

23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

299453

Efecto de proteasas secretadas por el metacéstodo de *Taenia solium* sobre linfocitos humanos CD⁴ in vitro.

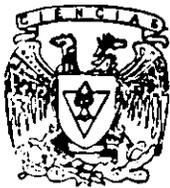
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

VERONICA MARUSA BORGONIO CUADRA



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSE LUIS MOLINARI PISORIANO



MEXICO, D. F.

2001

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Efecto de proteasas secretadas por el metacéstodo de Taenia solium sobre
linfocitos humanos CD⁴ in vitro.

realizado por Verónica Marusa Borgonio Cuadra

con número de cuenta 90049709 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

- Director de Tesis
- Propietario Dr. José Luis Molinari Soriano
- Propietario Dra. Patricia Tato Zaldívar
- Propietario Dr. Guillermo Salgado Maldonado
- Suplente M. en C. Isabel Cristina Cañeda Guzmán
- Suplente M. en C. Fernando Ramos Reyes

[Firma manuscrita]

Patricia M. Tato Z.

Guillermo Salgado Maldonado

Cañeda

Fernando

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR,
UNAM. BAJO DIRECCION DEL DR. JOSÉ LUIS MOLINARI SORIANO,
CON APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA
A TRAVES DEL PROYECTO NO.26372-M.

INDICE GENERAL

Introducción.....	1
Hipótesis.....	13
Objetivos.....	14
Material y métodos	
-Obtención de productos de excreción - secreción (E/S) de metacéstodos de <i>Taenia solium</i>	16
-Zimogramas y Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE).....	16
-Ensayos con sustratos fluorogénicos e inhibidores de proteasas en E/S.....	16
-Obtención de linfocitos a partir de sangre periférica humana.....	19
-Tinción de células humanas con Anticuerpos monoclonales (MoAb).....	20
-Tratamiento de sangre total humana con E/S de metacéstodos de <i>T. solium</i>	22
-Efecto de E/S en la síntesis de interleucinas sobre linfocitos humanos	22
-Análisis por citometría de flujo.....	25

Resultados

-Caracterización de proteasas presentes en E/S por medio de Zimogramas y Electroforesis en Geles de Poliacrilamida (PAGE).....	26
-Detección de actividad de proteasas en E/S utilizando substratos fluorogénicos e inhibidores de proteasas	26
-Efecto de PES en linfocitos humanos mediante el uso de anticuerpos monoclonales fluoresceinados.....	28
-Efecto de E/S en la síntesis de interleucinas sobre linfocitos humanos.....	39
 Discusión.....	 44
 Conclusiones.....	 52
 Bibliografía.....	 53

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Phylum: Platyhelminthes(Gegenbaur, 1859).

Clase: Cestoidea. (Rudolphi, 1808, Fuhrmann, 1931).

Subclase: Cestoda. (Van Beneden,1849; Monticelli, 1892; Fuhrmann, 1931)

Orden: Cyclophyllidea (Braun, 1900).

Familia: Taeniidae (Ludwig, 1886).

Genero y especie: *Taenia solium*. (Linneo, 1758) *Taenia* del cerdo.

INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una enfermedad producida por el metacéstodo de *Taenia solium*. La parasitosis causada por éste organismo se conoce desde los tiempos de Hipócrates. Aristóteles y Aristófanes (384-322 AC) observaron el estadio larvario de *T. solium* y lo describieron como semejante al granizo.

Las primeras descripciones de cisticercosis humana se le atribuyeron a Paranoli (1550), Gessner (1558) y a Rumler (1558). No fue sino hasta 1809 en que Rudolphi identificó el agente causal y creyendo que era una especie animal bien definida le llamó *Cysticercus celulosae*, término con el que se le conoce en la actualidad al estado larvario, aunque no corresponde en nuestros días a un nombre científico, en algunos textos se le sigue llamando así al metacéstodo de *T. solium*. Más tarde, Kuchemmeister (1855) y Leuckart (1856), fueron los primeros que encaminaron sus estudios en el ciclo vital de este parásito, demostraron que el gusano vesicular de los tejidos del cerdo era el estadio larvario infectante para el hombre.

Taenia solium es de distribución cosmopolita, es un parásito de suma importancia para la especie humana, y es más común en los países eslavos

(Rep. Checa, Croacia, Servios etc), aunque también se tienen reportes de casos de taeniosis y cisticercosis en el norte de China, Manchuria, Pakistan, la India y en varios países de América con zonas de alta prevalencia en México. La taeniosis es causada por el adulto de *T. solium* mientras que la cisticercosis humana y porcina por el metacéstodo de este helminto. Esta parasitosis es un problema grave de salud pública, así como también, es de alto impacto económico, (Acevedo, 1982; Tsang y Wilson 1995).

En el ciclo biológico de este parásito, el hombre es el único hospedero definitivo natural, ya que alberga al parásito adulto, que le causa taeniosis. En cambio, el cerdo es hospedero intermediario, en el cual, el estadio de metacéstodo es albergado. La taeniosis se adquiere cuando se ingiere carne de cerdo cisticercosa insuficientemente cocida. El cisticerco o metacéstodo evagina y se fija en la pared intestinal donde se desarrolla en taenia adulto. El parásito adulto es de forma acintada y se pueden distinguir tres regiones anatómicas, un escólex con cuatro ventosas, un rostelo con doble corona de ganchos (28 en promedio) y el estróbilo que está segmentado, los segmentos reciben el nombre de proglótidos. Este parásito es hermafrodita, de tal manera que cuando llega a ser adulto produce huevos que son fecundados en los últimos segmentos del

parásito (proglótidos grávidos). Los proglótidos terminales se desprenden frecuentemente del estróbilo y son arrastrados por la corriente intestinal, saliendo junto con la materia fecal; el peristaltismo intestinal puede ejercer presión sobre los proglótidos y esto causa la salida de huevos hacia la luz intestinal, los huevos mezclados con el bolo intestinal son excretados con la materia fecal y éstos pueden al ser ingeridos por algún cerdo o ser humano y producir una nueva infección (Craig y Faust 1981).

