

11281

"SUBSTANCIAS DEL CISTICERCO DE TAENIA SOLIUM QUE INDUCEN EFECTOS  
MODULADORES DE LA RESPUESTA INMUNE DEL HUESPED"

Tesis que presenta la Bióloga  
Patricia Margarita Tato Zaldivar  
para optar por el grado de  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
Area de Inmunología.  
Facultad de Medicina, U.N.A.M.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCION.....	3
1. Respuesta humoral en contra de parásitos.....	3
2. Respuesta celular antiparasitaria.....	4
3. Linfocinas en la respuesta inmune antiparasitaria..	6
4. Evasión de la respues inmune.....	7
5. Inmunosupresión en enfermedades parasitarias.....	8
6. Inmunosupresión en infecciones por taenidos.....	11
7. Productos de excreción y secreción de helmintos mediadores de inmunosupresión.....	12
II. HIPOTESIS.....	17
III. OBJETIVOS.....	18
IV. MATERIAL Y METODOS.....	19
1. Animales.....	19
2. Obtención de metacéstodos.....	19
3. Determinación de la viabilidad de los metacéstodos.....	20
4. Obtención del factor de metacéstodo de <u>Taenia solium</u> (F <sub>1</sub> ).....	20
5. Determinaciones bioquímicas.....	20
6. Efecto del factor sobre poblaciones celulares...	20
7. Determinación de la población celular afectada por el F <sub>1</sub> .....	23
8. Estudio de la naturaleza del F <sub>1</sub> .....	26

V. RESULTADOS.....	30
1. Viabilidad de los metacéstodos.....	30
2. Determinaciones analíticas.....	30
3. Efecto del F <sub>1</sub> en la proliferación de linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina.....	32
4. Efecto del F <sub>1</sub> en la proliferación de células de bazo de ratones Balb/c inducida por Con A.....	34
5. Cocultivos de macrófagos y linfocitos.....	35
6. Cocultivos de linfocitos.....	38
7. Naturaleza del factor de metacéstodos.....	40
VI. DISCUSION.....	48
VII. CONCLUSIONES.....	61
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	62

## RESUMEN

En este trabajo se reporta una sustancia de bajo peso molecular obtenida de metacéstodos de Taenia solium, que induce supresión de las respuestas proliferativas de linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina y de células de bazo de ratones Balb/c estimulados con Concanavalina A, en forma dosis-dependiente. Se observó que los linfocitos tratados con esta sustancia y después cocultivados con linfocitos frescos en presencia de Con A, indujeron supresión de las respuestas proliferativas al mitógeno, mientras que, al cocultivar células adherentes tratadas y linfocitos normales no se observó depresión de la respuesta a la Con A, lo que sugiere que los linfocitos son las células responsables de la depresión observada. Se piensa que esta sustancia es una molécula de ARN, ya que tiene un pico de absorbancia a 249 nm, contiene ribosa y es sensible a la digestión por ARNasa. Además, en un análisis de infrarrojo se observó que tiene abundancia de grupos que son compatibles con ácidos nucleicos. Por otro lado, con análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se determinó que el peso molecular aproximado de esta sustancia es de 2.9 Kd.

Los resultados sugieren que esta sustancia, pudiera participar en la modulación de la respuesta inmune del cerdo hacia el parásito, permitiendo así su permanencia en el huésped por largos periodos.

#### ABSTRACT

We are reporting a low molecular substance isolated from Taenia solium metacestodes, that induces a significant depressive effect on human lymphocyte proliferative responses stimulated with phytohaemagglutinin and on mouse spleen cells stimulated with Concanavalin A, in a dose-dependent manner. It was observed that incubation of lymphocytes with this substance and afterwards co-cultivation with Concanavalin-stimulated normal spleen cells showed reduced responses to the mitogen, while co-cultivation of treated adherent cells with concanavalin-stimulated normal lymphocytes showed no effects. These results suggest that lymphocytes are responsible for the depressive effect. It seems that this substance is an RNA molecule, while it shows an absorbance peak at 249 nm, contains ribose and is susceptible to RNase digestion. Additionally, an infrared absorption spectra showed abundance of chemical groups compatible with nucleic acids. By electrophoresis, its molecular weight was estimated to be 2.9 Kd.

These findings suggest that this product might be involved in the modulation of the host immune responses against the parasite, a mechanism that probably promotes long survival of the parasite.

## I. INTRODUCCION

Los parásitos inducen respuestas inmunes humorales y celulares en hospederos susceptibles. Sin embargo, debido a la complejidad de sus ciclos de vida, la inmunidad que inducen es generalmente específica de fase. La inmunidad dirigida contra fases infectivas de los parásitos (por ejemplo, esporozoitos de Plasmodium) conducen a un bloqueo completo de la infección, mientras que la inmunidad contra fases establecidas (merozoitos de Plasmodium) puede mantener el control de la infección, cuando es continuamente estimulada por la infección misma. Finalmente, la inmunidad contra formas o fases asociadas a la transmisión (estados sexuales en malaria o microfilarias) puede bloquear la continuación del ciclo de vida del parásito reduciendo la transmisión de la infección, particularmente en el caso de parásitos que carecen de reservorios (Sher y Colley, 1989).

### 1. Respuesta humoral en contra de parásitos

Aunque muchos parásitos estimulan respuestas humorales significativas, hay, relativamente pocos casos en los cuales los anticuerpos, en ausencia de otra respuesta inmune, han mostrado ser los responsables de la inmunidad protectora. En la mayoría de las parasitosis, la inmunidad involucra la cooperación de respuestas mediadas por células.

Los principales mecanismos efectores dependientes de

anticuerpos implicados en la inmunidad a parásitos son: el bloqueo de receptores y la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. El bloqueo de receptores se ha descrito en malaria, en donde se ha visto que anticuerpos dirigidos contra diferentes antígenos de superficie del merozoito (presentes en los organelos involucrados en la penetración al eritrocito), bloquean la infección de la célula huésped (Miller y cols., 1986). En infecciones con Trypanosoma cruzi, anticuerpos dirigidos contra un antígeno mayoritario de superficie (de 85 kd) bloquean la invasión de fibroblastos, presumiblemente por inhibir la unión a receptores celulares para fibronectina (Alves y cols., 1986; Zavala y cols., 1987). Además de evitar la invasión de las células, los anticuerpos pueden también limitar la sobrevivencia de los parásitos por bloquear la citoadherencia. Así, los eritrocitos infectados con Plasmodium falciparum se unen a células endoteliales mientras se lleva a cabo la maduración de las formas anulares a trofozoitos. Se piensa que este proceso de citoadherencia evita que los eritrocitos infectados sean destruidos por el bazo, porque los anticuerpos dirigidos contra las estructuras de los eritrocitos que se unen a las células bloquean este proceso in vitro (Miller y cols., 1986).

## **2. Respuesta celular antiparasitaria**

En lo que se refiere a citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos, se ha visto que este



mecanismo es muy importante en la destrucción de parásitos tisulares como Schistosoma mansoni. Butterworth y cols. (1984) han observado que esquistosómulas de S. mansoni pueden ser destruidas in vitro por anticuerpos y eosinófilos de pacientes infectados. Tanto anticuerpos IgG como IgE pueden participar en esta reacción por unirse a receptores Fc específicos en la superficie del eosinófilo, la interacción con estos receptores promueve la degranulación del eosinófilo y la destrucción del parásito (Capron y cols., 1987). La actividad citotóxica de los eosinófilos dependiente de anticuerpos contra las larvas de esquistosoma, puede ser incrementada por una variedad de mediadores como el factor quimiotáctico producido por células cebadas y citocinas como el factor de necrosis tumoral, el factor estimulador de colonias, y otros productos de linfocitos y monocitos activados (Silverstein y David, 1987). Hay otras células que también pueden participar en fenómenos de citotoxicidad dependiente de anticuerpos contra parásitos como son: los macrófagos, los neutrófilos y las plaquetas, cuya actividad para eliminar esquistosómulas es dependiente de IgE (Capron y cols., 1987).

La inmunidad mediada por células ha sido reconocida en años recientes, como el principal componente de la respuesta protectora contra protozoarios y helmintos, tal vez debido a que la evasión de las respuestas celulares es mucho menos común que la de las respuestas humorales. Esto es particularmente cierto en los casos que involucran macrófagos activados cuyo

reconocimiento de los antígenos de superficie del parásito, no es esencial para la función de la célula efectora. Entre los principales mecanismos efectores mediados por células que participan en la inmunidad a parásitos tenemos: la actividad de linfocitos citotóxicos y la activación celular por linfocinas. La importancia de la actividad de linfocitos citotóxicos se ha demostrado en la destrucción in vitro de células linfoblastoides infectadas por un protozoario del ganado vacuno (Theileria parva), cuando se ponen en contacto con linfocitos T CD8<sup>+</sup> obtenidos de animales inmunizados. Esta actividad está restringida por antígenos de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (Goddeeris y cols., 1986).

### **3. Linfocinas en la respuesta inmune antiparasitaria**

La producción de linfocinas por linfocitos T cooperadores es la forma de respuesta celular más significativa en la inmunidad anti-parasítica. Estos mediadores solubles activan células efectoras para eliminar a los parásitos directamente, o en reacciones de citotoxicidad dependientes de anticuerpos. Los efectos de la activación más dramáticos, los observamos en parásitos que invaden macrófagos como Leishmania, Trypanosoma y Toxoplasma (Sher y Colley, 1989). Macrófagos tisulares activados por linfocinas parecen ser particularmente potentes para matar larvas de esquistosoma in vitro (Bout y cols., 1981). Similarmente, eosinófilos de ratón pueden ser activados para matar huevos de esquistosoma in vitro por

linfocinas distintas a las involucradas en la activación de macrófagos (Colley, 1973). El papel in vivo de estas respuestas mediadas por células en la inmunidad a parásitos es apoyada por una sólida evidencia. Por ejemplo, experimentos efectuados con ratones endocriados que tenían un defecto en la producción de linfocinas y en la activación de macrófagos, mostraron ser mas susceptibles a la infección con Leishmania major (Fortier y cols., 1984) y fueron incapaces de desarrollar inmunidad contra Schistosoma mansoni inducida por vacunación (James y cols., 1984).

#### **4. Evasión de la respuesta inmune**

Una de las características distintivas de las infecciones parasitarias es su longevidad o cronicidad, a pesar de la inmunidad que inducen. Las estrategias adoptadas por los parásitos para evitar la eliminación por sus hospederos son numerosas y dependen de su sitio de colonización y de su relativa exposición al medio ambiente hostil del hospedero. Estas estrategias pueden abarcar desde la explotación de la inmunocompetencia hasta la manipulación de la respuesta inmune específica (Sher y Colley, 1989).

Las consecuencias inmunológicas de la cronicidad son de fundamental importancia. La sobrevivencia de los parásitos en un medio ambiente hostil, los obliga a desarrollar mecanismos capaces de evadir o controlar las respuestas inmunes del hospedero. Las estrategias de evasión son de gran interés ya que

contribuyen a la resistencia de los parásitos a la inmunidad inducida por la vacunación. Por otro lado, la estimulación antigénica prolongada que ocurre en los parasitismos crónicos, tiene consecuencias inmunoregulatorias importantes, en términos de la carencia de respuestas inmunes específicas o de respuestas generalizadas del individuo parasitado. Muchas infecciones parasitarias, especialmente por protozoarios, están asociadas con supresión generalizada de la respuesta inmune. Muchas de las lesiones patológicas inducidas por los parásitos, pueden ser atribuidas a la respuesta inmune del hospedero. La inmunoregulación es también central para el entendimiento de la inmunopatología observada en las enfermedades parasitarias (Sher y Colley, 1989).

##### **5. Inmunosupresión en enfermedades parasitarias**

Se ha observado que en muchas enfermedades parasitarias, se producen alteraciones de la respuesta inmune, que afectan la respuesta específica hacia el parásito, o bien conducen a una disfunción general del sistema inmune. Williamson y Greenwood (1978) observaron que los niños con malaria aguda, tienen una respuesta inmunodeprimida a la vacunación contra fiebre tifoidea, tétanos y meningococo. Más aún, Ho y cols. (1986) reportaron que la respuesta proliferativa de linfocitos T de pacientes con malaria aguda o de individuos convalescientes se encontró deprimida tanto hacia los antígenos del parásito como hacia antígenos no relacionados.

Mason y Gwanzura (1990) reportaron que células de sangre periférica de mujeres con tricomoniasis activa, mostraban respuestas proliferativas disminuídas hacia mitógenos de células T y B. Por otro lado, Feldmeier y cols. (1985) encontraron una inversión en la proporción de poblaciones de linfocitos T4/T8 en niños sudaneses con esquistosomiasis. Los mecanismos responsables de esta alteración no están completamente comprendidos, sin embargo, se ha argumentado frecuentemente que estos fenómenos inmunosupresores son inducidos por los parásitos para promover su propia sobrevivencia (Sher y Colley, 1989; Mitchell, 1991).

Los mecanismos por los cuales se produce la inmunosupresión son diversos, en algunos casos se atribuye a funciones de linfocitos, en otros a células adherentes o a complejos inmunes. En malaria experimental (Weindanz, 1982), tripanosomiasis africana (Mansfield, 1981) y en enfermedad de Chagas (Brenner, 1980) este fenómeno resulta de alteraciones en células B, T y en células supresoras adherentes. Un ejemplo de ésto, es la participación de células Thy-1<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) en la supresión de la producción de IL-2 durante la infección con Trypanosoma cruzi murina, en tanto que los macrófagos participan menos activamente en esta regulación (Tarleton, 1988). Clayton y cols. (1979) encontraron que algunos componentes subcelulares de Trypanosoma brucei brucei inducen inmunosupresión en ratones y promueven esplenomegalia y gran cantidad de células inespecíficas formadoras de placa.

La inmunosupresión en infecciones humanas como tripanosomiasis americana o africana y malaria puede resultar en una disminución de las respuestas humorales (y en menor grado de las celulares) hacia antígenos no relacionados (Sher y Ottesen, 1988), sin embargo, las consecuencias clínicas y la interpretación de estos decrementos no han sido firmemente establecidas.

En leishmaniasis, Howard y cols. (1980) reportaron que ratones Balb/c infectados con Leishmania tropica desarrollaban células T supresoras específicas y Nickol y Bonventre (1985a) observaron inmunosupresión en hamsters con leishmaniasis visceral, tanto hacia antígenos del parásito como hacia antígenos no relacionados, asociada a poblaciones de células T. Estos investigadores (1985b) también encontraron que, las células de bazo de ratones con leishmaniasis visceral suprimen las respuestas proliferativas, de células de bazo de ratones no infectados, a mitógenos de células T y B, así como hacia antígenos del parásito. Finalmente, identificaron a las células supresoras como una población de macrófagos. Por otro lado, Petersen y cols. (1984) encontraron evidencias en pacientes dominicanos con leishmaniasis cutánea difusa, que sugieren que la célula supresora es el monocito, mientras que en ratones inmunizados contra leishmaniasis cutánea (Leishmania major), Dhaliwal y cols. (1985) encontraron deprimidas las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado a antígenos relacionados asociada a células T supresoras.

En lo que se refiere a la inmunosupresión por complejos antígeno-anticuerpo. Los resultados de Cox y Hayes (1985) trabajando con plasma de ratas infectadas con Plasmodium chabaudi, sugieren que los complejos antígeno-anticuerpo son los responsables de la supresión sobre linfocitos de bazo productores de anticuerpos. En esquistosomiasis, Attallah y cols. (1979) observaron que tanto los complejos inmunes como las células supresoras contribuyen a la supresión observada en la esquistosomiasis aguda murina. Cottrell y cols. (1980) también sugieren que los complejos inmunes del suero de monos infectados con Schistosoma mansoni son los responsables de la supresión.

#### **6. Inmunosupresión en infecciones por taenidos**

Las infecciones por taenidos también han sido asociadas con una depresión de la respuesta inmune del hospedero. En cisticercosis experimental, Good y Miller (1976) encontraron depresión de la respuesta primaria y secundaria hacia eritrocitos de carnero, en ratones con infección intraperitoneal por Taenia crassiceps. Más aún, Willms y cols. (1980) observaron que después de implantar metacéstodos de Taenia solium en la cavidad peritoneal de ratones, sus linfocitos mostraron una respuesta deprimida a Concanavalina A. Similarmente, los sobrenadantes de metacéstodos de Taenia taeniaeformis pueden disminuir la respuesta proliferativa inducida por mitógenos y la producción de IL-2 por células de bazo de rata (Burger y cols. 1986). Rakha y cols. (1991a, 1991b) han sugerido que estos efectos parecen

estar mediados, al menos en parte, por los macrófagos como células presentadoras de antígeno. En nuestro laboratorio, hemos encontrado una disminución en la cantidad de linfocitos T y B formadores de rosetas en cerdos naturalmente parasitados por metacéstodos de T. solium (Tato y cols., 1987). Esta inmunodepresión fué particularmente marcada en la población de células T cooperadoras y fué proporcional a la magnitud de la carga parasitaria (Molinari y cols., 1987).

