la viabilidad celular en un 45% a los 45 minutos, manteniéndose en este porcentaje a concentraciones mayores e incluso desde los 15 minutos. La morfología de las células que quedaron vivas en todos los ensayos experimentales, fue muy irregular, dando la apariencia de daño celular; en comparación con las células del lote testigo que tenían apariencia y morfología definidas, esto es, refringentes y sin daño aparente en la membrana. Cabe señalar que por el contrario, en algunos experimentos preliminares con extractos somáticos, la viabilidad celular se mantuvo igual o ligeramente más alta que los testigos (macrófagos sin antígeno).

Al analizar las muestras celulares de los ensayos dosis-respuesta con antígenos de excreción-secreción (en los que se cuantificó, la viabilidad celular) por inmunoelectrotransferencia, se observó esencialmente el mismo patrón de reconocimiento que en los experimentos de contacto permanente (con 300  $\mu\text{g/ml}$ ), esto es, una banda de alto peso molecular de 85 kd y un grupo de peso molecular bajo de 10 a 15 kd; sin embargo cabe hacer notar que a concentraciones menores (100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ) se observó un par de bandas adicional de entre 25 y 30 kd, que a concentraciones mayores (300 y 500  $\mu\text{g/ml}$ ) prácticamente no se detectaron (figura 23).



**Figura 22. a) Efecto de la incubación durante 15 y 45 min con los productos de excreción-secreción sobre la viabilidad de los macrófagos (concentración inicial de antígeno: 1.3 mg).**

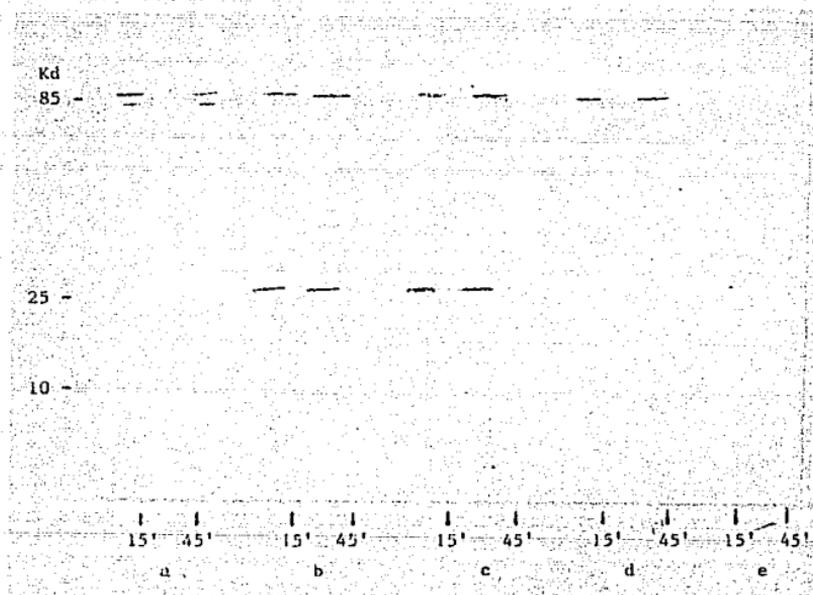


Figura 23. Ensayo Dosis-respuesta, con distintas concentraciones de productos de excreción-secretión (ES). (a) 10 µg/ml; (b) 100 µg/ml; (c) 200 µg/ml; (d) 300 µg/ml; (e) 500 µg/ml.

## VII. DISCUSION

Una de las áreas menos comprendidas y estudiadas dentro de la relación huésped/parásito ha sido la respuesta inmune celular; el papel que ésta desempeña en la eliminación de los patógenos, el modo como ciertos parásitos la evaden, así como qué componentes del parásito la estimulan.

Actualmente se ha realizado investigación referente a estos tópicos, especialmente en virus, bacterias y parásitos intracelulares (47-52), tomando especial relevancia el estudio del procesamiento y presentación antigénica, ya que constituye la fase inicial de la respuesta celular.