La cisticercosis, es una enfermedad causada por el establecimiento del metacéstodo de *T. solium* en los tejidos del hombre o del cerdo. El hombre la adquiere al ingerir alimentos contaminados con huevos de *T. solium*, expulsados en las heces de un enfermo de taeniosis. El cerdo comunmente la adquiere al consumir directamente materia fecal de algún taeniósico, que habitualmente defeca al aire libre (comunmente en las zonas endémicas). al llegar al estómago los huevos son desencapsulados por la actividad ácida del jugo gástrico, y al llegar al duodeno, el jugo pancreático y la bilis, eliminan una capa de lípidos de la membrana externa del embrión, esto permeabiliza la envoltura y permite la entrada de agua y alimentos al interior. Lo que estimula al embrión a adquirir movilidad y salir de su envoltura, esto lo hace con sus 6

ganchos y posiblemente con la producción de enzimas líticas que excreta, penetran a través de la pared intestinal hacia las vénulas mesentéricas y son transportadas a diferentes tejidos del organismo, característicamente entre los músculos, tejido nervioso central, ojos, corazón, hígado y pulmones, en donde en el transcurso de 60 a 70 días la oncosfera se desarrolla hasta alcanzar la fase de metacéstodo (Craig y Faust 1981). El metacéstodo implantado en los tejidos del hospedero está cubierto por una vesícula ovoide de color blanquecino, mide de 3 a 10 mm de largo, está constituido por una membrana de grosor uniforme invaginada, los metacéstodos implantados en el tejido del cerdo u hombre pueden sobrevivir por periodos muy largos, el ciclo biológico se completa cuando el hombre consume carne de cerdo con cisticercos. Si el cisticerco se instala en el Sistema Nervioso Central, se produce la enfermedad llamada Neurocisticercosis (NCC).

A pesar de que los estudios epidemiológicos no han sido sistemáticos, los datos disponibles en publicaciones científicas indican que la frecuencia de taeniosis en nuestro país en las últimas décadas varían entre 0.2 y el 3.4% (Sarti, 1997) y los datos de la Secretaría de Salud notificó un promedio anual de 13,000

casos entre 1986 y 1990, y de 8000 casos en 1991 (Boletín de Epidemiología. Secretaría de Salud 1986).

En la cisticercosis humana las estadísticas oficiales disponibles reportan 500 casos anuales como promedio, variando la seroprevalencia entre el 0.1 al 12% dependiendo de la región estudiada y la técnica de diagnóstico empleada (Sarti 1998b).

La NCC es la forma de cisticercosis más grave en el humano, la cual depende de la localización, número y estado de los cisticercos. La NCC puede ser asintomática ó causar varios trastornos que pueden llevar a la muerte al paciente (Zenteno, 1982; Del Bruto y Sotelo 1988). De acuerdo a datos epidemiológicos, la prevalencia de neurocisticercosis es limitada debido a que el diagnóstico de certeza se realiza con estudios de Tomografía Computarizada (TC) y de Imagen de Resonancia Magnética (IRM). El hallazgo del parásito en autopsias es más preciso en cuanto a datos epidemiológicos (Sotelo 1988; Villagran 1988, Rabiela et al., 1982). Finalmente, como procedimientos alternativos de diagnóstico, se utilizan técnicas inmunológicas como ELISA e inmunoelectrotransferencia (IEF) comúnmente conocida esta última como Western Blot para determinar anticuerpos anticisticercos en el líquido

cefalorraquídeo (Suryanarayana, 1993; Ng y Ko 1994). Estudios en cisticercosis porcina han detectado antígenos en productos de excreción secreción (E/S) del cisticerco por el método de ELISA (Souza y Hafez, 1999), mediante esta prueba, se han logrado detectar infecciones en ganado vacuno por cisticercos de *T. saginata* (Harrison y Sewell, 1981), *Taenia ovis* en ganado bovino (Heath et al., 1985) y triquinosis en cerdos (Gamble et al. 1983), La desventaja del humano ante esta parasitosis es que, la mayoría de las veces, el curso de la infección es asintomática, por lo que el cisticerco vive por años modulando la respuesta inmune del hospedador. Los síntomas asociados a esta parasitosis se presentan cuando el cisticerco muere y como resultado, se presenta una reacción inflamatoria intensa alrededor del cisticerco (White et al. 1992 a, 1997 b).

La interacción del sistema inmunitario contra los cisticercos es un intercambio dinámico entre los mecanismos del hospedero dirigidos a la eliminación de la infección y a la estrategia del parásito para sobrevivir. La presencia del metacéstodo provoca una secuencia típica de reacciones celulares locales, incluyendo infiltración de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas

y a veces células gigantes seguidas por fibrosis y necrosis con desintegración o calcificación eventual del cisticerco (Rabiela et al., 1982).