#### **7. Productos de excreción y secreción de helmintos mediadores de inmunosupresión**

Se ha propuesto que los productos de excreción y secreción de helmintos contribuyen a las estrategias de evasión inmune de los parásitos a través de mecanismos como: la liberación de moléculas de superficie unidas o no a ligandos o a células del hospedero; la alteración de las funciones de macrófagos, linfocitos y granulocitos; y la modulación del complemento y de otras respuestas inflamatorias del huésped (Lightowers y Rickard, 1988). La liberación activa de antígenos de la superficie de helmintos puede ser importante en la relación hospedero-parásito ya sea a través de estimular el sistema inmune y/o de eliminar ligandos del hospedero unidos a la superficie de los parásitos.

Los anticuerpos unidos a la superficie son fácilmente eliminados en las esquistosómulas de Schistosoma mansoni (Samuelson y Caulfield, 1982) y de gusanos adultos (Kusel y



cols., 1975). McLaren y cols. (1975) y Goldring y cols. (1977) observaron que a los pocos días de desarrollo in vivo, las esquistosómulas de S. mansoni mostraban una habilidad reducida para unir anticuerpos dirigidos contra antígenos de superficie del parásito. También se ha propuesto, que la adsorción de moléculas del hospedero en la superficie del parásito contribuye a la evasión de la respuesta inmune. En este sentido, McLaren (1984) encontró una correlación entre la presencia de moléculas del hospedero en la superficie del parásito y la reducida capacidad de éstos para unir anticuerpos anti-parásito.

Se ha observado que los helmintos también producen sustancias que modulan el complemento y otras reacciones inflamatorias del hospedero. Hammerberg y Williams (1978) describieron un factor liberado por el metacéstodo de Taenia taeniaeformis que inicia la fijación del complemento tanto por vía clásica como alterna, conduciendo a una profunda depresión de los niveles de complemento circulante cuando es administrado intravenosamente en ratas. En otro trabajo, Hammerberg y cols. (1980) reportaron que las fracciones que inhiben el complemento y afectan la coagulación son glicosaminoglicanos polisulfatados. Laclette y cols. (1987, 1992) han reportado una proteína del metacéstodo de Taenia solium, el antígeno B, que se une a C1q e inhibe la activación del complemento por vía clásica. Se ha encontrado que este antígeno es una paramiosina (Laclette y cols., 1991). Camp y Leid (1982) han reportado la existencia de

factores producidos por metacéstodos de T. taeniaeformis que tienen efectos quimiotácticos in vitro en eosinófilos y neutrófilos. Todos estos hallazgos sugieren que el parásito modula la respuesta inflamatoria del huésped.

La modulación de las funciones de macrófagos y granulocitos por productos del parásito pudiera potencialmente regular tanto los mecanismos efectores de la inmunidad celular a helmintos como la función de los macrófagos a través del procesamiento o presentación del antígeno y la producción de monocinas. En este sentido, se ha encontrado que proteínas secretadas por esquistosomas, inhiben indirectamente algunas funciones de macrófagos. Estas proteínas hidrolizan IgG libre o inmunoglobulinas unidas a la superficie de las esquistosómulas, produciendo péptidos que inhiben la estimulación de los macrófagos, determinada por ensayos de fagocitosis, liberación de enzimas y citotoxicidad mediada por IgE de las esquistosómulas (Auriault y cols., 1980, 1981a, 1981b). Similarmente, White y cols. (1992) detectaron proteínas liberadas por metacéstodos de Taenia solium que digieren hemoglobina e IgG humanas entre otros sustratos y sugieren que estas enzimas proteolíticas pueden ser importantes para la sobrevivencia del parásito en el hospedero intermediario; tanto para la provisión de nutrientes, como para la digestión de moléculas que participan en la respuesta inmune.

En lo que se refiere a la supresión de funciones de linfocitos in vitro o su inmunoreactividad reducida, se ha encontrado que productos de excreción o secreción de Taenia

taeniaeformis tienen efectos inhibidores de la función de linfocitos in vitro a través de la inducción de poblaciones de células supresoras (Burger y cols., 1986). Dessaint y cols. (1977) reportaron factores liberados por S. mansoni que son inhibidores de la proliferación de linfocitos inducida por mitógenos y que son termoestables, dializables y de bajo peso molecular (500-1,000 d). Por otro lado, Yin Foo y cols. (1983) encontraron un factor inmunosupresor producido por microfilarias de Onchocerca gibsoni que también es termoestable, dializable y de peso molecular menor de 10 Kd. Mientras que, Leiva y Lammie (1989) reportaron que extractos solubles de microfilarias de Brugia pahangi suprimían la producción de linfocinas inducida en células de nódulos linfáticos por mitógeno.

En nuestro laboratorio, hemos encontrado un factor producido por metacéstodos de T. solium que es dializable a través de membranas Spectrapor que excluyen moléculas de menos de 3.5 Kd y que tiene un efecto depresor en la respuesta de ratones a la vacunación contra fiebre tifoidea murina, cuando es inoculado con la vacuna (Molinari y cols., 1989).

Toda esta información, nos permite observar que la interacción hospedero-parásito presenta diversas modalidades para cada parásito específico, lo que hace importante el estudio de cada parasitosis. En lo que se refiere a la relación hospedero-parásito en teniasis, sabemos que el parásito induce estados de inmunosupresión en el hospedero intermediario, que el metacéstodo in vitro libera sustancias que inducen depresión in vivo a

antígenos no relacionados, sin embargo no hay mucha información de como el parásito regula la respuesta inmune del hospedero, ni qué célula(s) interviene en la supresión. Esta parasitosis tiene relevancia ya que causa enfermedad grave en el hombre y pérdidas económicas importantes a los criadores de cerdos, de ahí nuestro interés por seguir estudiando la modulación de la respuesta inmune por el metacéstodo de Taenia solium.

## II. HIPOTESIS

Si el factor de bajo peso molecular producido por los metácestodos de Taenia solium es capaz de inducir depresión de la respuesta de los ratones a la vacunación contra fiebre tifoidea, entonces este factor debe producir efectos de inhibición de la proliferación in vitro de alguna población de células de bazo de ratones inducida por mitógenos de células T.

Si el factor de cisticerco es capaz de inducir depresión en ratones, entonces se espera que también deprima la respuesta proliferativa de linfocitos humanos a mitógenos de células, ya que el hombre puede ser infectado por este parásito.

### III. OBJETIVOS

En base en los antecedentes previamente descritos, los objetivos de este trabajo son:

1. Determinar el efecto del factor de cisticercos de T. solium en las respuestas proliferativas, inducidas por mitógenos, de linfocitos humanos y de células de bazo de ratón in vitro.
2. Determinar la población celular que es afectada o que participa en la inducción de la supresión.
3. Caracterización del factor de cisticercos por ensayos fisicoquímicos (estimación de peso molecular, susceptibilidad al calor y sensibilidad a la digestión con diferentes enzimas).

#### IV. MATERIAL Y METODOS.

##### 1. Animales

Los cerdos naturalmente parasitados con metacéstodos de Taenia solium se obtuvieron en el estado de Guerrero, se trajeron a la Ciudad de México y se mantuvieron con agua y alimento ad libitum hasta su sacrificio.

Los cerdos sanos que se utilizaron como testigos, fueron híbridos (F-1) de las cepas Yorkshire y Landrase que se compraron en una granja controlada de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y se mantuvieron en las mismas condiciones que los parasitados hasta su sacrificio.

Los ratones que se utilizaron en los experimentos de transformación blastoide fueron de la cepa Balb/c machos y hembras de 20-25 gr.

##### 2. Obtención de metacéstodos

Los cerdos cisticercosos se sacrificaron con choque eléctrico, se destasaron y se llevaron las piezas de carne al laboratorio, donde se revisaron por cortes finos para disecar cuidadosamente los metacéstodos de T. solium, los que se depositaron en un vaso de precipitados que contenía agua destilada estéril.

### **3. Determinación de la viabilidad de los metacéstodos**

La viabilidad de los metacéstodos se determinó siguiendo el método descrito por Cañedo y cols. (1982). Se tomaron de 50 o 100 metacéstodos y se depositaron en una caja de petri con 30 ml de RPMI que contenía 0.1% de tripsina y dextrosa (4 mg/ml) y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 hs. Se contaron los escólices que evaginaron y se observó la movilidad que presentaban.

### **4. Obtención del factor de metacéstodo de Taenia solium (F<sub>1</sub>)**

Los metacéstodos disecados se incubaron a temperatura ambiente en el agua destilada estéril durante 4 hs y después se separaron por filtración. El líquido filtrado se liofilizó con el fin de disminuir el volumen. Después, el material se resuspendió en 20 ml de agua destilada estéril y se dializó, utilizando una membrana que excluye moléculas con pesos moleculares menores de 3.5 Kd (Spectrapor), contra agua destilada estéril durante 24 hs. El material fuera de la membrana se liofilizó y se denominó "factor de metacéstodo" o "F<sub>1</sub>".

### **5. Determinaciones Bioquímicas**

Con el fin de poder cuantificar el F<sub>1</sub>, se le determinó la concentración de proteína y ARN utilizando el método de Lowry (1951) y orcinol (Ashwell, 1957) respectivamente.

### **6. Efecto del factor sobre poblaciones celulares**



Con la finalidad de saber si el factor obtenido de metacéstodos de Taenia solium tenía efecto sobre la proliferación de células in vitro se realizaron experimentos de transformación blastoide tanto en linfocitos humanos como en células de bazo de ratones Balb/c.

#### Obtención de linfocitos humanos

Los linfocitos de humano fueron donados por una sola persona para todos los experimentos, se aislaron de 20 ml de sangre periférica siguiendo el método descrito por Boyum (1968). Se depositaron cuidadosamente 3 ml de sangre sobre 3 ml de Histopaque 1077 (Sigma), se centrifugó a temperatura ambiente en centrífuga clínica a 1500 rpm durante 30 min. Después de la centrifugación, se aspiró cuidadosamente con una pipeta pasteur el sobrenadante superior hasta 0.5 cm de la interfase opaca que contenía las células mononucleares y se eliminó. La interfase opaca, se transfirió a un tubo de centrifuga, se completó el volumen a 10 ml con RPMI y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y se repitió el lavado una vez más. El paquete celular se resuspendió en RPMI completo que contenía 10% de suero fetal inactivado (Gibco), penicilina (100,000 U/ml) y estreptomycinina (100 µg/ml) (Sigma). La viabilidad de las células se estimó por exclusión del azul de tripano.

#### Transformación blastoide con linfocitos humanos

La concentración celular que se usó por cultivo fue de  $5 \times 10^5$  células/0.1 ml en RPMI . Se agregaron a cada cultivo:

100  $\mu$ l de RPMI completo, o 100  $\mu$ l de Fitohemaglutinina "M" (PHA) (400  $\mu$ g/ml), o 100  $\mu$ l de PHA más 20 $\mu$ l de diferentes concentraciones de F<sub>1</sub> (30, 3 y 0.3  $\mu$ g/20  $\mu$ l), o 100  $\mu$ l de PHA más 20  $\mu$ l de diferentes concentraciones del F<sub>1</sub> digerido con ARNasa (30, 3 y 0.3  $\mu$ g/20  $\mu$ l). Los volúmenes de cada pozo se ajustaron a 120  $\mu$ l con RPMI completo. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. Los cultivos fueron incubados a 37°C y con 5% CO<sub>2</sub> durante 72 hs. Después de este tiempo de incubación, las células se marcaron con 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada por cultivo y se incubaron por 17 hs más. Las células se cosecharon después de esta segunda incubación en papel filtro de microfibra de vidrio (Whatman 934AH), se secaron y la radiactividad se midió en un contador (Packard Tri-Carb 300) por espectroscopia en 7 ml de líquido de centelleo (que contenía 19.6 gr de PPO y 0.4 gr de POPOP en 3 lt de tolueno y 500 ml de etanol).

#### Transformación blastoide con células de ratón

Se realizaron cultivos de células de bazo de ratón a los que se les agregó Concanavalina A (Con A) y F<sub>1</sub> a diferentes concentraciones. En un experimento típico, se extrajeron los bazos de ratones Balb/c los que se recibieron en medio de RPMI, se perfundieron utilizando una jeringa estéril de 5 ml para obtener las células. Las células se transfirieron a un tubo de centrífuga de 50 ml, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 5 ml de RPMI completo. La viabilidad de las células se estimó por exclusión del azul de tripano, las células se contaron y se

ajustó la suspensión a  $5 \times 10^6$  células/ml. Se depositaron 100  $\mu$ l de esta suspensión ( $5 \times 10^5$  células) en cada pozo de una caja de microcultivo de 96 pozos (Costar). Se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de RPMI completo o 100  $\mu$ l de Con A (5  $\mu$ g/ml), o 100  $\mu$ l de Con A + 20  $\mu$ l de  $F_1$  en cada una de las siguientes concentraciones: 10, 5 ó 1  $\mu$ g/20  $\mu$ l, se ajustó el volumen de cada pozo a 120  $\mu$ l con RPMI completo. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. Las células se incubaron durante 48 hs a 37°C en un ambiente con 5% de  $CO_2$ . A las 48 hs, las células se marcaron con timidina tritiada (1  $\mu$ Ci/5  $\mu$ l de RPMI completo) y 18 hs después se cosecharon en papel filtro de microfibra de vidrio (Whatman 934-AH) y se dejaron secar. Una vez que los papeles filtros estuvieron secos, se transfirieron a viales de centelleo que contenían 7 ml de líquido de centelleo, se agitaron y se leyeron en un contador de radiactividad Packard Tri-Carb 300. En cada experimento se usaron grupos de 4 ratones.

#### **7. Determinación de la población celular afectada por el $F_1$**

Para determinar que población era afectada por el  $F_1$  se realizaron cocultivos de células de bazo de ratones Balb/c singénicos. Con el fin de comprobar que los ratones de nuestra cepa eran singénicos, realizamos transplantes de piel entre algunos de ellos.

#### **COCULTIVO DE MACROFAGOS Y LINFOCITOS**

##### **Obtención de macrófagos**

La obtención y manejo de macrófagos, se realizó en

condiciones de asepsia y esterilidad. El peritoneo de ratones Balb/c se lavó con 5 ml de RPMI que contenía 100 U de heparina/ml, la suspensión celular se transfirió a un tubo de 15 ml y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se desechó y las células se lavaron una vez con RPMI por centrifugación. El sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 3 ml de RPMI completo, se estimó la viabilidad por exclusión del azul de tripano y la población se ajustó a  $5 \times 10^6$  células/ml.

En una caja de cultivo de 96 pozos, se depositaron 100  $\mu$ l de macrófagos/pozo y por triplicado. Se añadieron 100  $\mu$ l de RPMI completo ó 100  $\mu$ l de dosis crecientes de  $F_1$  (10, 5 ó 1  $\mu$ g/pozo) y se incubaron durante 24 hs a 37°C, en presencia de una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

#### **Obtención de linfocitos**

Para realizar los cocultivos, se obtuvieron linfocitos de bazo de ratones Balb/c como ha sido descrito, los que se separaron por flotación en ficoll-hipaque (Histopaque, Sigma). La suspensión celular se depositó en una caja de petri estéril que se incubó a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 2 hs, con el objeto de depletar la suspensión celular de macrófagos. Después de la incubación, las células se aspiraron de la caja de petri con una pipeta pasteur y se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 3 ml de RPMI completo. La viabilidad celular se estimó por exclusión del azul

de tripano y se ajustó la suspensión a  $2.5 \times 10^6$  células/ ml.

#### **Cocultivo de macrófagos y linfocitos**

Después de incubar los macrófagos con  $F_1$ , se aspiró el sobrenadante de cada pozo, todos los pozos se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de RPMI mantenido a  $37^\circ\text{C}$ , para evitar que las células adherentes se desprendieran. A cada pozo se le agregaron 100  $\mu$ l de la suspensión de linfocitos, el volumen final se ajustó a 200  $\mu$ l con RPMI, las células se incubaron durante 48 hs, se añadieron 5  $\mu$ l de RPMI conteniendo 1  $\mu$ Ci de timidina tritiada por pozo y se incubaron otras 18 hs más. Pasado este tiempo, las células se cosecharon, se secaron y se contaron como se ha descrito anteriormente.