Son tres los requerimientos esenciales postulados por Unanue para una óptima presentación de antígenos (53):

- a) Expresar proteínas clase II del Complejo Principal de Histocompatibilidad en la superficie celular.
- b) Procesar antígenos.
- c) Sintetizar y liberar interleucina 1 (IL-1).

El presente trabajo tuvo como propósito principal analizar el procesamiento de los antígenos somáticos y de excreción-secreción del cisticerco de *T. solium* efectuado por las células presentadoras. La línea celular J774.1 (sarcoma de células reticulares) utilizada como célula presentadora de antígenos (CPA) fue seleccionada por expresar un alto nivel de moléculas MHC II en su superficie y porque produce constitutivamente IL-1, con lo que se cumple con dos de los requisitos propuestos por Unanue.

En los experimentos de contacto permanente (figura 13), la selección de 13 bandas antigénicas de un total de 45 a 50 bandas que posee el EC (antígenos somáticos) por IET, demostró la capacidad de selección de antígenos por parte del macrófago. Este hecho podría indicar que incluso desde el proceso de unión de los antígenos, la célula presentadora de antígenos (CPA), juega un papel regulatorio en la respuesta inmune celular que puede montarse.

La unión de los antígenos por la CPA puede ocurrir por receptores sensibles a tripsina (39), por receptores Fc/C3, o por vía no específica, en el último caso, la unión está directamente relacionada con la concentración del antígeno, siendo un proceso no saturable (54). Como se puede observar en la figura 13, la banda de 73 Kd, probablemente esté siendo unida por un mecanismo inespecífico, ya que los macrófagos la unen desde los tiempos iniciales, no observándose un proceso paulatino de saturación (como

ocurre con las otras bandas).(figura 12).

El resto del patrón antigénico seleccionado, esto es, el grupo de peso molecular bajo y el duplete de 54 Kd son tomados bajo un proceso saturable de los 15 a los 30 minutos, posiblemente siendo unidos vía receptores de superficie.

El tiempo de unión requerido por los macrófagos (15 a 30 min) es similar al encontrado por otros autores. Por ejemplo el grupo de Unanue reporta un tiempo de unión de 10 a 15 minutos con *Listeria monocytogenes* (55). Este fenómeno depende tanto de las características fisicoquímicas del antígeno, como del tipo de célula accesoria de que se trate; sin embargo, diversos estudios realizados con antígenos puros como ovalbumina (OVA), hemocianina de cazuela de mar (KLH), insulina, IgG de conejo antirátón (RAMIG) y  $\beta_2$  macroglobulina, han demostrado que el tiempo de unión, tanto de macrófagos como de linfocitos B, no excede a los 45 minutos (56).

Existen varios estudios que han mostrado, que después de la unión, el antígeno tiene que ser endocitado (57) y después procesado en un compartimiento ácido, antes de que ocurra la re-expresión Ag-MHC II en la superficie; demostrando además que existe una correlación directa entre la generación de péptidos antigénicos ácido solubles por las CPAs y su capacidad para estimular a las células T (58).

También se ha sugerido que la desnaturalización o fragmentación es necesaria para producir moléculas con un aumento en su lipofilicidad para estabilizar su interacción con la membrana plasmática, así como para incrementar la concentración de antígeno local en el ambiente de las moléculas MHCII (59).

Varios autores han demostrado que el denominado periodo lag (tiempo necesario para que se dé un reconocimiento por células T) refleja precisamente el tiempo que toma la CPA en unir, endocitar y procesar a los antígenos (54).

El procesamiento antigénico definido por Kirk Ziegler (60) como un evento cinética y metabólicamente distinto de la unión antigénica, fue analizado en los experimentos de pulso y seguimiento, en donde se encontró que el tiempo de procesamiento con EC fue de 30 minutos.