La eliminación del cisticerco en el hospedero obedece principalmente a la respuesta inmune mediada por células (Molinari et al. 1983a, 1983b, Robinson et al 1997). Las células T cooperadoras CD4⁺ (Tc) juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria, debido a que éstas tienen la capacidad de secretar citocinas que actúan principalmente en la activación, proliferación, diferenciación linfocitaria y regulación de las células inflamatorias, fundamentalmente de eosinófilos, además, las citocinas también son las responsables de la comunicación entre las células del sistema inmunitario (Scott. et al., 1989; Rojas, W. et al., 1999).

La interacción de parásitos con el hospedador provoca la destrucción de oncosferas en animales inmunes, mediante la activación de la vía clásica de complemento. Molinari et al. (1992) han mostrado que oncosferas de *T. solium* mueren *in vitro* cuando se cultivan con sueros de pacientes cisticercosos en presencia de complemento; de la misma forma oncosferas de *T. taeniformis* en ratones requieren la presencia de moléculas del complemento para ser eliminadas (Davis 1988).

Davis y Hammerberg et al. (1998) han mostrado el depósito de moléculas C3b en la superficie de oncosferas de *T. taeniformis* cultivadas *in vitro*. Estudios con metacéstodos de *T. taeniformis* sugieren que los productos de excreción secreción (E/S) activan y consumen complemento alrededor del cisticerco (Hammerberg and Williams 1978). No obstante, la Paramiosina secretada por cisticercos de *T. solium* se une a C 1 (molécula de complemento) y de esta forma inhibe la vía clásica de activación del complemento (Laclette. 1992). Mientras que la Taeniaestatina purificada de E/S de metacéstodos de *T. taeniformis* es un potente inhibidor de proteasas (tripsina y quimi tripsina) además de que inhibe la vía clásica y alterna de activación de complemento (Leid, 1987). Los parásitos han desarrollado estrategias, mediante las cuales, evaden la respuesta inmune del hospedero. Infecciones con huevos de *Taenia* están asociadas con depresión del sistema inmune del hospedador, por ejemplo, cerdos infectados con huevos de *T. solium* exhiben disminución en el número de células T CD4⁺ en sangre periférica. A mayor número de cisticercos, menor número de células CD4⁺ (Molinari et al. 1987, Tato et al. 1987). En infecciones con *T. taeniformis* se encontró decremento en la respuesta proliferativa de células esplénicas de rata. Cuando se implantan

cisticercos en la cavidad peritoneal en ratones se observa disminución en la actividad mitogénica de linfocitos expuestos a Concanavalina A , sin embargo, la inmunosupresión desaparece cuando los cisticercos mueren (Willms 1980).

El metacéstodo de *T. solium* secreta *in vitro*, moléculas que probablemente modulen la respuesta inmune, por ejemplo Tato et al. (1995) y Arachavaleta. et al. (1998) han mostrado que una molécula pequeña de ARN-péptido, purificado de metacéstodos de *T. solium*, al que nombraron Factor de Metacéstodo (FM) deprime la respuesta inmune al inhibir *in vitro* la síntesis de interleucinas (IFN- α , IL-2, IL-4 y FNT- γ) en linfocitos T de ratón. Otras moléculas de interés, son las enzimas proteolíticas o proteasas de las familias serina, thiol (cisteína), metalo y aspártico proteasas, éstas catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas y están involucradas en un sin número de patologías en las enfermedades parasitarias (MacKerrow 1989; 1985), por ejemplo: a) Facilitan la invasión del hospedero catalizando la degradación del tejido conectivo como se ha observado en *Schistosoma mansoni* (Chappell et al. 1993), *Trichuris suis* (Hill et al. 1993; Mansfiel y Urban 1995), *Anisakis simplex* (Morris y Sakanari 1994), *Hymenolepis diminuta*, (Moczon 1996) y

microfilarias de *Onchocerca sp* (Lackey et al. 1989); **b**) Interactúan con el sistema de coagulación y fibrinolisis como en infecciones por *Ancylostoma caninum*, en donde el parásito libera metaloproteasas que previenen la coagulación de la sangre, inhibiendo la formación de fibrina durante la alimentación del parásito (Hotez y Cerami 1983); **c**) Facilitan sus estados de transición morfogénicos como es el caso de *S. mansoni* (Lewert and Lee 1986; Landsperger, et al. 1982; MacKerrow and DoenLoff, 1988); **d**) Participan en la inhibición de la quimiotaxis como es el caso de *Echinococcus granulosus* en donde se ha reportado una proteína de 14 kda (Sheperd. et al. 1991); **e**) Degradan moléculas del hospedador que sirven de alimento al parásito; por ejemplo, estudios con *S. mansoni* revelaron la participación de una cisteína proteasa con actividad hemoglobinolítica (Zenda et al. 1988), *Haemonchus contortus*, produce anemia durante el periodo de infección (McKerrow et al. 1990), *Trichuris suis*, utiliza una tiol proteasa que degrada moléculas del hospedador (Hill and Sakanari 1997). **f**) Evaden el sistema inmune o modulan moléculas inmunes digiriendo moléculas del hospedero, por ejemplo rompen IgG en regiones Fab y Fc como se ha registrado con una enzima parecida a tripsina de *S. mansoni* (Auriault et al. 1981); así como una serina proteasa de

Dirofilaria immitis (Tamashiro, y Scott 1987), una Catepsina tipo B en *Fasciola hepatica* (Chapman and Mitchel 1982) y una Catepsina tipo S en *Spirometra mansoni*, (Carmona et al. 1993; Kong Y et al. 1994); Tamashiro et al. 1987; Jones et al. 1991);