#### COCULTIVO DE LINFOCITOS CON LINFOCITOS

##### **Obtención de linfocitos tratados con $F_1$**

Los linfocitos de bazo de ratones Balb/c, se obtuvieron como ha sido descrito y se separaron por flotación en Histopaque. Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en un ambiente de  $\text{CO}_2$  al 5% durante 2 hs en una caja de petri estéril con el objeto de depletar la suspensión de macrófagos. Se transfirieron a tubos de centrífuga estéril y el sobrenadante se separó por centrifugación a 1500 rpm/10 min y se eliminó. Se lavaron las células con RPMI por centrifugación una vez, se resuspendieron por separado, se les estimó su viabilidad y se ajustaron las poblaciones a  $5 \times 10^6$  células/ml. Se depositó 1 ml de la suspensión celular por pozo en una caja de cultivo de 6 pozos

suspensión celular por pozo en una caja de cultivo de 6 pozos (Costar), se les agregó RPMI ó diferentes concentraciones de  $F_1$  (100, 50 o 10  $\mu\text{g/pozo}$ ) y el volumen se ajustó a 2.5 ml por pozo con RPMI completo. Las células se incubaron 24 hs, a 37°C en 5%  $\text{CO}_2$ .

#### **Cocultivo de linfocitos tratados y linfocitos frescos**

Después de la incubación con RPMI ó  $F_1$ , las células se transfirieron a tubos de centrifuga y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min, el sobrenadante se decantó y se guardó en congelación para ser probado posteriormente. Las células se lavaron 2 veces con RPMI por centrifugación, se resuspendieron en 0.5 ml de RPMI completo y se estimó su viabilidad por exclusión del azul de tripano, la suspensión celular se ajustó a  $5 \times 10^6$  células/ml. Se depositaron en una caja de cultivo de 96 pozos, 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular por pozo para cada tratamiento y por triplicado, se les agregaron 100  $\mu\text{l}$  de linfocitos frescos a cada pozo, las células se incubaron a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de 48 hs, las células se marcaron con 1  $\mu\text{Ci}$  de timidina tritiada, incubándose 18 hs más. Después se cosecharon y la radioactividad se estimó como se ha descrito anteriormente.

### **8. Estudio de la naturaleza del $F_1$**

#### Estudio Espectrofotométrico

Con el fin de saber que tipo de material constituía la fracción  $F_1$ , se hizo un espectro de absorción de 100 a 800 nm.

### Cromatografía del F<sub>1</sub> en Bio-gel P 6

Para determinar si teníamos más de un componente en nuestro factor obtenido de metacéstodos, se realizó una cromatografía por ultrafiltración utilizando un Bio-gel P 6 (Bio-Rad). Se aplicaron 300 mg de F<sub>1</sub> en una columna de Bio-gel P 6 (60 x 0,9 cm) y el material se eluyó con agua destilada estéril. Las fracciones eluidas, se leyeron a 260 y 280 nm, se mezclaron por picos, se liofilizaron y posteriormente se les determinó su concentración de ARN y se probaron en experimentos de transformación blastoide con la intención de detectar en que fracción se encontraba la actividad biológica.

### Digestión enzimática del F<sub>1</sub>

Como el F<sub>1</sub> mostró tener actividad biológica in vitro sobre las células de bazo de ratones y ya que las determinaciones bioquímicas revelaron que tenía tanto proteína como ARN, 20 mg se digirieron con ARNasa, mientras otro tanto con proteasas para elucidar en que fracción residía la actividad biológica.

La digestión del material de F<sub>1</sub> con ARNasa se llevó a cabo en presencia de inhibidores de proteasas siguiendo el método descrito por Uchida y Egami (1967) con algunas modificaciones. Se preparó una mezcla de reacción que contenía: 250 µl de Tris HCl 0.1 M, pH 7.5, 100 µl de ARNasa (Sigma) que tenía 5 mg/ml de agua destilada (previamente incubada a 90°C durante 15 min), 100 µl de EDTA 0.01 M, 2 µl de inhibidor de tripsina (100 µg/ml), 20 µl de p-hidroximercuribenzoato (.001 M) y 20 mg de F<sub>1</sub> en 300 µl de Tris HCl 0.1 M, pH 7.5. La mezcla de reacción se incubó

durante 4 hs en baño maria a 37°C. El material digerido se dializó durante 18 hs contra agua destilada estéril utilizando una membrana de dialisis que excluye moléculas de pesos moleculares por debajo de 3.5 Kd. El material que salió de la membrana se liofilizó y se guardó en congelación hasta su uso.

La digestión de  $F_1$  con tripsina y quimiotripsina se realizó siguiendo el método descrito por Judson y cols. (1987) y con papaina el descrito por Margni (1980). Las condiciones para las digestiones fueron las siguientes: 20 mg de  $F_1$  resuspendidos en 1.25 ml de amortiguador de fosfatos de sodio 0.02 M, pH 8.0 para tripsina; 7.5 para quimiotripsina y pH 7.0 para papaina y 1.25 ml de cada enzima resuspendida en amortiguador a los pHs indicados para cada una y a las siguientes concentraciones: tripsina, 100  $\mu$ g/ml; quimiotripsina, 10 U/ml y papaina, 150  $\mu$ g/ml. El amortiguador usado para la digestión de papaina contenía además cisteína (0.01 M) y EDTA (0.002 M). Las mezclas de reacción para tripsina y papaina se incubaron durante 4 hs y la de quimiotripsina 2 hs a 37°C. Los digeridos se dializaron en una membrana Spectrapor 3 contra agua destilada estéril durante la noche y el material fuera de la membrana se liofilizó. Se incluyeron testigos de las enzimas dializadas en las mismas condiciones que los digeridos para estar seguros de que los efectos observados se debieran al efecto de la digestión sobre el  $F_1$ .

Las subfracciones obtenidas de la cromatografía del  $F_1$  en Bio-gel P 6, denominadas picos 1 y 2, también se digirieron



con ARNasa y con tripsina.

El F<sub>1</sub> fue sometido también a ebullición por 10 min, para conocer si el material que tenía la actividad biológica era estable o no al calor.

Tanto los digeridos con ARNasa como con proteasas, así como el material sometido a calentamiento fueron utilizados en pruebas de transformación blastoide para conocer si su actividad biológica se había alterado por alguno de estos tratamientos.

#### Análisis de Infrarrojo

Con la intención de caracterizar un poco más el F<sub>1</sub>, se le realizó un espectro de absorción en infrarrojo en un espectrofotómetro Nicolet 5SX.

#### Electroforesis

Se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio del F<sub>1</sub> y de los picos obtenidos por la cromatografía del material en Bio-gel P 6, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). Se utilizó un gel al 14% de poliacrilamida como gel resolvente y se tiñó con bromuro de etidio para detectar la fracción de ARN o bien con nitrato de plata (Oakley y cols., 1980) para proteínas. Para calcular el peso molecular del F<sub>1</sub>, se incluyeron estándares de pesos moleculares: bacitracina (1.5 Kd) y citocromo C (13 Kd).

## V. RESULTADOS

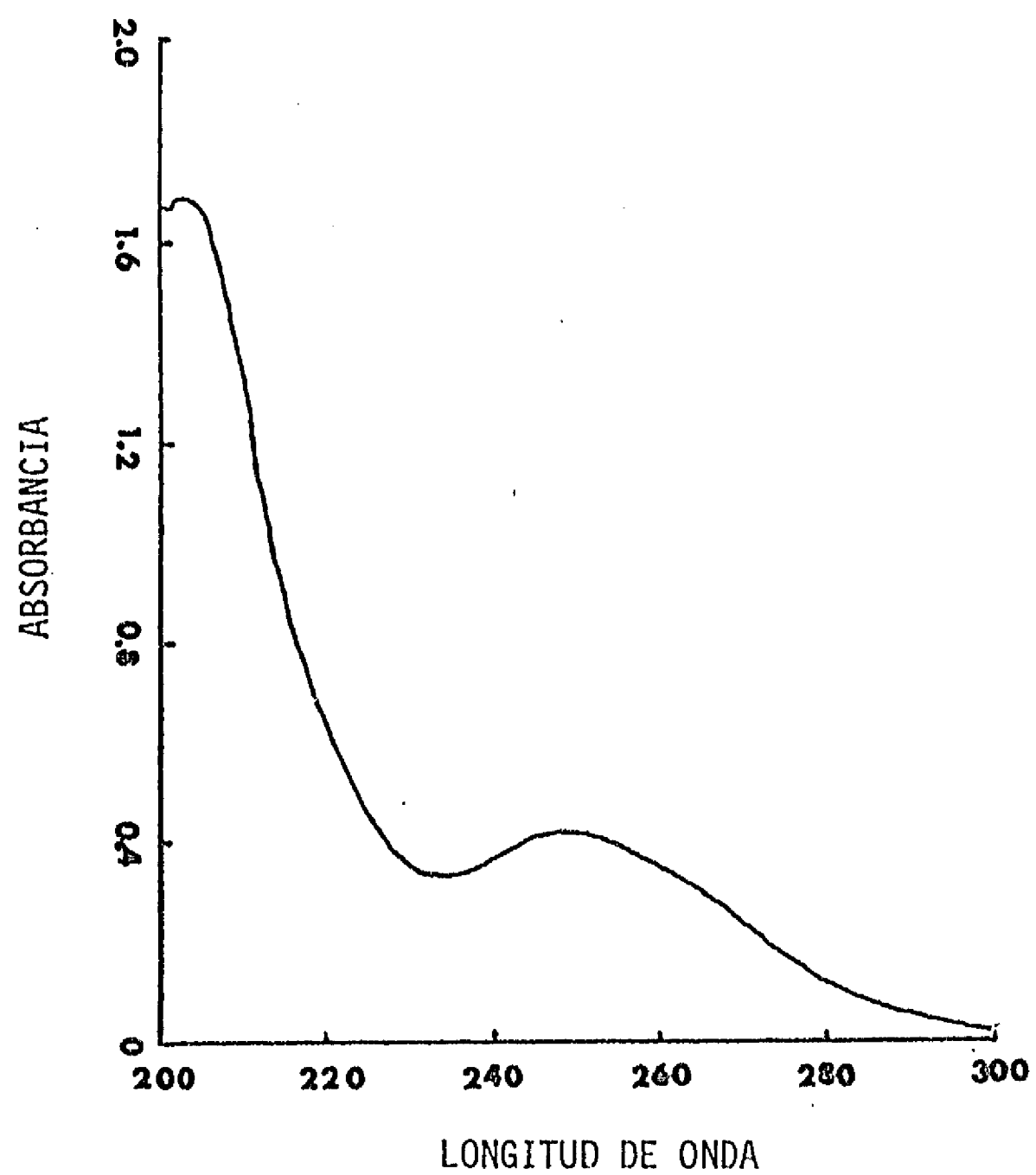
### 1. Viabilidad de los metacéstodos

Los metacéstodos que se usaron para obtener el factor tuvieron una viabilidad del 92 al 98%

### 2. Determinaciones analíticas

El estudio espectrofotométrico del  $F_1$  mostró un pico de absorbancia a 249 nm, sugiriendo que este material puede estar constituido por ácidos nucleicos (Figura 1). El material se resuspendió en agua destilada, así es que se le hizo un espectro de absorbancia al agua destilada como control y no dió ninguna lectura.

Las determinaciones de ARN resultaron positivas en todos los lotes, teniendo una concentración media de 80µg 10µg por mg de peso seco del factor. La concentración de proteína fué menor teniendo un valor medio de 15µg 5µg por mg de peso seco. De tal forma que utilizamos la concentración de ribosa para cuantificar la cantidad de  $F_1$  en todos los experimentos realizados.



**Figura 1.** Espectro de absorbancia del F<sub>1</sub>. El factor de metacéstodos obtenido como se describe en materiales y métodos, tenía para este estudio una concentración de 1 mg peso seco por ml de agua destilada.

No Existe

Página

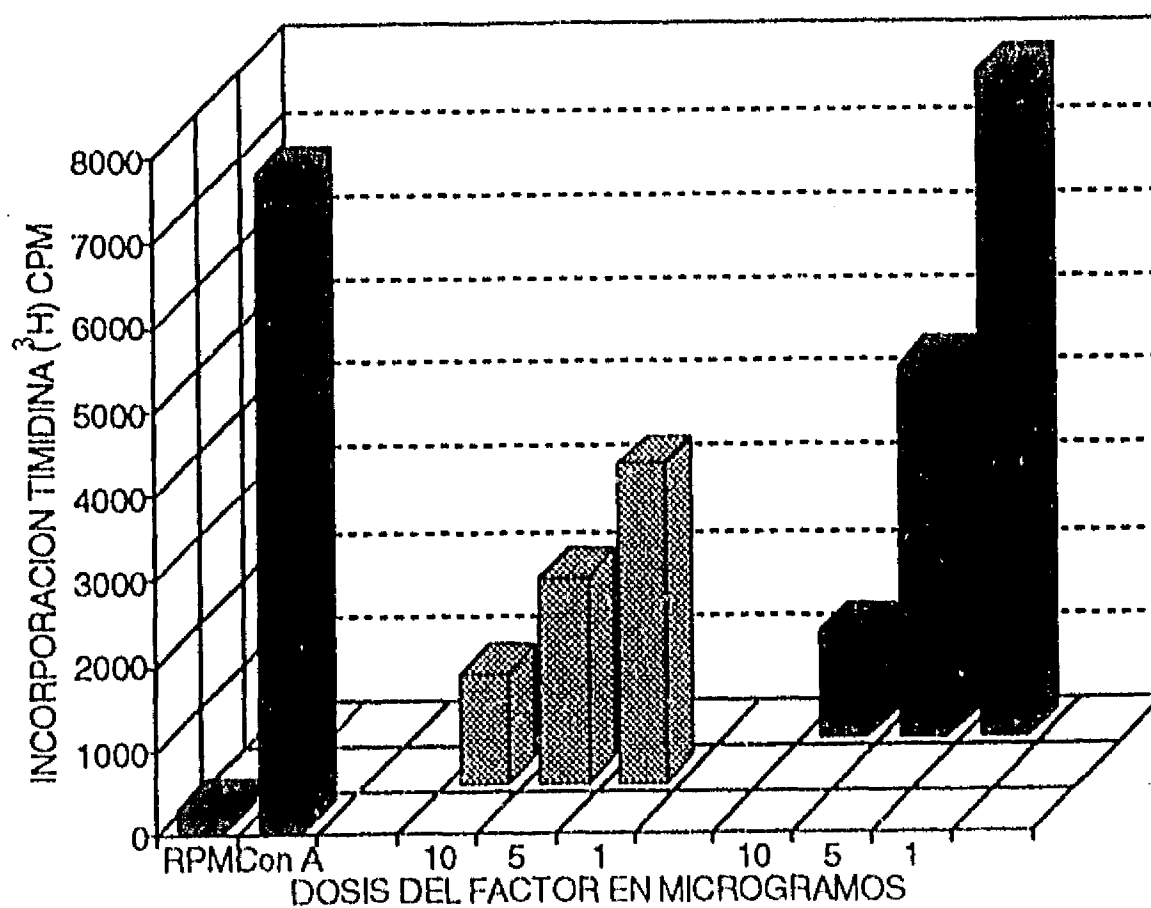
8

### 3. Efecto del $F_1$ en la proliferación de linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina

Con el fin de saber si la sustancia obtenida a partir de los metacéstodos de Taenia solium tenía actividad biológica sobre poblaciones celulares, se realizaron experimentos de transformación blastoide con linfocitos humanos de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina sola o con diferentes concentraciones de  $F_1$  (0.3, 3, o 30  $\mu\text{g}$ ), los resultados se expresan como incorporación de timidina en cpm. Los valores que se obtuvieron en el testigo con RPMI, no aparecen como barra ya que se restaron de los demás valores. Los resultados de estos experimentos, mostraron que el  $F_1$  induce un efecto supresor significativo ( $P < 0.01$  para la dosis de 30  $\mu\text{g}$ ) en la incorporación de timidina tritiada por linfocitos activados por el mitógeno y que esta actividad era dependiente de la dosis. Los resultados de un experimento típico se pueden observar en la Figura 2.