Es interesante observar que la banda correspondiente a 73 Kd que los macrófagos toman o unen desde los tiempos más cortos, la cual aparentemente es endocitada por un mecanismo inespecífico dependiente de la concentración, no presentó el menor signo de procesamiento, por lo que puede ser resistente a éste; secuestrada en un compartimiento celular inaccesible a la degradación; o que esté siendo atrapada por algún receptor que no medie su internalización hacia compartimientos donde ocurra degradación,

sino que esté siendo continuamente reciclada hacia la membrana plasmática como en el caso del receptor para fibronectina (61).

Con los demás grupos de antígenos tomados por los macrófagos (figuras 13,15) se observó una degradación paulatina, que aumentaba con el tiempo de incubación, para ser degradados casi en su totalidad a los 30 minutos; de manera similar Davidson y Watts observaron que el procesamiento de su antígeno (toxide tetánico) era tiempo y temperatura dependiente, detectando el procesamiento realizado a los 45 minutos (se usaron linfocitos B como CPAs).

Los datos de cinética del procesamiento antigénico realizados por otros grupos (54,57,59) convergen en señalar que la serie de eventos metabólicos (periodo lag), requieren de aproximadamente una hora para completarse, hecho que puede observarse en la figura 15, donde después de 1 hora de incubación fueron procesadas todas las bandas excepto la de 73 Kd.

El procesamiento hace a los determinantes antigénicos accesibles para una apropiada interacción con la molécula MHC II y el receptor de la célula T. A este respecto varios grupos (53,54,56) han señalado con base en sus estudios con proteínas puras y a la interacción péptido-MHC (62,53), que los péptidos fundamentales (determinantes antigénicos) para la estimulación T, son pequeños (8 a 20 aminoácidos); algunos otros estudios señalan que el tamaño del péptido puede ser mayor e incluso pueden ser

presentados péptidos que no sean procesados (63); sin embargo, la mayoría de las evidencias apuntan hacia los péptidos pequeños.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, el hecho de que en los experimentos de pulso y seguimiento no se detecte la generación de péptidos de menor peso molecular de los antígenos procesados (figura 15); puede deberse a:

a) Que el tamaño de los fragmentos generados en el procesamiento sean tan pequeños que no los pudimos resolver en un gel convencional de acrilamida SDS. Este hecho lo apoyan los trabajos de Chain (64) en donde usando tanto células denticílicas como macrófagos pulsadas una hora a 4C con KLH marcada con  $^{125}\text{I}$  e incubados a 37C, al monitorear su degradación detectaron que una porción importante del antígeno (soluble en TCA), había sido degradada en tamaños menores a 5-10 aminoácidos, que al quererlos resolver por autoradiografía en geles de acrilamida SDS no pudieron ser visibles.

En otro estudio (56) donde utilizaron también una proteína pura de alto peso molecular (proinsulina), los fragmentos generados en el procesamiento pudieron ser resueltos en geles de acrilamida, sin embargo cuando utilizaron un extracto con una gran heterogeneidad en los pesos moleculares, la resolución en SDS fue ineficiente.

b) Pérdida de epítomos, esto es, si los péptidos generados fueran de tamaño suficiente para ser observados en nuestro sistema, la posible explicación para la falta de reconocimiento, es que en el proceso catabólico, los epítomos que los anticuerpos reconocen, se estén perdiendo.

Davidson y Watts (57), al utilizar como antígeno la proteína toxoide tetánica, marcada con  $^{125}\text{I}$ , realizaron experimentos de pulso y seguimiento (con la misma metodología empleada en este trabajo), logrando detectar a los 45 minutos, péptidos producto del procesamiento, de alrededor de 14 Kd, la diferencia es que en su sistema de detección, no emplean anticuerpos, sino la marca radiactiva, además de un gel de alta resolución, esto es, un gradiente discontinuo que separa los péptidos de alto peso molecular de los de menor peso y que da una óptima separación y definición en los rangos de 2 a 50 Kd.