Las proteasas identificadas hasta el momento en extractos de metacéstodos liofilizados de *T. solium* corresponden metalo, cisteína y aspartilproteasas las cuales están involucradas posiblemente en mecanismos de nutrición y digestión de macromoléculas del hospedador (White et al 1992); En estudios más recientes con linfocitos humanos cultivados *in vitro* Molinari et al. (2000), ha registrado que la actividad de una cisteína proteasa en productos de ES de metacéstodos de *T. solium* induce disminución de células T CD4⁺. Efectos similares de otras proteasas en otros parásitos han sido observadas por ejemplo, se ha descrito una metaloproteasa de *Leishmania mayor* y *L. donovani* que rompe enlaces peptídicos de moléculas de células CD4⁺ humanas (Kharazmi et al. 1994). Otros autores han registrado proteasas de origen bacteriano tales como proteasas extracelulares de *Legionella pneumophilia* y de *Pseudomonas aeruginosa* capaces de hidrolizar el receptor CD4⁺.(Sawanari 1984) Además

han estudiado otros receptores que pudieran estar involucrados como posibles blanco de proteasas. En monocitos el receptor CD14⁺ es blanco de proteólisis por una cisteína proteasa de *Porphyrromonas gingivalis* (Sagawara et al 2000).

El receptor CD4⁺ presente en linfocitos T cooperadores tiene dos funciones importantes en la activación de las célula T, en primer lugar el CD4⁺ sirve como molécula de adhesión debido a su afinidad específica por moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) clase II que tienen unidos péptidos antigénicos y en segundo, el CD4⁺ puede transducir señales o facilitar la transducción de señales mediada por el receptor para el antígeno en células T al unirse a CPH activando a la célula.

El análisis de estos antecedentes hace pensar que las proteasas presentes en E/S de metacéstodos de *T. solium* participan de alguna forma en mecanismos para prevalecer en el hospedero y uno de ellos correspondería a la modulación de la respuesta inmune mediante la probable proteólisis de proteínas de superficie.

El objetivo central de este trabajo es estudiar el efecto de proteasas de metacéstodos de *T. solium* en linfocitos humanos T CD4⁺ debido a su papel

como células cooperadoras que promueven la proliferación, maduración y función inmunitaria en otros tipos celulares.

HIPÓTESIS

En estudios de algunos parásitos se han descrito diversas enzimas proteolíticas que digieren moléculas de IgG que pertenecen a la familia de las inmunoglobulinas. Por lo que, otras moléculas de esta superfamilia pudieran verse afectadas por enzimas biológicamente activas liberadas como productos de excreción/secreción (E/S) de metacéstodos de *Taenia solium*.

OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la actividad de una cisteína proteasa en los productos de excreción/secreción de metacéstodos de *Taenia solium* sobre linfocitos T CD4⁺ humanos *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ① Caracterizar la cisteína proteasa de los productos de excreción/secreción por medio de inhibidores y sustratos sintéticos fluorogénicos así como por estudios de zimografía.
- ② Estudiar el efecto de productos de excreción/secreción de metacéstodos de *T. solium* sobre receptores de linfocitos humanos mediante inmunofluorescencia directa por citometría de flujo.
- ③ Estudiar el efecto de productos de excreción/secreción de metacéstodos de *T. solium* en linfocitos humanos sobre síntesis de interleucinas por medio de tinción intracelular.

MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS DE DE EXCRECIÓN/ SECRECIÓN DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium*.

Metacéstodos de *Taenia solium* se disecaron de músculos de cerdos cisticercosos, naturalmente infectados, los metacéstodos se lavaron cuidadosamente con PBS 1 mM pH 7.4 estéril suplementado con penicilina (500 IU) y estreptomycinina (500 µg/ml), enseguida se colocaron en cajas petri estériles con PBS donde se mantuvieron durante 6 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a 4°C e inmediatamente se filtró a través de membranas millipore estériles de 0.45 µ de poro, la concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976).

CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS ACTIVAS PRESENTES EN LOS E/S POR MEDIO DE ZIMOGRAMAS Y ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE).

Productos de E/S de metacéstodos (25 µg) se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en condiciones reductoras según Laemmli (1970). Los geles se tiñeron con plata de acuerdo al protocolo de los fabricantes (Pharmacia). Por otro lado se evidenció la actividad enzimática de E/S (80 µg)

usando como substrato gelatina porcina de piel tipo A, (SIGMA) a una concentración del 0.17% copolimerizada en geles de poliacrilamida al 8% bajo condiciones no reductoras. Después de la electroforesis, los geles se incubaron toda la noche a 37°C en amortiguador de citratos 0.1 M, pH 5.5, en presencia de 5 mM de L-cisteína con o sin E-64 (inhibidor de cisteína proteasa) otros geles se incubaron en amortiguador Tris HCl 0.1M pH 8.8 con o sin 10 mM de EDTA, después de la incubación los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.125%, el exceso de colorante se eliminó con varios cambios de metanol-ácido acético (15:10) hasta visualizar las bandas de digestión atribuidas a la actividad de proteasas presentes en los E/S.

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN LOS E/S UTILIZANDO SUBSTRATOS FLUOROGÉNICOS .