#### 4. Efecto del $F_1$ en la proliferación de células de bazo de ratones Balb/c inducida por Concanavalina A

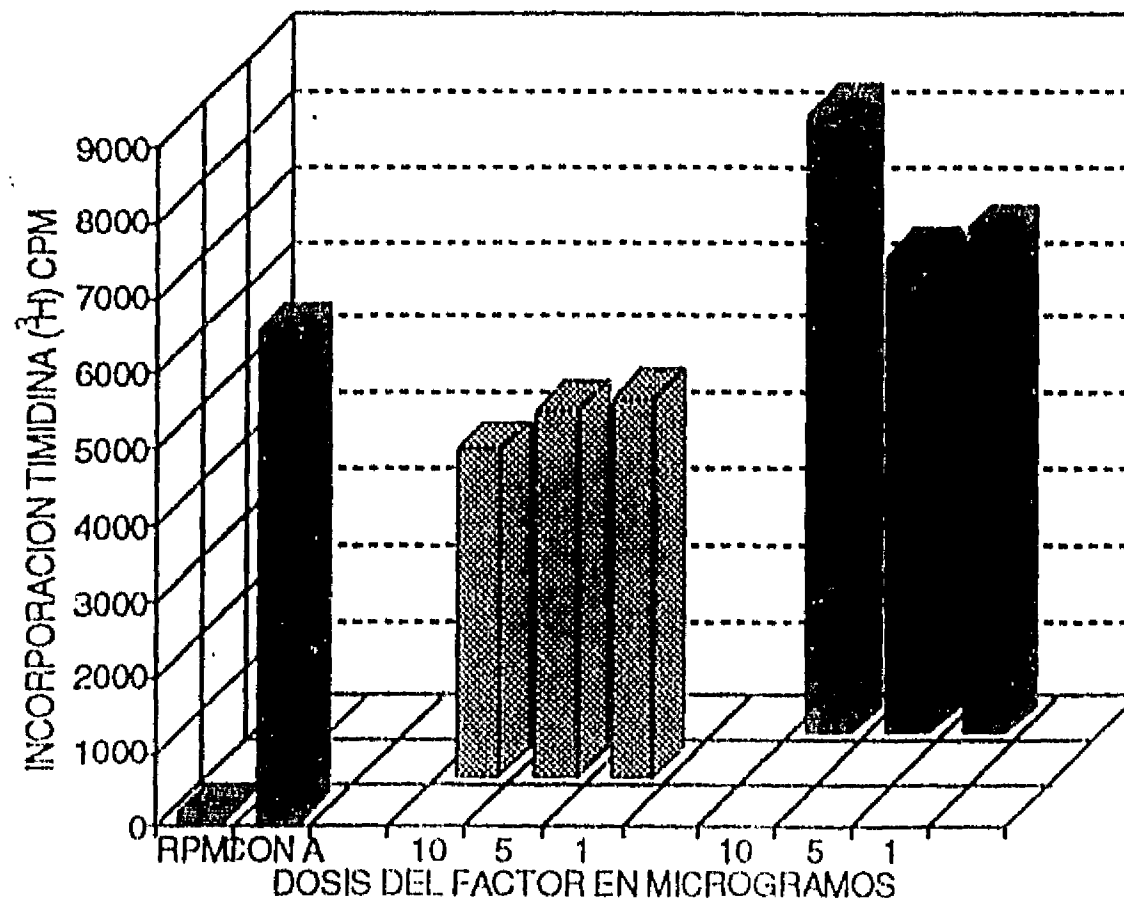
Al probar el efecto de 2 lotes del factor en la proliferación de células de bazo de ratones, se encontró que el  $F_1$  tenía también un efecto supresor significativo ( $P < 0.05$ , dosis 30  $\mu\text{g}$  Lote 4/90) en la incorporación de timidina tritiada en células de bazo de ratones Balb/c como se puede observar en la Figura 3, este efecto fué, como en el caso de linfocitos humanos, dependiente de la dosis.



**Figura 3.** Proliferación de células de bazo de ratones Balb/c inducida por Con A sola o con diferentes concentraciones de  $F_1$ . Testigo (RPMI), linfocitos + Con A (Con A), Lote 2/90 (▨) y Lote 4/90 (■).

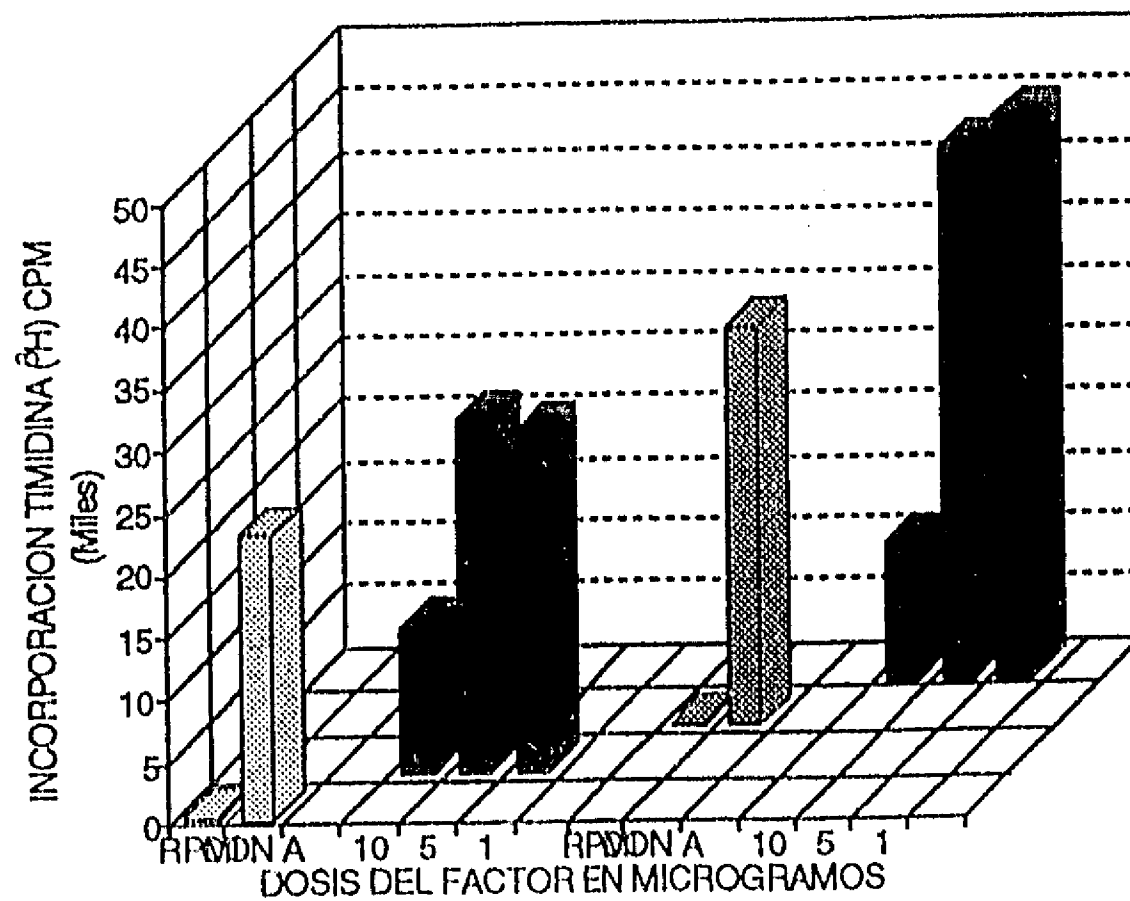
## 5. Cocultivos de macrófagos y linfocitos

Estos experimentos se realizaron para determinar la población afectada por el  $F_1$ , en primer término quisimos saber si los macrófagos tratados con el factor y después cocultivados con linfocitos frescos en presencia de Con A eran capaces de suprimir la respuesta al mitógeno. Se probaron 2 densidades de linfocitos sin tratamiento:  $2.5 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  células por pozo, para determinar cual era la más adecuada. No se encontraron diferencias en los resultados, ya que en ningún caso se observó supresión de la proliferación de linfocitos, como se puede ver en la Figura 4. Los siguientes experimentos se realizaron con la densidad de población más baja.



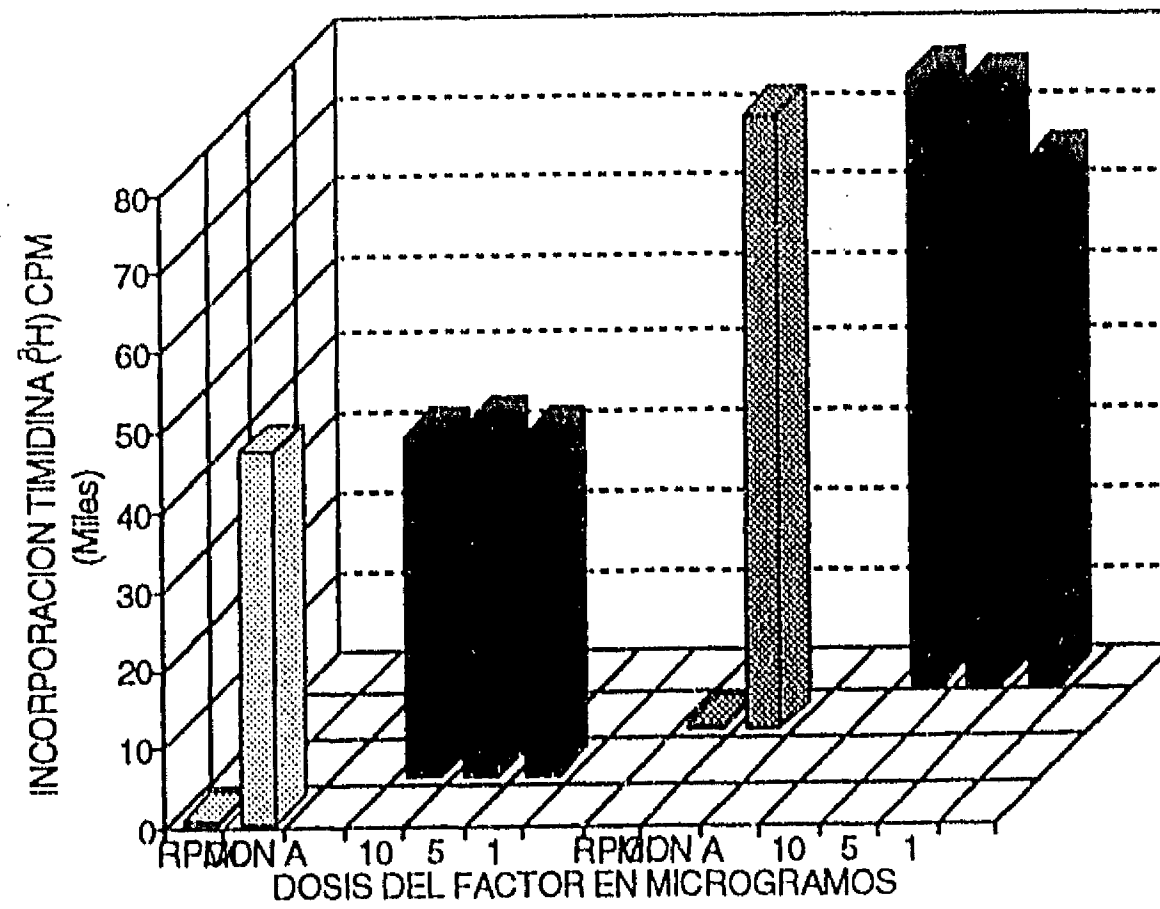
**Figura 4.** Cocultivo de macrófagos tratados con  $F_1$  (Lote 2/91) y linfocitos no tratados de bazo de ratones Balb/c. (▨)  $2.5 \times 10^5$  células por pozo y (■)  $5 \times 10^5$  células por pozo.

Los experimentos de cocultivo de macrófagos tratados con linfocitos sin ningún tratamiento se repitieron utilizando 2 Lotes de F<sub>1</sub> (Lote 4/90 y Lote 2/91) y 2 cepas de ratones Balb/c, la de nuestro laboratorio y la del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Los resultados que se obtuvieron en estos experimentos fueron consistentes con los experimentos anteriores y se muestran en la Figura 5 y 6, donde podemos observar que los macrófagos de las 2 cepas no fueron capaces de inducir supresión de la incorporación de timidina tritiada en los linfocitos estimulados con Con A.



**Figura 5.** Cocultivo de macrófagos tratados con F<sub>1</sub> (Lote 4/90) provenientes de 2 cepas de ratones Balb/c y linfocitos de animales de la misma cepa sin ningún tratamiento. Cepa IFC (▨) y Cepa IIB (■).

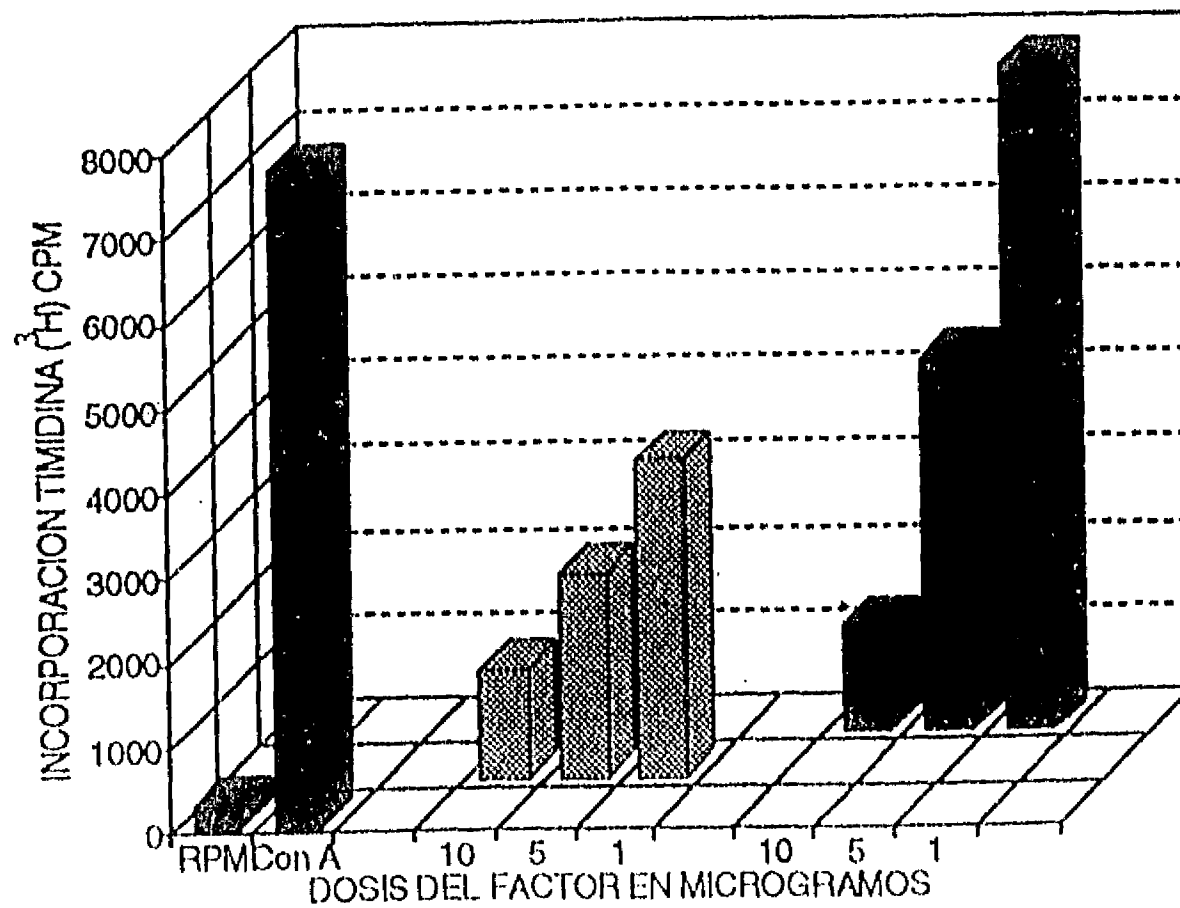




**Figura 6.** Cocultivo de macrófagos tratados con F<sub>1</sub> Lote (2/91) provenientes de 2 cepas de ratones Balb/c y linfocitos de animales de las mismas cepas sin tratamiento alguno. Cepa IFC (▨) y cepa IIB (■).

## 6. Cocultivo de linfocitos

En los cocultivos de linfocitos de bazo de ratones Balb/c tratados con  $F_1$  con linfocitos de animales singénicos que no tenían ningún tratamiento, se observó supresión significativa de la incorporación de timidina tritiada inducida por Con A ( $P < 0.01$ ), en las dosis más altas del lote 4/90 del factor. Los resultados de un experimento típico se pueden observar en la Figura 7.