Estos resultados podrían apoyar si es que se están generando péptidos mayores a 5 kd (que pueden ser detectados en nuestra sistema), la falta de detección de los péptidos procesados por pérdida de los epítomos que los anticuerpos reconocen.

Cabe señalar, sin embargo, que la desaparición paulatina de péptidos así como el tiempo lag concuerdan de manera general con lo obtenido por los autores citados, ya que en su sistema también se observa una desaparición paulatina de proteínas en el tiempo, con

la detección de un periodo lag de 45 minutos.

Los resultados de procesamiento, es decir, la identificación de los péptidos que son tomados y procesados, no necesariamente significa que sean productos que se asocien directamente al MHC II de las mismas células, ya que existen algunas evidencias de que los macrófagos pueden procesar antígenos y liberar un pequeño porcentaje al medio extracelular, pudiendo ser tomados por otras CPAs (i.e células dentríticas) con limitada o ausente capacidad fagocítica, pero buenas presentadoras tanto por los altos niveles de moléculas MHCII que expresen como por su disposición tisular, siendo posiblemente más importantes en ciertas situaciones *in vivo* que los macrófagos (54).

Por otro lado, el efectuar el análisis del procesamiento de los productos de excreción-secreción nos pareció de suma importancia, ya que reflejaría de mejor manera el papel que las CPAs y por ende la respuesta inmune celular desempeñan en la infección natural, así como los componentes que en condiciones naturales la estimulan.

Los análisis realizados en este trabajo con los productos de excreción-secreción del primer cultivo nos comenzaron a dar indicios de que existían algunos péptidos de los productos de ES que podrían ser importantes ya que los macrófagos seleccionaban y concentraban preferencialmente antígenos que no correspondían a los

más inmunoreactivos en el patrón antigénico (figuras 16,17,18).

Sin embargo los análisis realizados con los productos del segundo cultivo, en un inicio fueron desconcertantes ya que contrariamente a lo que se esperaba, se observó en la figura 19, que los macrófagos no unieron antígenos excepto la banda de peso molecular alto de 85 kd y el grupo de peso molecular bajo. Sin embargo, como se puede observar en los ensayos de viabilidad (figuras 21,22), existe un efecto citotóxico de los productos de excreción-secreción sobre los macrófagos, que explica la ausencia de señal en los ensayos de unión y procesamiento antigénico, debido a que cerca del 45% de las células utilizadas para cada tiempo experimental mueren a la concentración empleada (300  $\mu\text{g/ml}$ ), incluso desde los tiempos más cortos, quedando solamente de 2 a  $3 \cdot 10^5$  células vivas que aunque no se tiñen con azul tripano (que indica muerte celular) su morfología dió la apariencia de daño.

Al analizar las muestras celulares de los ensayos de viabilidad (dosis/respuesta) por inmunolectro-transferencia (figura 23), se observó el mismo patrón de unión de antígenos que en los experimentos de contacto permanente realizados con 300  $\mu\text{g}$ , observándose una banda adicional de entre 25 y 30 kd a concentraciones menores (100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ) lo cual correlaciona con el hecho de que a esas concentraciones el porcentaje de mortalidad celular (a los 15 minutos) fue ligeramente menor al observado con las concentraciones más altas; a concentraciones menores (10  $\mu\text{g}$ ) en

donde no se observó una mortalidad tan alta, no se detectó una señal adecuada de los antígenos que los macrófagos unen, debido a que es insuficiente la cantidad de antígeno para ser detectada por el sistema.