Para detectar la actividad de proteasas presentes en los E/S de metacéstodos de *T. solium*, se utilizaron péptidos sintéticos como substratos específicos acoplados a un compuesto fluorescente (7-amino-4trifluorometilcumarina AFC). Los substratos utilizados fueron benzyloxy-carbonil-phenilalanina-arginina-AFC (Z-Phe-Arg-AFC) para cisteína y serina proteasa , Ser-Try-AFC para serina proteasa y Z-Hbr-Arg-AFC para metaloproteasas

Y fueron adquiridos de Enzyme System Products (Livermore California). 1 μg de cada substrato sintético se incubó por separado con 20 μg de E-S /200 μl a 37°C durante 2 horas con amortiguador de citrato de sodio 100 mM pH 4.9, con o sin L-cisteína 5mM como agente reductor, ó amortiguador de Tris-HCl 100 mM , con o sin CaCl_2 200 mM pH 7.5.

La actividad proteolítica se midió fluorométricamente (excitación = 405nm y emisión = 505nm) en un Fluoroscan FL (Labsystems, Finland). Los resultados se reportaron como nanomoles de AFC liberados, producto del desprendimiento de la región fluorescente (AFC) del substrato a consecuencia de la hidrólisis de E/S durante la incubación. Tomando en cuenta que 1 unidad de enzima activa es igual a la cantidad que cataliza la liberación de 1nm de AFC/ 2h/ μg a 37°C.

ENSAYOS CON INHIBIDORES DE PROTEASAS SOBRE E/S

Los inhibidores de proteasas se obtuvieron de la compañía Bohringer Mannheim, (Alemania) y se utilizaron las siguientes concentraciones, trans-epoxisucinil-1-leucilamino -4 guanidino butano (E-64), 1 μM inhibidor para cisteína y serina proteasa, aprotinina 0.3 μM inhibidor para serina proteasa y 10 mM etilendiamino tetraacetato de sodio (EDTA) inhibidor para metaloproteasas;

Los E/S de metacéstodos (20 µg) se preincubaron con inhibidores de proteasas (30 min, 37°C) antes de ponerlos en contacto con el substrato sintético descrito anteriormente. Las condiciones de reacción se llevaron a cabo en placas de poliestireno negras (Labsystems) en un volumen total de 200 µl durante 2 horas, los amortiguadores utilizados fueron citrato de sodio pH 4.9 y Tris HCl pH 7.5

Los resultados se indicaron como % de inhibición según la siguiente fórmula::

% DE INHIBICIÓN = $\frac{\text{nmol liberados (AFC) sin inhibidor} - \text{nmol liberados (AFC) con inhibidor}}{\text{nmol liberados sin inhibidor (AFC)}} \times 100$.

OBTENCIÓN DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA

Obtención de células: se realizó a partir de 15 a 20 ml de sangre periférica de donantes voluntarios, la sangre heparinizada se transfirió a un tubo cónico estéril de 50 ml para centrífuga que contenía el mismo volumen de solución de poli sacarosa y diatrizoato de sodio (Histopaque 1077, SIGMA), se centrifugó por 30 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, el plasma se desechó, las células mononucleares se separaron y transfirieron a un tubo estéril, a las cuales después de lavarse 2 veces con medio de cultivo (RPMI 1640), se les determinó su

viabilidad usando la técnica de exclusión con azul de tripano. Finalmente, se ajustó la suspensión a 7.5×10^4 células/ml en RPMI 1640. Las células obtenidas en estas condiciones se sometieron a diferentes tratamientos.

TINCIÓN DE CÉLULAS HUMANAS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES (MoAb) MARCADOS CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCENCIA (FITC) Y FICOERITRINA (PE)

Anticuerpos monoclonales fluoresceínados: se utilizaron anticuerpos anti CD3 y anti CD4 humanos marcados con FITC, anti CD19, anti CD8 y anti CD25 humanos marcados con PE (BECTON DICKINSON). Cada 3.5×10^4 células se incubaron con $250 \mu\text{g}$ de E/S, (2 h, 37°C , 5% de CO_2), se resuspendieron en PBS y se tiñeron con $10 \mu\text{M}$ del par de MoAb anti CD19/anti CD3, otras células se tiñeron con anti CD19/anti CD4, anti CD8/anti CD4 y anti CD25/anti CD4 marcados con PE / FITC respectivamente, la tinción se prolongo durante 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células se lavaron con 3 ml de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 7 minutos, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en $400 \mu\text{l}$ de PBS-Formaldehído al 0.5 % para posteriormente ser analizadas por citometría de flujo. El tratamiento de células en sangre completa se llevó a cabo de igual manera como se describió en la tinción celular con MoAb, sólo que, después de la tinción, se realizó la

lisis de eritrocitos con 2 ml de solución lisadora 1X (FACS Lysing Solution 10X BECTONDICKINSON), las células se agitaron en vortex a baja velocidad durante 5 segundos y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente en la oscuridad, inmediatamente se centrifugaron a 1,500 rpm durante 7 min y se resuspendieron en PBS-Formaldehído.

TRATAMIENTO DE SANGRE TOTAL HUMANA CON DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium*.

Sangre periférica humana heparinizada obtenida de voluntarios (200 µl) se depositaron en tubos de 5 ml de fondo redondo (FALCON) adicionando 150 µg de E/S de metacéstodos y 5 mM de L-cisteína, a los tubos testigo no se les agregó E/S, las células se incubaron durante 2 horas a 37°C en 5% de CO₂, posteriormente se lavaron con 3 ml de PBS a 1500 rpm durante 7 minutos y el sobrenadante se desechó. Las células se tiñeron con 10 µl de anticuerpo monoclonal (MOAb) antiCD4 / antiCD8 humanos conjugados con fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE) respectivamente. También se incluyeron tubos que contenían células que se marcaron con anti-CD3-/anti-CD19- igualmente

marcados con FITC y PE , después de 30 min de tinción a temperatura ambiente en oscuridad, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 2 ml de solución de lisis durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se separaron por centrifugación a 1500 rpm durante 7 minutos. Finalmente, se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con 400 µl de solución de PBS-Formaldehído al 5%, los tubos se mantuvieron al resguardo de la luz a 4°C hasta el momento de ser analizadas por citometría de flujo en un FACS (BECTON DICKINSON).