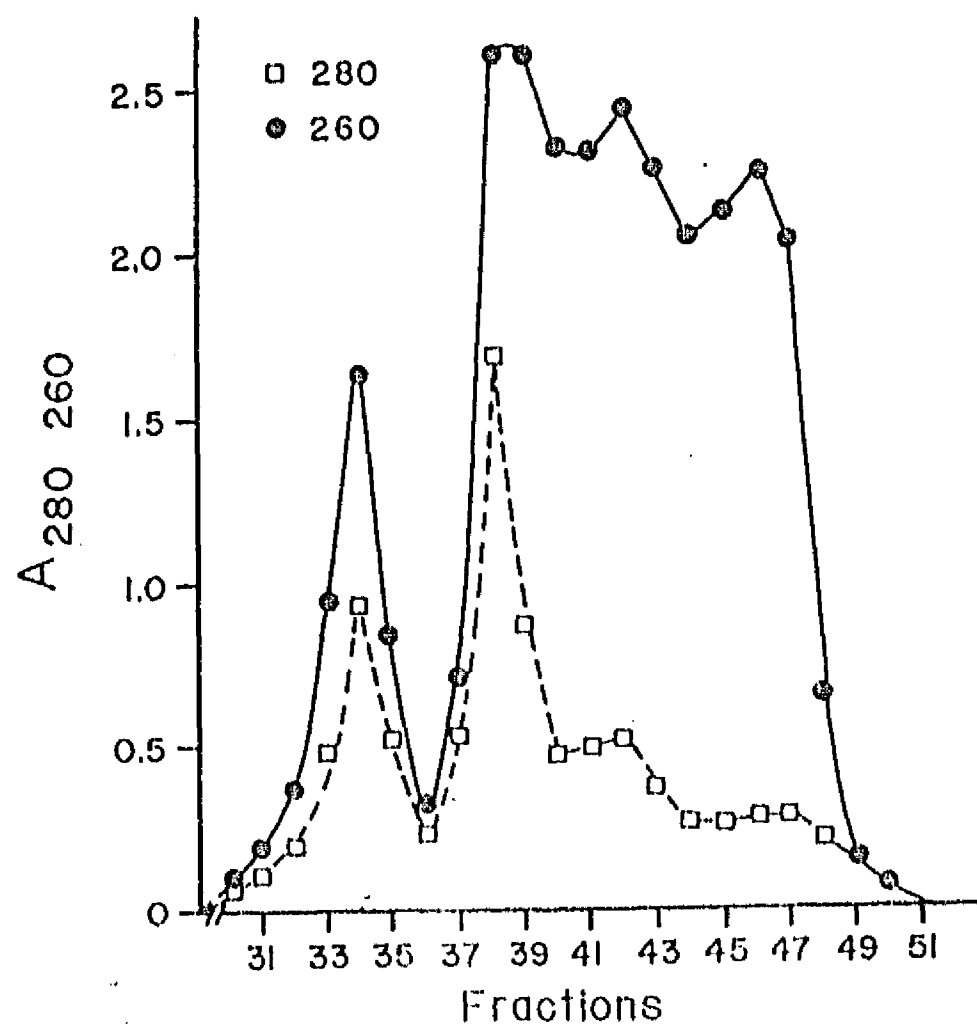


**Figura 7.** Cocultivo de linfocitos de bazo de ratones Balb/c tratados con diferentes concentraciones de 2 lotes de  $F_1$  y linfocitos frescos obtenidos de animales singénicos. ( $P < 0.01$  Lote 4/90, dosis 10 µg). Lote 2/90 (▨), Lote 4/90 (■).

## 7. Naturaleza del factor de metacéstodos

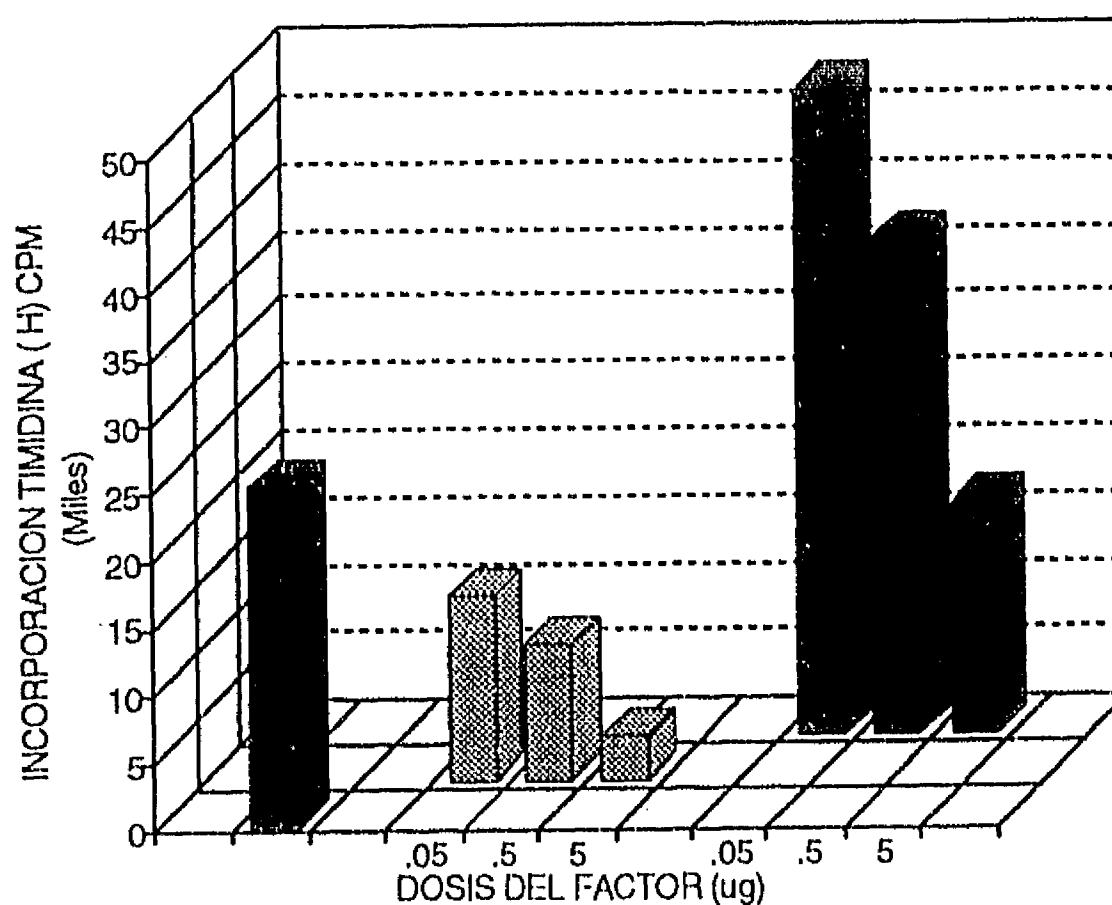
### Cromatografía del F<sub>1</sub> en Bio-gel P 6

Con la intención de conocer si teníamos más de un componente en nuestro material se realizó una ultrafiltración, el perfil de elución obtenido en la cromatografía del F<sub>1</sub> por Bio-gel P 6 se observa en la Figura 9, donde se puede observar que obtuvimos 4 picos, las fracciones fueron leídas a 260 y 280 nm, y en la figura se observan ambos perfiles.



**Figura 9.** Cromatografía de la ultrafiltración del F<sub>1</sub> en una columna de Bio-Gel P 6. Las fracciones se leyeron a 260nm (●) y a 280 nm (□).

Las fracciones 31 a 35 se mezclaron y las 37 a 40 también y se denominaron Pico 1 y Pico 2 respectivamente. El material de los picos se liofilizó y de les determinó su concentración de ribosa. La actividad biológica de los picos se probó en un experimento de transformación blastoide con linfocitos de sangre periférica humana. Los resultados se muestran en la Figura 10, donde se puede observar que la actividad supresora se encontró en el Pico 1.

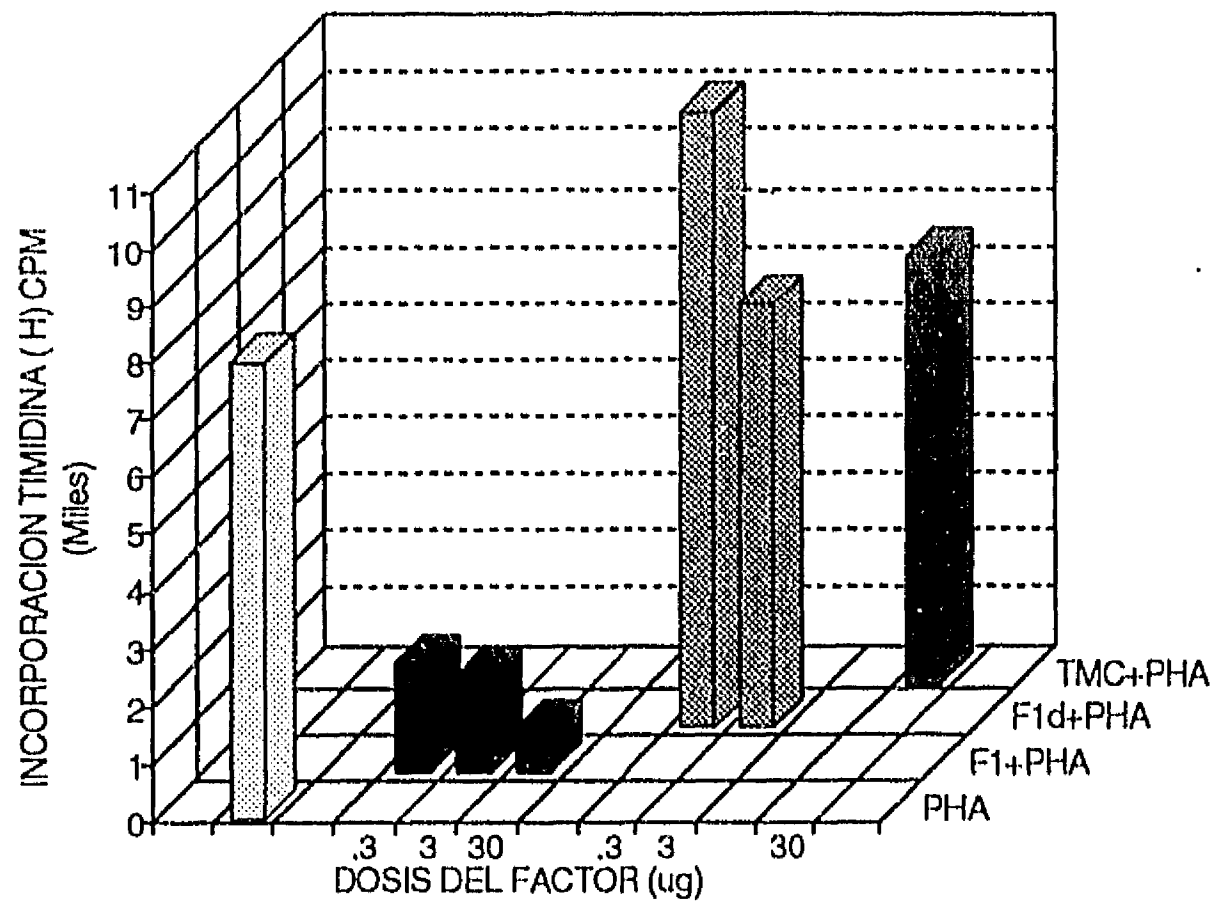


**Figura 10.** Incorporación de timidina tritiada por linfocitos de sangre periférica humana inducida por fitohemaglutinina y tratados con diferentes concentraciones (0.05, 0.5 y 5 µg) de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Bio-gel P 6. La barra sola indica la incorporación de linfocitos + PHA. Barra punteada: Pico 1 y barras oscuras: Pico 2.

### **Efecto de la digestión de F<sub>1</sub> con ARNasa**

Para probar si el ARN era el responsable de la supresión observada en los experimentos de transformación blastoide realizados con linfocitos humanos, el F<sub>1</sub> digerido con ARNasa se probó para ver si la actividad supresora era abrogada. Los resultados se muestran en la Figura 11, donde se puede observar que el F<sub>1</sub> perdió su actividad supresora.

Para determinar si en la fracción de F<sub>1</sub> teníamos contaminación con material proveniente del músculo esquelético de cerdo que estuviera induciendo la supresión, se hizo una preparación en la cual en vez de cisticercos se incubó carne de cerdo no parasitada en trozos pequeños en presencia de agua destilada estéril durante 4 horas, se separó el sobrenadante por filtración, se disminuyó su volumen por liofilización, se dializó contra agua destilada estéril en una membrana Spectrapor que excluye moléculas con pesos moleculares menores de 3.5 Kd, se liofilizó el material y se probó en un experimento de transformación blastoide. En la Figura 11, se puede observar que esta preparación no tuvo efecto sobre la incorporación de timidina tritiada por linfocitos humanos inducida por la fitohemaglutinina, los valores obtenidos son casi iguales a los del testigo que solo tenía el mitógeno.



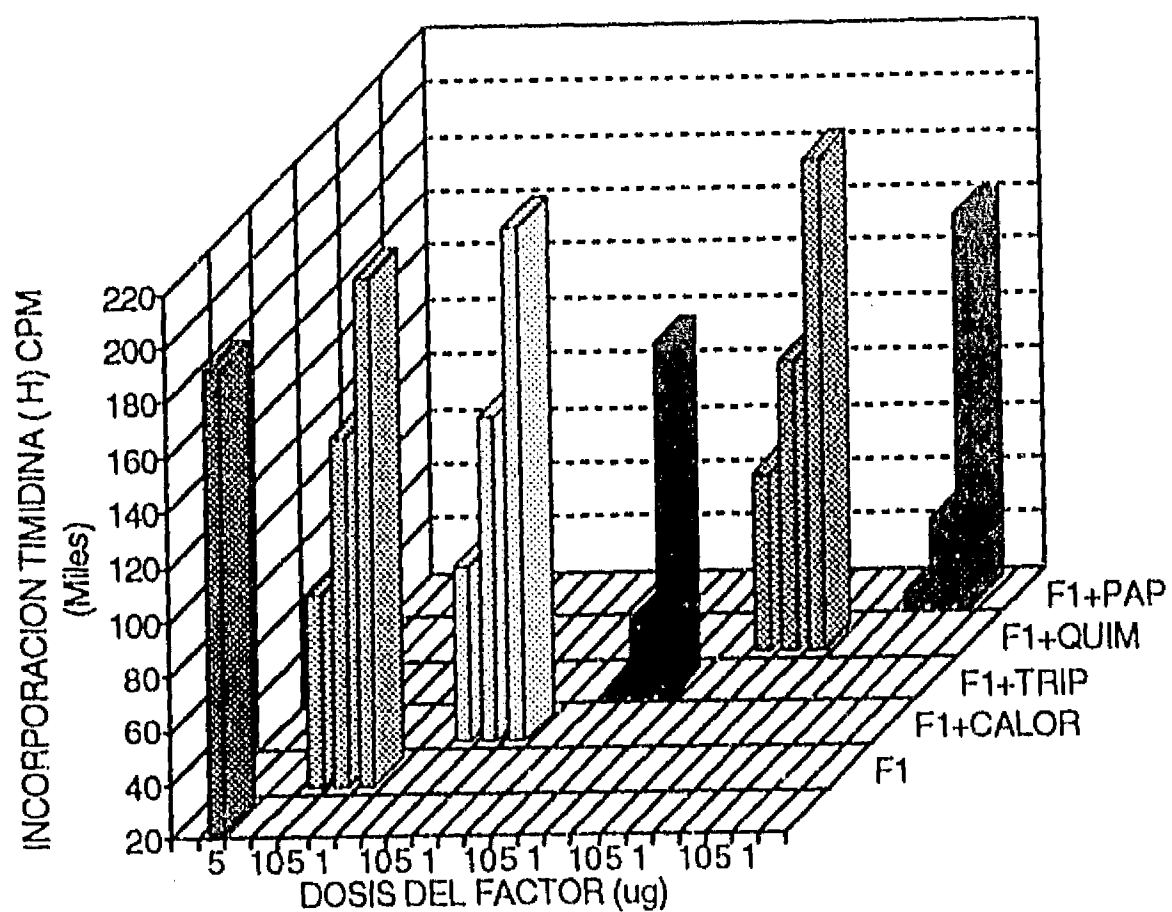
**Figura 11.** Incorporación de timidina tritiada por linfocitos humanos de sangre periférica inducida por fitohemaglutinina y tratados con diferentes concentraciones de F<sub>1</sub> digerido con ARNasa (F<sub>1</sub>d). TMC = extracto de músculo esquelético de cerdo dializado en las mismas condiciones que las secreciones de los metacéstodos. (P<0.01, dosis de 30 µg F<sub>1</sub>).

**Efecto del calor y la digestión con proteinasas y con ARNasa sobre la actividad biológica del F<sub>1</sub>.**

En lo que se refiere a la sensibilidad del factor de cisticercos al calor, observamos que la ebullición por 10 min no fué capaz de eliminar la actividad supresora, como lo muestra la Figura 12, en la cual se puede observar que el valor de la incorporación de timidina fué semejante al observado en el testigo que solo tenía Concanavalina A.

La digestión con proteinasas no tuvo efecto sobre la supresión inducida por el F<sub>1</sub>, es más la digestión del material con tripsina y con papaína mejoraron la respuesta supresora, dando valores de incorporación de timidina tritiada significativamente ( $P < 0.01$ ) más bajos que los observados con el factor sin digerir, con las diferentes dosis probadas. Estos resultados se muestran en la Figura 12.