La presencia de un factor citotóxico en los productos ES del segundo cultivo de cisticercos y no en los productos del primer cultivo podría deberse a las condiciones de cultivo *in vitro* ya que en el primero se empleó RPMI 1640 que contiene L-glutamina y HEPES, mientras que en el segundo se empleó D-MEM que contiene además de L-glutamina y HEPES, piruvato de sodio y D L-glucosa, que constituye un medio energéticamente más rico, que semeja mejor las condiciones naturales, en las cuales el cisticerco podría estar utilizando el lactato que se produce en la actividad muscular del huésped e incorporarlo a ciclo de Krebs vía piruvato, por lo que los cisticercos cultivados en medio D-MEM, podrían desarrollar un metabolismo más activo y de esta manera secretar factores que en un medio mínimo esencial como el RPMI 1640 no se encuentran.

La existencia de un factor que al parecer está dañando a los macrófagos, es un fenómeno de suma importancia desde un doble punto de vista:

- 1) Matando a uno de los componentes del huésped más importantes que los parásitos deben evadir, debido a que los macrófagos, son junto con los eosinófilos, los tipos celulares que

predominan en la reacción que lo destruye, cuando por tiempo o por tratamiento se rompe el equilibrio de la relación huésped parásito (65).

2) Modulando negativamente la respuesta inmune celular a nivel de la presentación antigénica por daño y muerte de las CPAs disminuyendo proporcionalmente la capacidad de poder aumentar o regular la respuesta celular y por ende la humoral, que capacite al organismo para destruirlo.

Los resultados del presente estudio constituyeron la primera fase (unión y procesamiento de antígenos por las CPAs) del estudio de la respuesta inmune celular en la cisticercosis.

Los péptidos de los antígenos somáticos (EC) que los macrófagos seleccionaron y procesaron serán evaluados y seleccionados por su capacidad de estimular clonas de linfocitos T (que actualmente se están produciendo en el laboratorio). Pudiendo ser este conocimiento en un futuro cercano muy importante en la valoración del efecto del parásito sobre el estado inmunológico del hospedero, así como para el desarrollo de posibles vacunas o estímulos inmunoproliféricos.

Por otro lado resulta muy interesante el hecho de que los cisticercos estén produciendo un factor "macrófago-tóxico", ya que desde el punto de vista de la interacción del macrófago con el

sistema inmune, parecería una estrategia muy importante para modular negativamente la respuesta inmune celular.

A este respecto los resultados encontrados comienzan a dar los primeros indicios de dicho factor, que tendrán que ser investigados en detalle, previa estandarización de las condiciones de cultivo que más se adecuen a las condiciones naturales; esto es, determinar si se trata de un factor citotóxico general (un estudio previo realizado en el laboratorio indica que en los productos ES existe un factor eosinotóxico que resultó ser lábil ya que sólo se presentó con ES frescos)(66), o específico de macrófagos; así como identificar el tipo de molécula de que se trata y su participación en la relación huésped-parásito.