EFECTO DE LOS E/S DE METACÉSTODOS DE *Taenia. solium* SOBRE LINFOCITOS HUMANOS.

Linfocitos aislados en Histopaque (7.5×10^4 /ml RPMI) se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos (Costar), a los que se añadió 100 µg de E/S de metacéستodos de *T. solium* por cada 1.5×10^4 células conteniendo 5 mM de L-cisteína , se incluyeron células testigo sin E/S. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% por 2 a 5 h, otras se incubaron por 2 y 3 h . Cada hora, las células se lavaron con 3 ml de PBS pH 7.2, se centrifugaron durante 7 minutos a 1500 rpm para eliminar residuos de E/S y se tiñeron con MoAb

antihumano CD8/CD4, CD19/CD3 y CD19/CD4 y se analizaron en el citómetro de flujo adquiriendo 10,000 eventos/gráfica.

INHIBICIÓN DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN E/S CON UN INHIBIDOR DE CISTEÍNA PROTEASAS (E-64).

Con el objeto de comprobar que el efecto de E/S sobre linfocitos es debido a la actividad de cisteína proteasa, se incluyó un pozo con células testigo a las que se les añadió E/S preincubados por una hora con E-64 (inhibidor específico de cisteína proteasas) y se tiñeron con anti CD8/anti CD4, las células se trataron de igual manera a la ya antes descrita.

EFFECTO DE LOS E/S EN LA SÍNTESIS DE INTERLEUCINAS SOBRE LINFOCITOS HUMANOS.

Se depositaron 2.1×10^6 linfocitos/2 ml de RPMI en pozos de placas de cultivo (COSTAR), se añadieron 5 mM de L-cisteína y 100 µg de E/S por cada 1.5×10^4 células, las células testigo no contuvieron E/S. Se incubaron a 37°C en un ambiente de CO₂ al 5% por 2 h. Después de ese tiempo, las células se transfirieron a tubos cónicos de 15 ml (NUNC) con 6 ml de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 7 min, se eliminó el sobrenadante y el paquete

celular se resuspendió en 2 ml de RPMI complementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO), las células se colocaron de nuevo en placas de cultivo con o sin Concanavalina A (3 µg/ml). Se incubaron a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% por 48 h; 4 horas antes de finalizar el periodo de incubación se adicionaron 20 µl de Brefeldina A (20 µg/ml), una vez finalizado el periodo de incubación las células se distribuyeron a razón de 3x10⁵ células/tubo y se tiñeron con MoAb contra receptores de superficie anti CD4-FITC/anti CD8- PE y anti CD4-FITC/anti CD25-PE humanos (Becton Dickinson), se incubaron por 25 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y posteriormente se les adicionó 1 ml de solución de lisis 1:10 por 15min a temperatura ambiente en la oscuridad. Se centrifugó a 1500 rpm/7 min, el botón celular se resuspendió en 500 µl de solución permeabilizante (FACS, BD) 1:10 y se volvió a incubar como en el paso previo. Se adicionó 2 ml de PBS con albúmina sérica bovina al 0.5% con azida de sodio al 0.1% (PBS-ABS) y se centrifugó a 1500 rpm/7 min. Las células se resuspendieron y se tiñeron con 10 µl de MoAb anti -IL-2-PE o anti-IL-4-PE ó anti -IFN γ -PE humanas (SIGMA), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, se agregaron 2 ml de PSB-albúmina sérica bovina, se centrifugó de igual forma, se decantó el sobrenadante y las células se

resuspendieron en 300 μ l de PBS-Formaldehído al 0.5% guardándose a 4°C en la oscuridad hasta su análisis por citometría de flujo en un citómetro FACS (BECTON DICKINSON).

ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Se usó un kit de microesferas CaliBRITE™ de 2 colores marcadas con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (PE), se utilizó el programa de software FACSCComp™ para calibrar el citómetro, configurar la compensación entre fluorescencias FL1 y FL2 y verificar la sensibilidad del instrumento a la dispersión frontal (FSC) y la dispersión lateral (SSC) Los parámetros antes señalados se ajustaron con un tubo testigo de células teñidas con MoAb fluorescentes utilizando el programa de software CellQuest. Se adquirieron 10,000 eventos/gráfica (plot) por triplicado. Los resultados se registraron como porcentaje de eventos adquiridos en los canales de FL1/FL2 para detectar fluorescencia, habiéndose seleccionado los linfocitos en la región 1 (R1) de cada gráfica de FSC/SSC.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS EN LOS E/S DE METACESTODOS DE *Taenia solium* POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA Y ZIMOGRFÍA.

En la electroforesis de E/S en geles polimerizados con gelatina sólo se observaron dos bandas de digestión, una de ellas no se detecta cuando el amortiguador de incubación se le adiciona el inhibidor E-64, mientras que la otra banda aparece de manera constante ante inhibidor EDTA y E-64. (Figura 1 A).