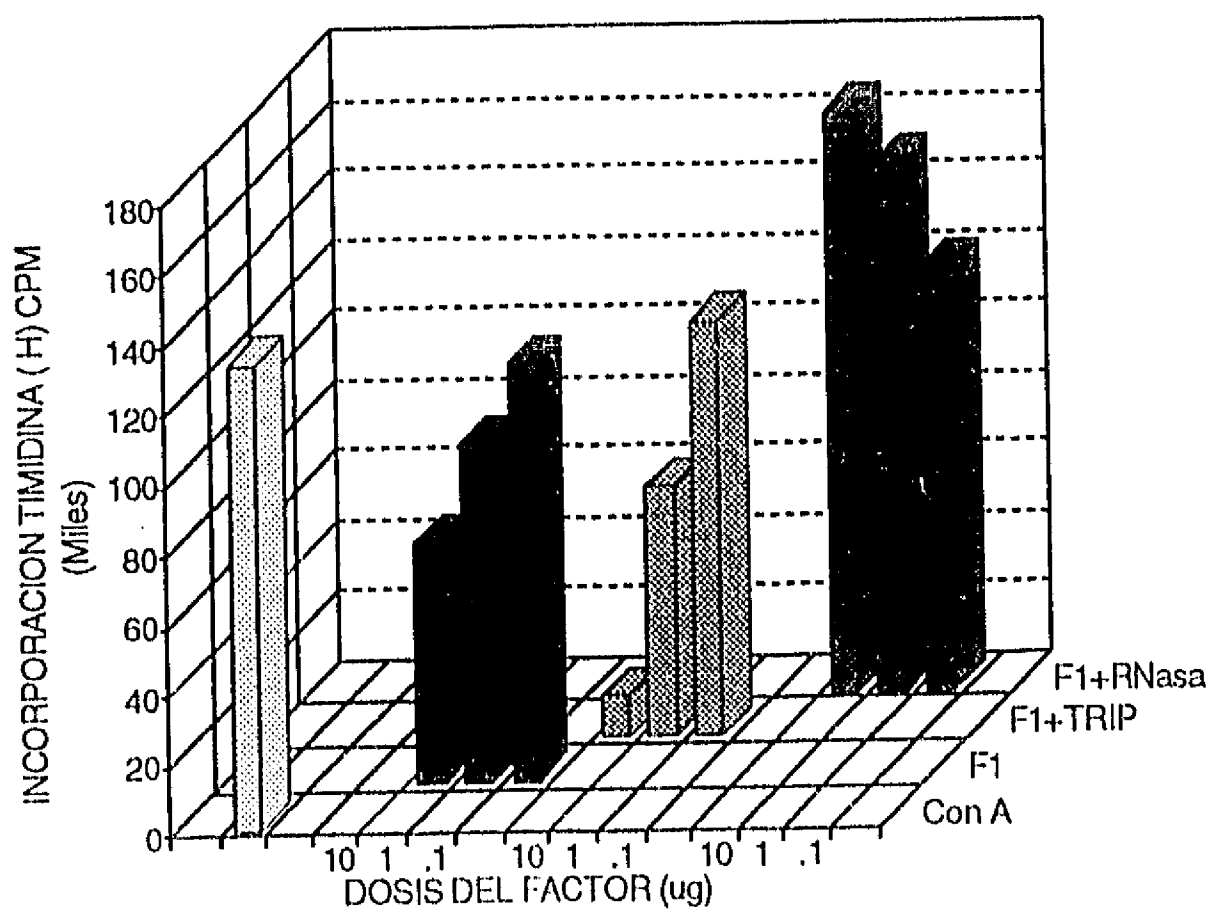
Se incluyeron controles, los cuales eran solo las enzimas tratadas de la misma forma que las mezclas de reacción, estos controles se probaron en cultivos de células de bazo estimulados con Con A y se encontró que dieron lecturas de la incorporación de timidina muy semejantes a las encontradas cuando solo se ponían las células de bazo con el mitógeno.



**Figura 12.** Incorporación de timidina tritiada por células de bazo de ratones Balb/c inducida por Con A en presencia de F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> incubado a ebullición 10 min, F<sub>1</sub> + tripsina\*, F<sub>1</sub> + quimiotripsina o F<sub>1</sub> + papaína\*. (\*P<0.01).



En otro experimento, se probó el F<sub>1</sub> digerido con tripsina o con ARNasa en presencia de inhibidores de proteasas. Cuando el F<sub>1</sub> se trató con tripsina, se observó un aumento del efecto supresor (P<0.01) como se había observado en el experimento anterior mientras que, cuando se trató con ARNasa, se observó que la supresión era abrogada, lo cual confirma que la actividad supresora del factor de metacéstono reside en su fracción de ARN. Los resultados se muestran en la Figura 13.



**Figura 13.** Efecto de la digestión con ARNasa y de la tripsina en la incorporación de timidina tritiada por células de bazo de ratones Balb/c inducida por Con A en presencia de F<sub>1</sub> tratado con tripsina o de F<sub>1</sub> tratado con ARNasa.

### Espectro de Infrarrojo del F<sub>1</sub>

El espectro de infrarrojo del factor mostró que esta sustancia tiene gran cantidad de grupos oxhidrilo, carbonilo y amino, grupos que son compatibles con ácidos nucleicos. El registro del espectro se muestra en la Figura 14, donde el primer pico corresponde a los oxhidrilos, siendo los grupos más abundantes en la muestra, el segundo pico a los aminos y el tercero a los carbonilos.

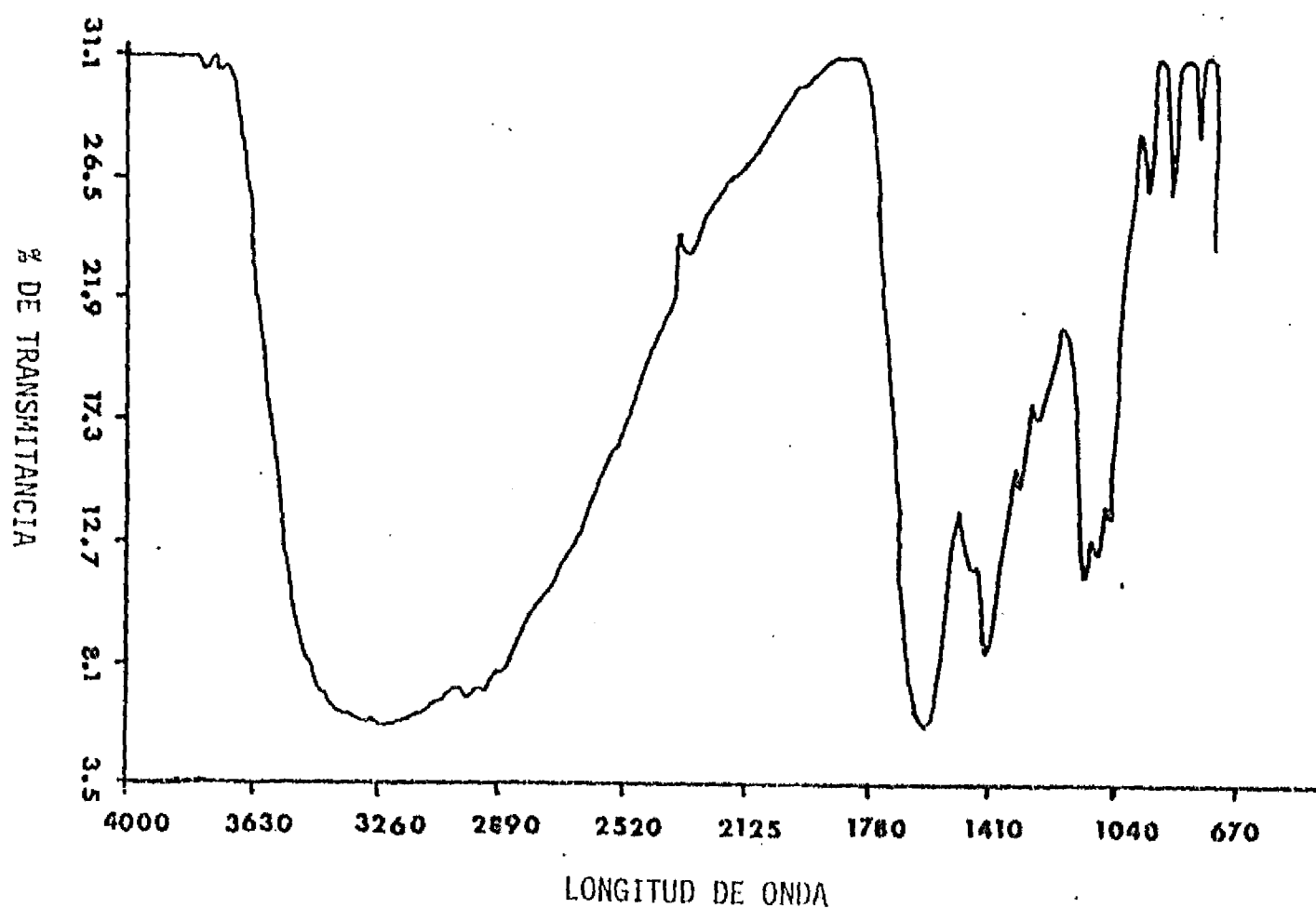


Figura 14. Espectro de infrarrojo.

## DISCUSION

Se ha reportado que algunas sustancias producidas por parásitos tienen la capacidad de inducir supresión de la respuesta inmune tanto hacia antígenos relacionados como no relacionados (Dessaint y cols., 1977; Yin Foo y cols., 1983 Burger y cols., 1986; Srour y cols., 1989 y Molinari y cols., 1989). En este trabajo probamos un factor de bajo peso molecular producido por metacéstodos de Taenia solium que induce un efecto depresor de la incorporación de timidina tanto en linfocitos humanos como en linfocitos de bazo de ratón estimulados con PHA y Con A respectivamente. Este efecto se observó que es dependiente de la dosis.

Los resultados obtenidos del espectro de absorción del F<sub>1</sub> que mostraron un pico de absorbancia de los 249nm, la presencia de ribosa determinada por análisis bioquímicos y la susceptibilidad de este material a la ARNasa en presencia de inhibidores de proteasas, sugieren que el factor del metacéstodo de Taenia solium, con el que estamos trabajando, es un oligonucleótido de ARN. Los resultados obtenidos en el análisis de infrarrojo apoyan esta idea ya que el factor presenta abundancia de oxhidrilos, carbonilos y aminos, grupos que se presentan en las moléculas que constituyen los oligonucleótidos. Sin embargo, para conocer la estructura química sería necesario realizar un estudio de difracción de rayos X, por lo que se tendría que purificar F<sub>1</sub> para poder realizar este estudio. Por otro lado, el hecho de que este factor se salga de una membrana

de diálisis que excluye moléculas con pesos moleculares menores de 3.5 Kd y que este material pueda ser cromatografiado en un Bio-gel P-6 que excluye moléculas mayores de 6 Kd, nos sugiere que el F<sub>1</sub> debe tener un peso molecular menor de 3.5 Kd. El peso molecular aproximado estimado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS es de 2.9 Kd.

El hecho de que polirribonucleótidos puedan inducir supresión, es similar a lo reportado por Odean y cols. (1991), en un trabajo en el que indujeron supresión de la síntesis de anticuerpos en ratones con polirribonucleótidos sintéticos (poly A:poly U y poly A:poly C) inoculados en ratones 1-6 días antes del estímulo antigénico. Se encontró que células adherentes estaban implicadas en la supresión. Cuando probaron los sobrenadantes de estas células tratadas con poly A:poly U encontraron que contenían gran cantidad de prostaglandina E y que inducían un decremento significativo en la producción de anticuerpos cuando eran adicionados a cultivos de células de bazo in vitro.

La depresión en la incorporación de timidina tritiada, observada tanto en linfocitos humanos como en células de bazo de ratón, sugieren que la producción de esta sustancia por los metacéstodos de Taenia solium pudiera modular la respuesta inmune del cerdo hacia el parásito, permitiendo así su permanencia en el huésped por largos periodos. Estos resultados son consistentes con la inhibición de la proliferación de linfocitos por factores producidos por S. mansoni reportada por Dessaint y cols. (1977)

y por la supresión de blastogenesis de linfocitos de bovinos inducida por Con A y de humanos inducida por PHA por factores de bajo peso molecular producidos in vitro por microfilarias de Onchocerca gibsoni (Yin Foo y cols., 1983). También productos de excreción y secreción de Anisakis simplex y Terranova sp. han mostrado ser inhibidores potentes de transformación blastoide de linfocitos de roedores inducida tanto por Con A como por lipopolisacárido (Raybourne y cols., 1983). Letonja y cols. (1987) sugieren que productos similares producidos por Taenia taeniaeformis pudieran ser los responsables del decremento de la habilidad de las células de bazo de ratones susceptibles C3H/He infectados para responder a la Con A.

Se observó que el F<sub>1</sub> mientras más reciente sea, produce una depresión de las respuestas proliferativas inducidas por mitógenos mayor y que su potencia va disminuyendo conforme pasa el tiempo, esto se puede observar en los resultados de los experimentos donde probamos diferentes lotes y también ha sido reportado en los experimentos que se han realizado de su actividad biológica in vivo (Molinari y cols., 1989). Esta disminución en la potencia podría probablemente deberse a degradación del material.

La idea de la modulación de la respuesta inmune por sustancias excretadas por helmintos ha sido apoyada con gran cantidad de datos experimentales. Leid y cols. (1984) y Suquet y cols. (1984) encontraron una sustancia producida por Taenia taeniaeformis (un inhibidor de proteínasa) que tiene un peso

molecular de 19.5 Kd por electroforesis y de 9.5 Kd por cromatografía y que es capaz de suprimir la proliferación de esplenocitos de rata inducida por mitógeno. Burger y cols. (1986) probaron un producto secretado in vitro por T. taeniaeformis, que contiene glucosaminoglicano, que induce inhibición de la proliferación inducida por Fitohemaglutinina y Concanavalina "A" en esplenocitos de ratas normales y que inhibe la producción de interleucina 2 (IL-2), estos investigadores sugieren que esta sustancia induce una población de células supresoras que pudieran estar inhibiendo la producción de IL-2, la cual pudiera conducir a la inhibición de la diferenciación y proliferación de linfocitos T citotóxicos específicos, los cuales pudieran participar en la respuesta inmune contra el metacéstodo de este parásito.

En los cocultivos, encontramos consistentemente que las células responsables de la depresión de la incorporación de timidina tritiada inducida por Con A en células normales de bazo de ratones singénicos eran los linfocitos, ya que en los cocultivos de células adherentes tratadas con F<sub>1</sub> y linfocitos depletados de células adherentes no se observó depresión de la respuesta a la Con A, mientras que, cuando se cocultivaron linfocitos depletados de células adherentes con linfocitos normales, se encontró supresión de las respuestas proliferativas inducidas por la Con A. Estos resultados son apoyados por los reportados por Letonja y cols. (1987), quienes reportaron evidencias de que la falta de respuesta de linfocitos de bazo de

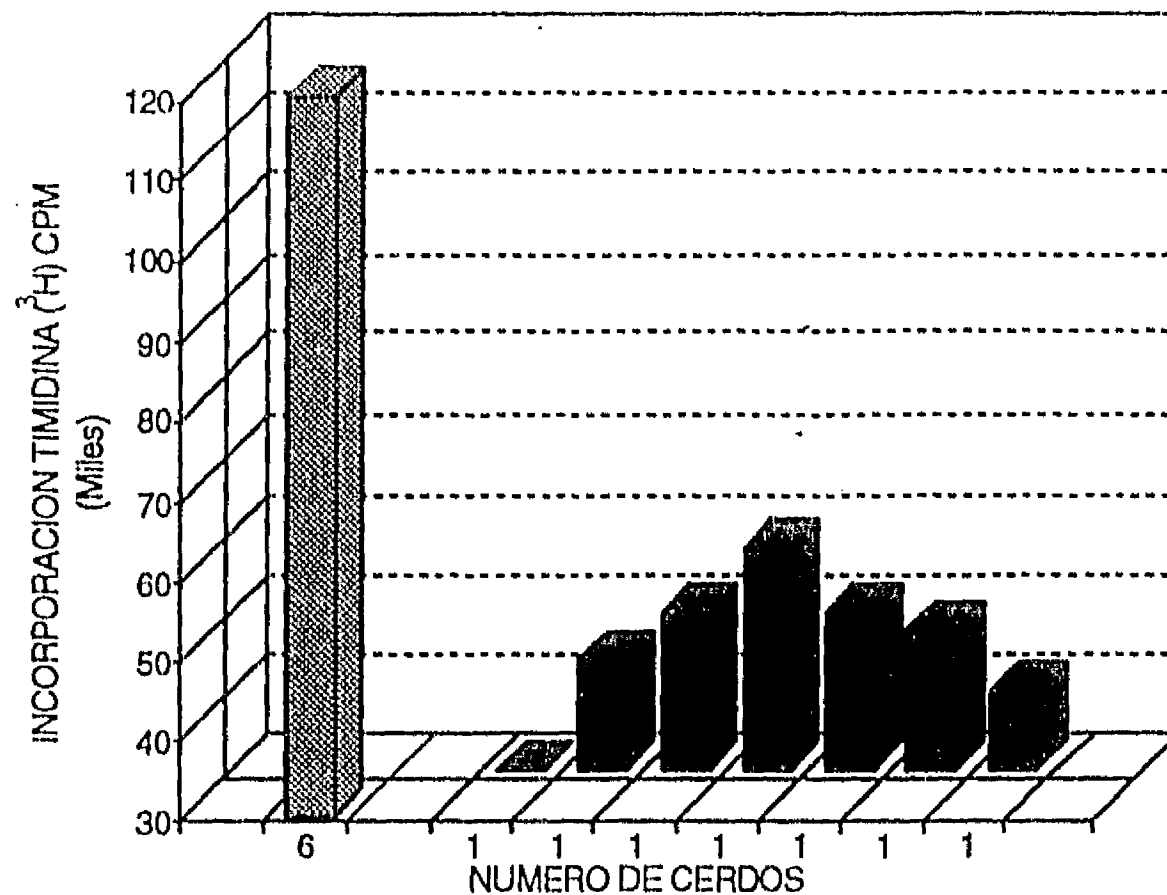
animales infectados con metacéstodos de Taenia taeniaeformis a un mitógeno de células T, se debe a una población de células no adherentes. Más aún, Baltar y cols. (1991) reportaron que ratones infectados con larvas enquistadas de Trichinella spiralis mostraban respuestas inmunes deprimidas a antígenos del parásito; en experimentos de transferencia adoptiva de células usando ratones receptores letalmente irradiados, ellos encontraron que la función de los linfocitos se encontraba alterada en los animales infectados, pero que esta alteración no era permanente. Estos investigadores sostienen la hipótesis de que esta depresión específica de antígeno es debida a un agente soluble producido por Trichinella, y la apoyan con experimentos en los que la depresión puede ser inducida en ratones no infectados por la inyección de suero de ratones infectados. Por otro lado, Kizaki y cols. (1991) encontraron que las respuestas proliferativas y la producción de IL-2 inducida por Con A en células de bazo de ratones Balb/c fueron significativamente deprimidas en estados tempranos de la infección con protoescolices de Echinococcus multilocularis. Por análisis de citometría de flujo encontraron incrementadas las células CD8<sup>du11</sup> (células supresoras, citotóxicas) en ratones infectados, la adición de estas células a células de bazo normales resultó en una marcada supresión de las respuestas a Con A.