### VIII. CONCLUSIONES.

- Los macrófagos (CPAs) seleccionan 13 bandas antigénicas de un mosaico de 40 a 45 que presentan los antígenos somáticos (EC) del cisticerco de *Taenia solium*.
- Los macrófagos tardan de 15 a 30 minutos en unir a los antígenos (EC).
- De la selección efectuada de antígenos EC procesan un grupo de antígenos de bajo peso molecular (27-38 kd); un duplete de aproximadamente 54 kd y un grupo de peso molecular alto (74-90 kd).
- La banda de 73 kd del EC no presenta el menor indicio de procesamiento.
- El macrófago requiere de 30 minutos para procesar los antígenos (EC) seleccionados.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Los macrófagos no logran unir antígenos de los productos de excreción- secreción debido a la presencia de un factor citotóxico que los mata desde los tiempos más cortos.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Schenone, H., Villarroel, F., Rojas, A. y Ramírez, R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. En: A, Flisser, K. Willms, J.P, Lacllette, C, Larralde, C, Ridaura, F, Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 25-38.
- 2.- Sarti, E., Schantz, P.M., Lara-Aguilera, R., Gómez-Dandoy, H. y Flisser, A. (1988). *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Mexican village. *Trop. Med. Parasitol.* 39:194-198.
- 3.- Cox, F.E.G. (1982). Modern Parasitology. Blackwell Scientific Publications, Oxford 159 pp.
- 4.- FAO/UNDP/WHO: Guidelines for Surveillance Prevention and Control of Taeniasis-Cysticercosis. Document UPH/83.49 World Health Organization, Geneva, Switzerland 1984, 207 pp.
- 5.- Schmidt, G.D. y L.S. Roberts. (1977). Foundations of Parasitology. The C.V. Mosby Company. St. Louis Missouri. 604 pp.
- 6.- Lacllette, J.P., Merchant, M. y Willms, K. (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: A, Flisser, K. Willms, J.P, Lacllette, C, Larralde, C, Ridaura, F, Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 375-387.
- 7.- Gemmel, M., Matyas, Z., Pawlowsk, Z. y Soulsby, E.J.L. (1983). Guidelines for surveillance, prevention and control of Taeniasis/Cysticercosis. WHO publication VPH/83.9 Switzerland. 207 pp.
- 8.- Flisser, A. (1986). Cisticercosis: Un problema de salud pública y de producción ganadera. *Salud Uninorte.* 3:43-48.
- 9.- Zenteno-Alanis. (1982). A classification of Human cysticercosis. En: Flisser, A, K, Willms, JP, Lacllette, C, Larralde, C, Ridaura, F, Beltrán (eds). Cysticercosis : Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. pp 107-126.
- 10.- Malagón, F. (1989). Elementos del binomio Taeniasis/Cisticercosis. Una síntesis. En: A. Flisser, F, Malagón (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México, D.F. pp 36.
- 11.- Cañedo, L, Lacllette, J.P, Morales, E. (1982). Evagination of the metacestode of *Taenia solium* En: A, Flisser, K. Willms, J.P, Lacllette, C, Larralde, C, Ridaura, F, Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 363-374.

12.-Albores, S.J, Altamirano, M. (1971). Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizadas en el hospital General de México. *Rev. Invest. Salud. Publ.* 31:1-5.

13.- Rabiela-Cervantes MT, Rivas-Hernández, A, Rodríguez-Ibarra, J, Castillo-Medina, S, y Cancino, F.M. (1982). Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis En: A, Flisser, K. Willms, J.P, Laclette, C, Larralde, C, Ridaura, F, Beltrán (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York. pp 199-200.

14.- Flisser, A., Madrazo, I., Gonzalez, D., Sandoval, M., Rodríguez-Carbajal, J., De Dios, J (1988). Comparative analysis of human and porcine neurocysticercosis by computed tomography. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82:739-742.

15.- Flisser, A y Larralde, C. (1986). *Cysticercosis* En: Walls, K,W,Shantz, PM. (eds). *Immunodiagnosis of parasitic diseases.* Vol. I: Helminthic diseases. Academic press, New York. 109-161.

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

17.- Laclette, J.P., Merchant, M. y Willms, K. (1987). Histological and ultrastructural localization of antigen-B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 73:121-129.

18.- Espinoza B., Ruiz-Palacios., G, Tovar., A, Sandoval., MA, Plancarte, A., Flisser, A. (1986). Characterization by enzyme-linked immunosorbente assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 536-541.

19.- Correa D., Sandoval, MA., Harrison, L.J.S., Parkhouse, E.M., Plancarte, A., Meza-Lucas, A y Flisser, A. (1989). Human neurocysticercosis: Comparison of enzyme immunoassay techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies capture for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:814-816.

20.- Larralde, C., Montoya RM., Sciutto, E., Díaz, ML., Govezensky, T y Coltori, E. (1989). Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hidatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.* 40:284-292.