La electroforesis en geles de poliacrilamida con los E/S y teñida con nitrato de plata reveló la complejidad de las proteínas liberadas en los E/S como productos de excreción (Fig. 1B), comparativamente las bandas de digestión observadas en el zimograma y traslapadas con PAGE mostraron que las dos enzimas capaces de digerir gelatina corresponden a pesos moleculares relativos superior de 70 Kda y de 45 a 35Kda

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD DE PROTEASAS EN LOS E/S UTILIZANDO SUBSTRATOS FLUOROGÉNICOS E INHIBIDORES DE PROTEASAS.

Los ensayos realizados para probar la presencia de actividad proteolítica del tipo serina, cisteína y metalo en los E/S de metacéstodos de *T. solium* revelaron hidrólisis del sustrato Z-Phe-Arg-AFC (sustrato específico para cisteína proteasa) a pH ácido, en presencia del reductor L- cisteína obteniéndose una

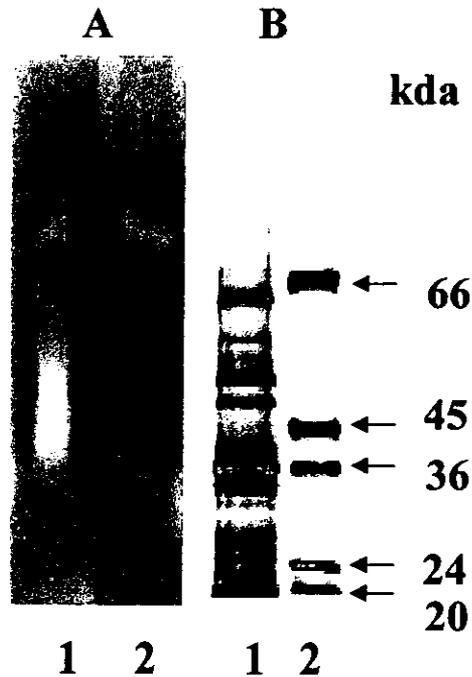


Figura. 1 Electroforesis en geles con gelatina y geles de poliacrilamida de extracto crudo de E/S de metacéstodos de *T solium*. Los E/S se corrieron a través de un campo eléctrico en geles de poliacrilamida al 8 % y geles con gelatina al 0.17%, después del corrimiento los geles se trataron y tiñeron con azul de Comassie o tinción argéntica. El carril 1 A muestra el extracto crudo de PES, Carril 2 A los PES incubados con E-64, Carril 1 B PES y carril 2 B marcador de pesos moleculares.

DETERMINACION DE ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN PRODUCTOS DE E/S DE METACESTODOS DE *Taenia solium* MEDIANTE INHIBIDORES Y SUSTRATOS FLUOROGENICOS ESPECIFICOS

Substrato Fluorfluogénico	pH	Actividad específica nmoles de AFC/n/μg	% de inhibición		
			E-64	Aprot	EDTA
Z-Phe-Arg-AFC	4.9	78 ± 14	91.74	4.26	30.9
	4.9/L-cisteína	384 ± 11	98.33	6.02	17.35
Ser- Try-AFC	7.5	12 ± .05	—	—	—
Z-Hbr-Arg-AFC	7.5	241 ± 11	9.10	10.2	94.49

Cuadro 1. Los valores de actividad específica representan el promedio de al menos tres ensayos en cada caso. El porcentaje de inhibición fue calculado de la siguiente forma: % de inhibición = nmoles de AFC liberado sin inhibidor - nmoles de AFC liberados con inhibidor / nmoles de AFC sin inhibidor X 100; El pH para cada condición indica el óptimo en el cual cataliza la enzima.

Sin embargo, el número de eventos se ve ligeramente disminuido (datos no mostrados). Pero cuando los E/S se incubaron con linfocitos purificados durante un lapso de tres horas se observó que la población de linfocitos T CD4⁺ disminuye de 35% hasta 15% durante la primer hora, este evento se prolongó hasta la tercera hora llegándose a obtener porcentajes de 10% para la población T CD4⁺. Es importante aclarar que durante el periodo de incubación el % de células marcadas con CD19⁺ no parece ser afectado por los E/S (Figuras.3 y 4). Con la finalidad de conocer que otros linfocitos T, además de las T CD4⁺, eran afectadas por E/ S se llevaron a cabo experimentos con sangre total y linfocitos purificados los cuales se tiñeron con anti CD8⁺ y anti CD4⁺. En los experimentos con sangre total se observó de nuevo el efecto del abatimiento en la población T CD4⁺ del 15% y además el número de eventos en células tratadas con los E/S es dos veces menor que con células cultivadas en RPMI cuando son tratadas durante dos horas (Figura 5). La población de linfocitos CD8⁺ tanto en RPMI como tratada con E/S permaneció sin variación (Figura 5A) Los ensayos que se llevaron a cabo en linfocitos T CD4⁺ para establecer los efectos inducidos de E/S en función del tiempo, mostraron que la disminución de linfocitos T CD4⁺ tuvo lugar desde la primer hora, y permaneció a lo largo de 3 horas