En este trabajo, se realizaron también experimentos de transformación blastoide con linfocitos de sangre periférica, separados por Histopaque, como se ha descrito en materiales y

métodos, de cerdos masivamente parasitados con metacéstodos de T. solium con la finalidad de conocer si los animales cisticercosos estaban inmunodeprimidos. Se incluyeron experimentos con linfocitos de sangre periférica de 6 cerdos sanos.

Los experimentos nos mostraron que los linfocitos de cerdos parasitados presentan respuestas deprimidas de la incorporación de timidina tritiada inducida por Con A en comparación con los linfocitos de sangre periférica de animales normales. Observamos también que la supresión era dependiente de la carga parasitaria, es decir, a mayor carga parasitaria mayor supresión. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 15, donde la primera barra es el promedio de la incorporación de timidina tritiada de los linfocitos de cerdos normales, mientras que los cerdos cisticercosos están expresados individualmente.

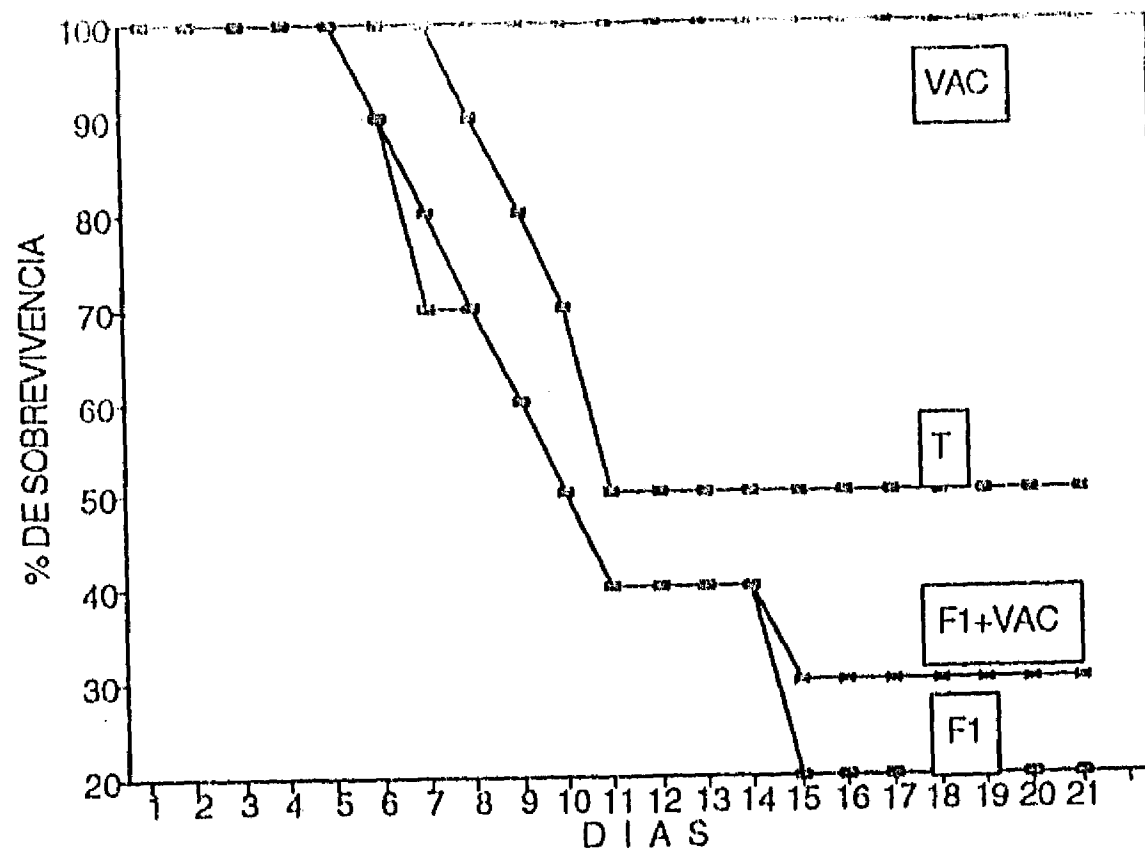




**Figura 15.** Proliferación de linfocitos de sangre periférica de cerdos parasitados con metacéstodos de Taenia solium y de cerdos sanos inducida por Con A. Las barras negras corresponden a los cerdos cisticercosos, mientras que la barra punteada es el promedio de la incorporación de timidina tritiada de 6 cerdos controles.

Estos resultados son congruentes con lo descrito en reportes previos donde observamos que cerdos naturalmente parasitados con metacéstodos de Taenia solium tienen porcentajes de células T por debajo de los valores normales y que ese decremento es inverso a la intensidad de la carga parasitaria (Molinari y cols., 1987 y Tate y cols., 1987).

El estado de inmunosupresión que encontramos in vivo en los cerdos puede ser en parte debido a la presencia del factor de cisticercos que reportamos en este trabajo, ya que, en experimentos previos realizados en nuestro laboratorio, encontramos que al inocular ratones con vacuna tifoídica y F<sub>1</sub> previamente al desafío con Salmonella typhimurium, se alteraba la respuesta inmune hacia los antígenos de la Salmonella. Más aún, los animales que solo habían sido inoculados con F<sub>1</sub>, presentaban mayor mortalidad que los animales testigos. Estos resultados se pueden observar en la siguiente gráfica, donde se ve que los animales inmunizados con 2 dosis de 40 µg cada una de vacuna tifoídica tuvieron una sobrevida del 100%, mientras que los animales inmunizados e inoculados con 2 dosis de 100 µg cada una de F<sub>1</sub>, tuvieron una sobrevida del 30%. También podemos observar que los animales testigo tuvieron una sobrevida del 50%, en comparación con los animales que antes de la infección fueron inoculados con 2 dosis de 100 µg de F<sub>1</sub> cada una y que tuvieron una sobrevida del 20%.



Molinari, J.L., y cols., Rev. Lat-amer. Microbiol. 31:327-333, 1989.

El mecanismo por el cual los linfocitos tratados con el factor obtenido de metacéstodos de Taenia solium inducen supresión sobre otras células pudieran ser de diferentes tipos: a través de mediadores solubles o bien produciendo alteraciones cromosómicas en las células.

El papel de las citocinas en la regulación de la respuesta inmune en parasitosis está bien documentado. En infecciones por Trypanosoma cruzi, el estudio se ha centrado en la IL-2 no solo por ser un factor de crecimiento de células T sino también debido a que su producción es severamente suprimida

suprimen la expresión de receptores para IL-2 de alta afinidad en células humanas, cuando éstas son cocultivadas in vitro con el parásito y activadas por PHA (Kierszenbaum y cols., 1989 y 1991 y Beltz y cols., 1989). Sin embargo, en experimentos de infección in vivo, Pakianathan y Kuhn (1992) no han encontrado diferencias significativas en el porcentaje de células que expresan receptores para IL-2, ni que las células T presenten supresión en su habilidad para expresar receptores para IL-2, lo que encontraron en el suero de los ratones infectados con T. cruzi fueron niveles incrementados de receptores para IL-2 solubles. A nivel celular, las células T CD8<sup>+</sup> tienen la principal influencia en la producción de IL-2 en este sistema (Tarleton, 1990). Todos estos investigadores sugieren que la participación de la IL-2 y de la expresión de sus receptores puede ser importante en la inmunosupresión observada en enfermedad de Chagas aguda y en la enfermedad del sueño. Para investigar sí, en nuestro modelo, el factor está afectando la producción de IL-2 tendríamos al menos que probar los sobrenadantes de la incubación de linfocitos con el F<sub>1</sub> para buscar la actividad de esta interleucina, así como determinar su presencia en los sobrenadantes.

Parece ser que en infecciones por helmintos y protozoarios las células CD4<sup>+</sup> llevan a cabo la mayoría de las funciones regulatorias, aunque también participan en las efectoras. La reciente subdivisión de las células CD4<sup>+</sup> en 2 subpoblaciones Th1 y Th2 de acuerdo a las diferencias en la

expresión de citocinas ha sentado bases importantes para el entendimiento de las múltiples funciones de estas células (Sher y Coffman, 1992). Hay evidencia substancial que apoya que las respuestas de resistencia o cronicidad de ratones Balb/c infectados con Leishmania major representan el desarrollo de respuestas de Th1 y Th2 respectivamente. Por ejemplo, los linfocitos CD4<sup>+</sup> de ratones Balb/c con infección crónica por Leishmania contienen niveles significativos de ARNm para IL-4 (Th2) pero poco ARNm para interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ) (Th1), mientras que células de ratones infectados de una cepa resistente (C57/BL6) o Balb/c tratados con anti-CD4<sup>+</sup> contienen niveles más altos de ARNm para IFN- $\tau$  pero no ARNm para IL-4 (Heinzel y cols., 1989, 1991). Los tipos de respuestas inmunes prominentes en los ratones infectados que se curan y los que no, apoyan esta conclusión; los animales que controlan su infección tienen fuertes respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado y pobres respuestas de anticuerpos (Liew, 1989), mientras que los que desarrollan enfermedad crónica, tienen fuertes respuestas de anticuerpos y niveles muy altos de IgE (Heinzel y cols., 1989), pero no hay respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado (Liew, 1989). Entonces, parece existir una regulación cruzada de las subpoblaciones mediante sus citocinas, ya que los ratones que eliminan la infección tienen una fuerte respuesta de células Th1 y los que presentan enfermedad crónica tienen una fuerte respuesta de células Th2; de tal forma que los macrófagos que son capaces de matar a las leishmanias son estimulados más

efectivamente por interferón  $\tau$  in vivo e in vitro, mientras que IL-3 e IL-4 pueden inhibir esta activación y la IL-10 inclusive puede ser un inhibidor de la producción de IFN- $\tau$  por las células Th1 (Sher y Coffman, 1992).

En infecciones de ratones con helmintos como S. mansoni o Nippostrongilus brasiliensis, también se ha observado esta diferencia en la producción de citocinas por las subpoblaciones de células T cooperadoras. Estudios realizados en ratones infectados con estos helmintos, para ver la respuesta de citocinas de sus células CD4<sup>+</sup> han revelado que hay altos niveles de IL-4, IL-5 e IL-10 en ausencia de producción apreciable de IL-2 e IFN- $\tau$ . Proporciones similares de citocinas se han observado cuando las mismas células son estimuladas con mitógenos, lo cual sugiere que hay una alteración generalizada en la función de los linfocitos en los animales infectados (Finkelman y cols., 1991).

Es posible que los parásitos modulen mediante sus secreciones la diferenciación o la función de las células T, en este sentido, Olsson y cols. (1992) han reportado que Trypanosoma brucei libera una molécula difusible que induce a las células CD8<sup>+</sup> a producir IFN- $\tau$  y sugieren que esta citocina pudiera modular eventos en la respuesta inmune del hospedero.

Por otro lado, Sztein and Kierszenbaum (1991) han reportado un factor soluble, no dializable obtenido de Trypanosoma brucei rhodesiense que suprime la linfoproliferación y la expresión del receptor para IL-2, encontraron que este factor evita la progresión de linfocitos humanos activados a

través del ciclo celular, sugiriendo que esta alteración de los linfocitos inducida por el parásito pudiera estar asociada con la inmunosupresión observada en pacientes con enfermedad del sueño.

En un estudio diseñado para evaluar la genotoxicidad de una droga usada para el tratamiento de cisticercosis, Flisser y cols. (1990) observaron la presencia de daño genético (poliploidia y rompimientos de cromosomas) en linfocitos cultivados de pacientes y de cerdos cisticercosos, así como un decremento en la proliferación de los linfocitos humanos. Los autores sugieren que la parasitosis está promoviendo daño genético en los linfocitos del hospedero, lo cual en parte podría explicar el retardo en la proliferación de los linfocitos observada en pacientes con cisticercosis. En experimentos realizados en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, se ha observado que el factor de metacéstodo que en esta tesis se reporta ha transformado fibroblastos de embrión de hamster sirio en cultivo (Herrera y cols., 1993, datos no publicados), lo cual sugiere que el parásito pudiera estar produciendo inestabilidad genética en las células del hospedero a través de productos de secreción, lo que pudiera resultar en efectos de inmunosupresión y de transformación maligna de las células blanco. De hecho se ha sugerido una posible correlación entre cisticercosis y cancer, ya que en un estudio realizado en el Instituto Nacional de Pediatría en México, Ridaura (1987) encontró que en autopsias realizadas a 18 niños con neurocisticercosis, el 22% había desarrollado leucemias o linfomas. Más aún, Villagran y Olvera (1988) en un

estudio realizado en el Hospital General de México, reportaron que en 481 autopsias de casos de cisticercosis, el 20.9% estaba asociado con neoplasmas malignos. No es sorprendente que oligonucleótidos de ARN puedan transformar células de embrión de hamster en cultivo, ya que Hamada y cols. (1989) y Hamada y Mizuno, (1992) han observado transformación y formación de aberraciones cromosómicas en células de roedores inducidas por moléculas de ARN pequeñas in vitro.

Para saber a nivel molecular, los efectos que el factor de metacéstodo de Taenia solium ejerce sobre los linfocitos es necesario en primer lugar hacer un estudio sobre las poblaciones de linfocitos en que actúa y si induce producción de linfocinas que pudieran estar modulando la respuesta del hospedero. Es necesario también investigar, si este factor es responsable de la inmunosupresión observada in vivo y del daño genético observado en linfocitos de animales infectados. Por lo que conocemos hasta ahora, el factor es un buen candidato como participante en la modulación de la respuesta inmune del hospedero hacia el parásito.



## VII. CONCLUSIONES

a) Se observó que el factor del metacéstodo de Taenia solium tiene la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos tanto humanos como de ratones Balb/c.

b) Se observó que la célula que participa en la supresión inducida por el F<sub>1</sub> es el linfocito.

c) Todas las evidencias que se encontraron en este trabajo apoyan la idea de que el F<sub>1</sub> es una ARN pequeño.