- 21.- Tsang, V., Bry, J. y Boyer, A. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Inf. Dis.* 159: 50-59.
- 22.- Feldman, M., Plancarte, A., Syoval, M., Wilson, M. y Flisser, A. (1990). Comparison of two assays (EIA y EITB) and two samples (saliva y serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg.* 84:559-562.
- 23.- Correa, D. (1989). Cisticercosis humana: Relación inmunológica huésped-parásito. En: A, Flisser, F, Malagón, (eds). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega. México D.F. pp 31-44.
- 24.- Flisser, A. (1987). Relación huésped-parásito en la cisticercosis humana y porcina. *Gac. Med. México.* 123:157-164.
- 25.- Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E. y Rubin, B.Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158:670-689.
- 26.- Nathan, C.F., y Tsumawaki, S. (1986). Secretion of toxic oxygen products by macrophages: regulatory cytokines and their effects on the oxidase. En: Evered, D., Nugent, J y O' Connor, M (eds). Ciba Symposium vol 118, 211-226 pp. (London: Pitman).
- 27.- Ho, J.L. (1989). Antimicrobial functions of Macrophages. En: M.S. Klempner, B. Styrt and J. Ho (eds). Phagocytes and disease. Kluwer Academic Publishers, U.K.
- 28.- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M. y Bazin, H. (1975). Specific IgE antibodies in immune adherence of normal macrophage to *Schistosoma mansoni* schistosomules. *Nature.* 253: 474-475.
- 29.- Capron, A., Dessaint, J.P., Haque, A., Auriault, C. y Joseph, M. (1983). Macrophages as effector cells in helminth infections. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 631-635.
- 30.- Haque, A., Joseph, M., Ovaissi, A., Capron, M. y Capron, A. (1981). IgE antibody in eosinophil and macrophage-mediated in vitro killing of *Dipetalonema viteae*. microfilariæ. *J. Immunol.* 127: 716-725.
- 31.- Metha, K., Sindhu, R.K., Subrahmanyam, D. y Nelson, D.S. (1980). IgE-dependent adherence and cytotoxicity of rat spleen and peritoneal cells to *Litomosoides carinii* microfilaria. *Clin. Exp. immunol.* 41:107-114.
- 32.- Klempner, M.s., Styrt, B. y Ho, J. (1989). Phagocytes and Disease. Kluwer Academic Publishers, U.K. 106 pp.

- 33.- Davis, M.M., y Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*. 334:395-402.
- 34.- Flavell, R. A., Allen, H., Burkly, L.C., Sherman, D.H., y Widlira, G. (1986). Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Cell*. 36:1-13.
- 35.- Rosenthal, A.S. y Shevach, E.M. (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirements for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J. Exp. Med.* 138:1194-1212.
- 36.- Pease, L.R., Horton, R.M., Pullen, J.K., y Cai, Z. (1992). Structure and origin of diversity in the major histocompatibility complex. *CRC Crit. Rev. Immunol.* en prensa.
- 37.- Chesnut, R. W., Colon, S.M. y Grey, H.M.. (1982). Requirements for the processing of antigens by antigen-presenting B cells. I. Functional comparison of B cell tumors y macrophages. *J. Immunol.* 129:2382-2388.
- 38.- Bolognesi, D. (1990). Fresh pathways to follow. *Nature*. 344:818-819.
- 39.- Weinberg, D.S. y Unanue, E.R. (1981). Antigen-presenting function of alveolar macrophages uptake and presentation of *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 126:794-798.
- 40.- Calderón, J. y Unanue, E.R. (1974). The release of antigen molecules from macrophages, characterization of the phenomena. *J. Immunol* 112:1804.
- 41.- DeNagel, D. y Pierce, S. (1992). A case for chaperones in antigen processing. *Immunology. Today*. 13:86-87.
- 42.- Furth, R., Schadewijk-Nieuwstad, M., Elzenga-Claasen, I., Cornelisse, C. y Nibbering, P. (1985). Morphological, Cytochemical, Functional, and Proliferative characteristics of Four Murine Macrophage-like cell lines. *Cellular Immunology*. 90:339-357.
- 43.- Freshney, R. (1983). Culture of animal cells. A manual of basic techniques. Alan R. Liss Inc. N.Y. U.S.A. 215 pp.
- 44.- Espinoza, B., Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. (1982). Immunodiagnosis of human Cysticercosis: ELISA and Immunoelectrophoresis. En: A, Flisser, K. Willms, J.P, Lactette, C, Larralde, C, Ridaura, F, Beltrán (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York. pp 163-170.
- 45.- Laemli, V. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-688.

- 46.- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- 47.- Lamb, J.R., Woody, J.N., Hartzman, R. y Eckels, D. (1982). *In vitro* influenza virus-specific antibody production in man: antigen specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes. *J. Immunol.* 129:1465-1472.
- 48.- Mustafa, A.S., Gill, H.K., Nerlund, A., Britton, W.J., Mehra, V., Bloom, B y Young, R. (1986). Human T-cell clones recognize a major *M. leprae* protein antigen expressed in *E. coli*. *Nature.* 319:63.
- 49.- Celis, E., Kung, P.C. y Chang, T.W. (1984). Hepatitis B virus-reactive human T lymphocyte clones: antigen specificity and helper function for antibody synthesis. *J. Immunol.* 132:1511-1522.
- 50.- Suzuki, Y., Orellana, A., Schreiber, J. y Remington, J. (1988). Interferon  $\delta$ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 240:516-520.
- 51.- Langermans, J., Nibbering, P. y Furth, R. (1990). Activation of mouse peritoneal macrophages during infection with *Salmonella typhimurium* does not result in enhanced intracellular killing. *J. Immunol.* 144:4340-4346.
- 52.- Cluff, C. y Ziegler, K. (1987). Inhibition of macrophage-mediated antigen presentation by hemolysin-producing *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 139:3808-3812.
- 53.- Unanue, E.R. (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. *Ann. Rev. Immunol.* 2:395-428.
- 54.- Howard, M.G. y Chesnut, R. (1985). Antigen processing and presentation to T cells. *Immunology Today.* 6:101-106.
- 55.- Allen, P., Beller, D., Braun, J. y Unanue, E.R. (1984). The hyling of *Listeria monocytogenes* by macrophages: the search for an immunogenic molecule in antigen presentation. *J. Immunol.* 132:323-329.
- 56.- Howard, M., Colon, M. y Chesnut, R. (1982). Requirements for the processing of antigen by antigen-presenting B cells. *J. Immunol.* 129:2389-2395.
- 57.- Davidson, H.W. y Watts, C. (1989). Epitope-directed processing of specific antigen by B lymphocytes. *J. of cell Biology.* 109:85-92.

58.- Ziegler, H.K. y Unanue, E.R. (1982). Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:175-178.

59.- Geirman, N.R. (1986). The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature.* 321:687-689.

60.- Ziegler, K.H., Orlin, A. y Cluff, C. (1987). Differential requirements for processing and presentation of soluble and particulate bacterial antigens by macrophages. *J. Immunol.* 17:1287-1296.

61.- Yamada, KM. and D, Kennedy. (1981). Glycolipids: receptors for fibronectin ? *J. Cell. Physiol.* 109 :343-351.

62.- Hämmerling, J.G. y Moreno, J. (1990). The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules. *Immunology. Today* 11:337-340.

63.- Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J., y Philippa, M. (1984). Antigen recognition by H-2-restricted T cells. *J. Immunol* 133:2067-2074.

64.- Chain, B.M., Kay,, M.P. y Feldmann, M. (1986). The cellular pathway of antigen presentation: biochemical and functional analysis of antigen processing in dendritic cells and macrophages. *Immunology.* 58:271-276.

65.- Aluja, A. (1986). La histopatología de la cisticercosis porcina. En: A, Flisser., F, Malagón (eds). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa-Noriega, México, D.F. pp 147-156.

66.- Medina, E. (1992). Efecto de productos del cisticerco de *Taenia solium* sobre eosinófilos *in vitro*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 53 pp.