#### VII. BIBLIOGRAPHIA

- Alves, M.J., Abuin, G., Kuwajima, V.Y., and Colli, W. (1986) Partial Inhibition of trypomastigote entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of Trypanosoma cruzi. *Molecular Biochem. Parasitol.* **21**:75-82.
- Ashwell, G. (1957) Colorimetric analysis of sugars. In: "Methods in Enzymology" Vol. 3, Eds. S. Colowick and N. Kaplan, pp. 87-90, Academic Press, New York.
- Attallah, A.M., Smith, A.H., Murrell, K.D., Fleischer, T., Woody, J., Vannier, W.E., Scher, I., Ahmed, A., and Sell, K.W. (1979) Characterization of the immunosuppressive state during Schistosoma mansoni infection. *The Journal of Immunology* **122**:1413-1420.
- Auriault, C., Joseph, M., Dessaint, J.P., and Capron, A. (1980) Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by schistosomula larvae proteases. *Immunology Letters* **2**:135-139.
- Auriault, C., Pestel, J., Joseph, M., Dessaint, J.P., and Capron, A. (1981a) Interaction between macrophage and Schistosoma mansoni schistosomula: role of IgG peptides and aggregates on the modulation of  $\beta$ -glucuronidase release and cytotoxicity against schistosomula. *Cellular Immunology* **62**:15-27.
- Auriault, C., Ouaiissi, M.A., Torpier, G., Eisen, H., and Capron, A. (1981b) Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of Schistosoma mansoni schistosomula. *Parasite Immunology* **3**:33-44.
- Beltz, L.A., Kierszenbaum, F., and Sztein, M.B. (1989) Selective suppression effects of Trypanosoma cruzi on activated human lymphocytes. *Infection and Immunity* **57**:2301-2305.
- Bout, D., Joseph, M., David, J.R., and Capron, A. (1981) in vitro killing of Schistosoma mansoni schistosomula by lymphokine activated mouse macrophages. *The Journal of Immunology* **127**:1-10.
- Boyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation* **21**:77-89.
- Brenner, Z. (1980) Immunity to Trypanosoma cruzi, *Advances in Parasitology* 247-292.
- Burger, C.J., Rikihisa, Y., and Lin, Y.C. (1986) Taenia taeniaeformis: Inhibition of mitogen induced proliferation and

interleukin-2 production in rat splenocytes by larval in vitro product. *Experimental Parasitology* **62**:216-222.

- Butterworth, A.E. (1984) Cell-mediated damage to helminths. *Advances in Parasitology*, **23**:143-235.

- Camp, C.J., and Leid, W.R. (1982) Chemokinetic factors obtained from larval stage of the cestode Taenia taenaeiformis. *Parasite Immunology* **4**:373-381.

- Cañedo, L., Laclette, J.P., and Morales, E. (1982) Evagination of the metacestode of Taenia solium. In: "Cisticercosis: Present Stage of Knowledge and Perspectives", Eds. A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, and C. Larralde, pp. 363-373, Academic Press, New York.

- Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Ouma, J.H., and Butterworth, A. (1987) Immunity to Schistosomes: Progress toward vaccine. *Science* **238**:1065-1072.

- Clayton, C.E., Sacks, D.L., Ogilvie, B.M., and Askonas, B. (1979) Membrane fraction of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effects of living parasites on the host. *Parasite Immunology* **1**:241-249.

- Colley, D.G. (1973) Eosinophils and immune mechanisms I. Eosinophil stimulation promoter (ESP): A lymphokine induced by specific antigen or phytohemagglutinin. *The Journal of Immunology* **110**:1419.

- Cottrell, B.J., Sturrock, R.F., and Vanhoegaerden, J.M. (1980) An immunosuppressive factor in the serum of baboons (Papio anubis) infected with Schistosoma mansoni. *Immunology* **39**:589-598.

- Cox, H.W., and Hayes, M.M. (1985) Reversal of immunosuppression induced with plasma of malarious rats by supplemented complement. *The Journal of Parasitology* **71**:50-55.

- Dhaliwal, J.S., Liew, F.Y., and Cox, F.E. (1985) Specific suppressor T cells for delayed-type hypersensitivity in susceptible mice immunized against cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* **49**:417-423.

- Dessaint, J.P., Camus, E., Fischer, E., and Capron, A. (1977) Inhibition of lymphocyte proliferation by factor (s) produced by Schistosoma mansoni. *European Journal of Immunology* **7**:624-629.

- Feldmeir, H., Gastl, G.A., Pongensee, U., Kortmann, c., Defallas, A.A., and Peter, H.H. (1985) Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human schistosomiasis. I. Lymphocyte subpopulations and specific

antibody responses. *Clinical and Experimental Immunology* **60**: 225-233.

- Finkelman, F.D., Pearce, E.J., Urban, J.F., and Sher, A. (1991) Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. In: *Immunoparasitology Today*. Eds. C. Ash, R.B. Gallagher, pp. A62-A66, Cambridge, Elsevier Trends.

- Flisser, A., González, D., Plancarte, A., Ostrosky, P., Montero, R., Stephano, A., and Correa, D. (1990) Praziquantel treatment of brain and muscle porcine Taenia solium cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitology Research* **76**:640-642.

- Fortier, A.H., Meltzer, M.S., and Nacy, C.A. (1984) Susceptibility of inbred mice to Leishmania tropica infection: Genetic control of the development of cutaneous lesions in P/J mice. *The Journal of Immunology* **133**:454-462.

- Goddeeris, B.M., Morrison, W.I., Teale, A.J., Bensaïd, A., and Balwin, C.L. (1986) Bovine cytotoxic T-cell clones specific for cells infected with the protozoan parasite Theileria parva: Parasite strain specificity and class I major histocompatibility complex restriction. *Proceedings of the National Academic Science* **83**:5238-5242.

- Goldring, O.L., Sher, A., Smithers, S.R., and McLaren, D.J. (1977) Host antigens and parasite antigens of murine Schistosoma mansoni. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **71**:144-148.

- Good, A.H., and Miller, K.L. (1976) Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with Taenia crassiceps larvae. *Infection and Immunity* **14**:449-456.

- Hamada, K., Kumazaki, T., Mizuno, K., and Yokoro, K. (1989) A small nuclear RNA, U5, can transform cells in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **9**:4345-4356.

- Hamada, K. and Mizuno, K. (1992) Analysis of chromosome aberrations induced by U5 RNA. *Mutation Research* **267**:97-104.

- Hammerberg, B., and Williams, J.F. (1978) Interaction between Taenia taeniaeformis and the complement system. *The Journal of Immunology* **120**:1033-1038.

- Hammerberg, B., Dangler, C., and Williams, J.F. (1980) Taenia taeniformis: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. *The Journal of Parasitology* **66**

- Heinzl, F.P., Sadick, M.R., Holaday, B.J., Coffman, R.L.,

and Locksley, R.M. (1989) Reciprocal expression of interferon gamma, of IL-4 during the response or progression of murine leishmaniasis. Evidence of expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* **169**:59-72.

- Heinzl, F.P., Sadick, M.D., Mutha, S.S., and Locksley, R.M. (1991) Production of IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4 and IL-10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Science* **88**:7011-7015.

- Herrera, L.A., Santiago, P., Rojas, G., Salazar, P.M., Tato, P., Molinari, J.L., Schiffmann, D., and Ostrosky-Wegman, P. (1993) Immune Response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by Taenia solium metacestode. (En revisión).

- Ho, M., Webster, H.K., Loareesuwan, S., Supanaranond, W., Phillips, R.E., Chanthavanich, P., and Warrell, D.A. (1986) Antigen-specific immunosuppression in human malaria due to Plasmodium falciparum. *Journal of Infectious Disease* **153**:763-771.

- Howard, H.G., Hale, C. and Liew, F.Y. (1980) Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. III. Nature and significance of specific suppression of cell-mediated immunity in mice highly susceptible to Leishmania tropica. *Journal of Experimental Medicine* **152**:594-606.

- James, S.L., Correa-Oliveira, R., and Leonard, E.J. (1984) Defective vaccine-induced immunity to Schistosoma mansoni in P strain mice II. Analysis of cellular responses. *The Journal of Immunology* **133**:1587-1593.

- Judson, D.G., Dixon, J.B., Skerritt, G.C. (1987) Occurrence and biochemical characteristics of cestode lymphocyte mitogens. *Parasitology* **94**:151-160.

- Kierszenbaum, F., Cuna, W.R., Beltz, L.A., and Sztein, M.B. (1989) Trypanosoma cruzi reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. *The Journal of Immunology* **143**:275-279.

- Kierszenbaum, F., Muthukkumar, S., Beltz, L.A., and Sztein, M.B. (1991) Suppression by Trypanosoma brucei rhodesiense of the capacities of human T lymphocytes to express interleukin-2 receptors and proliferate after mitogenic stimulation. *Infection and Immunity* **59**:3518-3522.

- Kusel, J.R., Mackenzie, P.E., and McLaren, D.J. (1975) The release of membrane antigens into culture by adult Schistosoma mansoni. *Parasitology* **71**:247-250.

- Laclette, J.P., Lnada, A., Arcos, L., Willms, K., Davis, A.E., Shoemaker, C.B. (1991) Paramyosin is the Schistosoma mansonii (Trematoda) homologue of antigen B from Taenia solium (Cestoda). *Molecular Biochem Parasitology* **44**:287-295.
- Laclette, J.P., Merchant, M. and Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of Taenia solium. *The Journal of Parasitology* **73**:121-129.
- Laclette, J.P., Shoemaker C.B., Richter, D. (1992) Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology* **148**:124-128.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Leiva, L.E., and Lammie, P.J. (1989) Modulation of lymphocyte activation by soluble Brugia pahangi extracts. *Tropical Medicine and Parasitology* **40**:327-331.
- Letonja, T., Hammerberg, C., and Schurig, G. (1987) Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval Taenia taeniaeformis. *Parasitology Research* **73**:265-270.
- Liew, F.Y. (1989) Functional heterogeneity of CD4<sup>+</sup> T cells in leishmaniasis. *Immunology Today* **10**:40-45.
- Lightowers, M.W., and Rickard, M.D. (1988) Excretory - secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology* **96**:S123-S166.
- Lowry, O.H., Rosebrough, J.J., Fan, A.L., Randall, L.J. (1951) Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**:265-275.
- Mansfield, J.M. (1981) Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. In: "Parasitic Diseases" Vol.1, Ed. J.M. Mansfield, pp. 167-226, Marcel Dekker, New York.
- Margni, A.R. (1980) Fraccionamiento en inmunoglobulinas. In: "Inmunología e inmunoquímica".pp 556. Panamericana.
- Mason, P.R., and Gwanzura, L. (1990) Reduced lymphocyte responses to mitogens in natural and experimental trichomoniasis. *Infection and Immunity* **58**:3553-3557.
- McLaren, D.J. (1984) Disguise as an evasive stratagem of parasitic organisms. In: "Parasite Evasion of the Immune Response", Symposia of the British Society for Parasitology, Vol.

21, Ed. R.M.E. Parkhouse, Parasitology 88:597-611.

- McLaren, D.J., Clegg, J.A., and Smithers, S.R. (1975) Acquisition of host antigens by young Schistosoma mansoni in mice: correlation with failure to bind antibody in vitro. Parasitology 70:67-75.

- Miller, L.H., Howard, R.J., Carter, R., Good, M.F., Nussenzweig, V., and Nussenzweig, R.S. (1986) Research toward malaria vaccine. Science 234:1349-1356.

- Mitchell, G.F. (1991) Co-evolution of parasites and adaptative immune responses. In: "Immunoparasitology Today", Ed. C. Ash, R.B. Gallagher, pp. A2-A6, Elsevier Trends, Cambridge.

- Molinari, J.L., Tato, P., and Valles, Y. (1987) Helper T lymphocytes depressed by Cysticercus cellulosae in immunized and control hogs. Revista Latinoamericana de Microbiología 29:293-300.

- Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A., and León Cázares, J.M. (1989) Modulation effects on mice response to a Salmonella typhimurium infection by a Taenia solium cysticerci product of low molecular weight. Revista Latinoamericana de Microbiología 31:327-334.

- Nickol, A.D., and Bonventre, P.F. (1985a) Immunosuppression associated with visceral leishmaniasis in hamsters. Parasite Immunology 7:439-449.

- Nickol, A.D., and Bonventre, P.F. (1985b) Visceral leishmaniasis in congenic mice of susceptible and resistant phenotypes: immunosuppression by adherent spleen cells. Infection and Immunity 50:160-168.

- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, R. (1980) A simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels. Analytical Biochemistry 105:361-363.

- Odean, M.J., Trachte, G.J., and Johnson, A.G. (1991) Characterization of immune suppression induced by polyribonucleotides. International Journal of Immunopharmacology 13:339-348.

- Olsson, T., Bakhiat, M., and Kristensson, K. (1992) Interactions between Trypanosoma brucei and CD8<sup>+</sup> cells. Parasitology Today 8:237-239.

- Pakianathan, D.R., and Kuhn, R.E. (1992) Interleukin-2 receptors in experimental Chagas' disease. Infection and Immunity 60:3904-3908.

- Petersen, E.A., Neva, F.A., Barral, A., Correa-Coronas, R., Bogaert-Díaz, H., Martínez, D., and Ward, F.E. (1984) Monocyte suppression of antigen-specific lymphocyte responses in diffuse cutaneous leishmaniasis patients from the Dominican Republic. *The Journal of Immunology* **132**:2603-2607.

- Rakha, N.K., Dixon, J.B., Skerritt, G.C., Carter, S.D., Jenkins, P., and Marshall-Clarke, S. (1991a) Lymphoreticular responses to metacestodes: Taenia multiceps (Cestoda) can modify interaction between accessory cells and responder cells during lymphocyte activation. *Parasitology* **102**:133-140.

- Rakha, N.K., Dixon, J.B., Jenkins, P., Carter, S.D., Skerritt, G.C., and Marshall-Clarke, S. (1991b) Modification of cellular immunity by Taenia multiceps (Cestoda): accessory macrophages and CD4<sup>+</sup> lymphocytes are affected by two different coenurus factors. *Parasitology* **103**:139-147.

- Ridaura, C. (1987) Host response in childhood neurocysticercosis. *Child's Nervous System*, **3**:206-207.

- Samuelson, J.C., and Caulfield, J.P. (1982) Loss of covalently labelled glycoproteins and glycolipids from the surface of newly transformed schistosomula of Schistosoma mansoni. *Journal of Cell Biology* **94**:363-369.

- Sher, A., and Coffman, R.L. (1992) Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. *Annual Review of Immunology* **10**:385-409.

- Sher, A., and Colley, D.G. (1989) Immunoparasitology. In: "Fundamental Immunology", Ed. W.E. Paul, 2nd. Edition, pp. 957-983, Raven, New York.

- Sher, A., and Ottesen, E. (1988) Immunoparasitology. In: "Immunological Diseases", Chapter 34, Ed. M. Samter, Little, Brown and Co., Boston.

- Silberstein, D.S., and David, J.R. (1987) The regulation of human eosinophil function by cytokines. *Immunology Today* **8**:380-385.

- Srour, E.F., Segre, M., and Segre, D. (1989) Modulation of the host's immune response to Plasmodium berghei by a parasite-derived immunosuppressive factor. *Journal of Protozoology* **36**:341-344.

- Szein, M.B., and Kierszenbaum, F. (1991) A soluble factor from Trypanosoma brucei rhodesiense that prevents progression of activate human T lymphocytes through the cell cycle. *Immunology* **73**:180-185.



- Tarleton, R.L. (1988) Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. II Evidence for a role for suppressor cells. The Journal of Immunology 140:2769-2773.

- Tato, P., Valles, Y., and Molinari, J.L. (1987) Effect of immunization on immunodepressed hogs naturally parasitized with Cysticercus cellulosae. Revista Latinoamericana de Microbiología 29:67-71.

- Villagrán, J. y Olvera, J.E. (1988) Cisticercosis Humana. Estudio Clínico y Patológico de 481 casos de autopsia. Patología 26:149-156.

- Uchida, T. and Egami, F. (1967) Ribonuclease T<sub>1</sub> from Taka-Diastase. In: "Methods in Enzymology", Vol. XII, Eds. L. Grossman and K. Moldave, pp. 228-229, Academic Press, New York.

- Weindanz, W.P. (1982) Malaria and alterations in immune reactivity, British Medical Bulletin 38:167-172.

- White, A.C., Molinari, J.L., Pillai, A.V., and Rege, A.A. (1992) Detection and preliminary characterization of Taenia solium metacestode proteases. The Journal of Parasitology 78:281-287.

- Williamson, W.A., and Greenwood, B.M. (1978) Impairment of the immune response to vaccination after acute malaria. Lancet 1: 1328-1329.

- Willms, K., Merchant, M.T., Arcos, L., Sealey, M., Díaz, S., and Díaz de León, L. (1980) Immunopathology of cysticercosis. In: "Molecules, Cells and Parasites in Immunology", Eds. C. Larralde, K. Willms, L. Ortiz and M. Sela, pp. 145-162, Academic Press, New York.

- Yin Foo, D., Nowak, M., Copeman, B., Mc. Cabe, M. (1983) A low molecular weight immunosuppressive factor produced by Onchocerca gibsoni. Veterinary Immunology and Immunoparasitology 4:445-451.

- Zavala, F., Tam, J.P., Barr, P.J., Romero, P.J., Nussenzweig, R.S., and Nussenzweig, V. (1987) Synthetic peptide vaccine confers protection against murine malaria. Journal of Experimental Medicine 166:1591-1596.