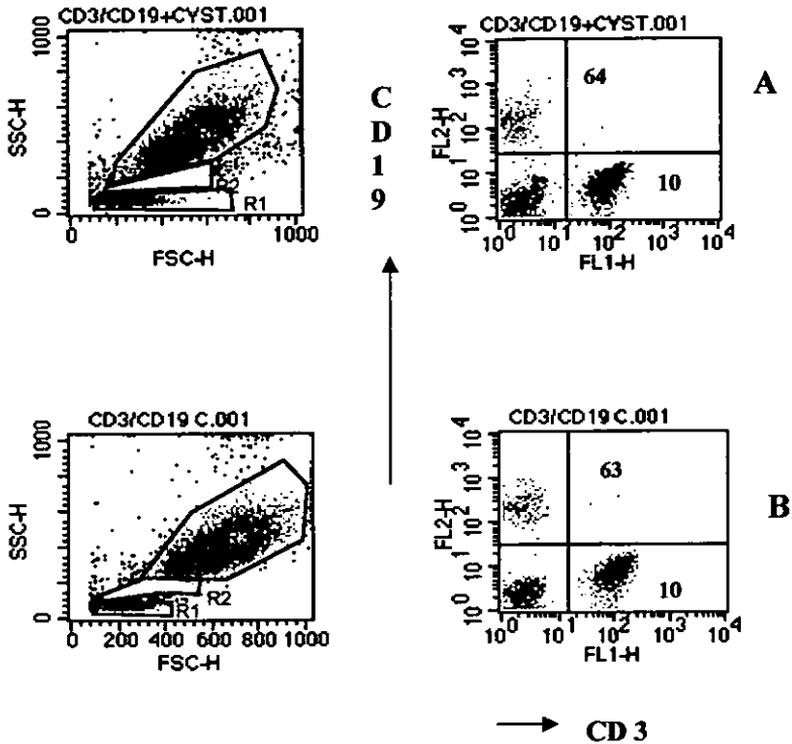


FIGURA. 2 EFECTO DE LOS E/S DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium* EN MARCADORES CD3 Y CD19 DE CÉLULAS HUMANAS EN SANGRE PERIFÉRICA. Sangre total (200 μ l) cultivada por 2h a 37°C, 5% de CO₂ en condiciones reductoras se trató con 100 μ g de E/S, después del cultivo las células fueron teñidas con anticuerpos monoclonales anti CD3FITC/antiCD19 PE, el cuadrante superior izquierdo representa las células marcadas con PE y el cuadrante inferior derecho las células marcadas con FITC; El panel A muestra el análisis por citometría de flujo de células en RPMI, (testigo), y el panel B células tratadas con E/S. Los valores señalados están dados en % derivado de la regionalización de linfocitos (R1), cada plot representa la adquisición de 10000 eventos.

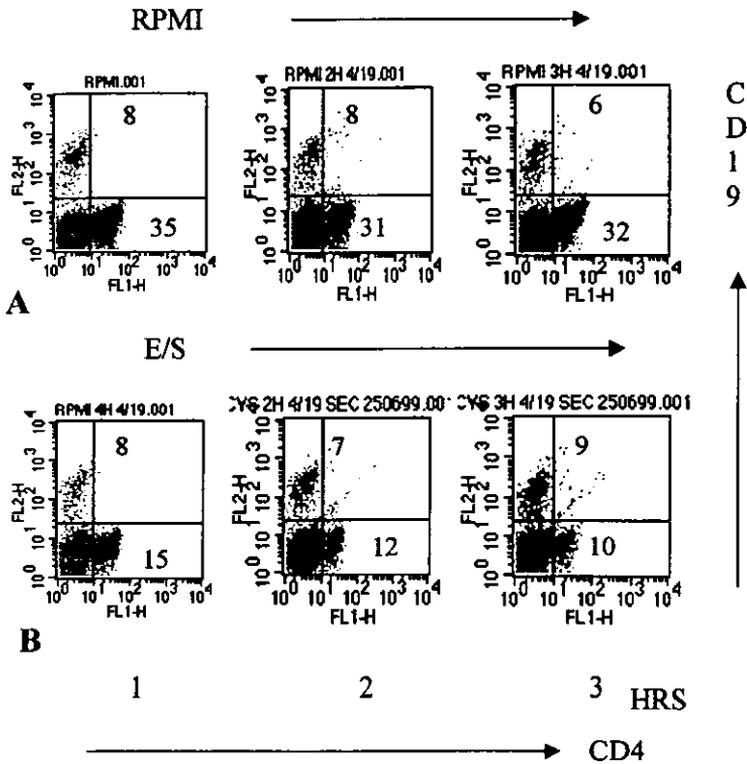
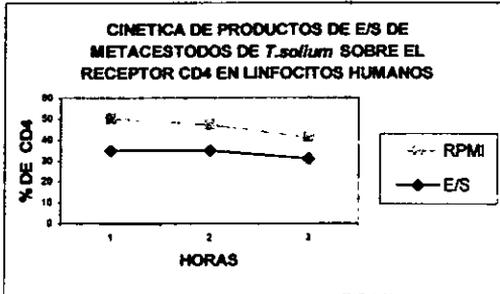


FIGURA.3 CINÉTICA DE LOS E/S DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium* SOBRE RECEPTORES CD19⁺ Y CD4⁺ EN LINFOCITOS HUMANOS. Linfocitos enriquecidos se cultivaron en medio RPMI y 5mM de reductor L-cisteína durante 3 h a 37° C, 5% de CO₂ y teñidas cada hora con Anticuerpos monoclonales anti CD4 FITC/anti CD19 PE.

La figura A muestra el análisis por citometría de flujo de células cultivadas en RPMI, el cuadrante superior izquierdo representa las células marcadas con anti CD19 y el cuadrante inferior derecho las células marcadas con anti CD4. La figura B representa el análisis por citometría de flujo de células cultivadas con 100µg de E/S. Los valores señalados están dados en % derivado de la regionalización de linfocitos (R1) cuando son adquiridos 10000 eventos.

A



B

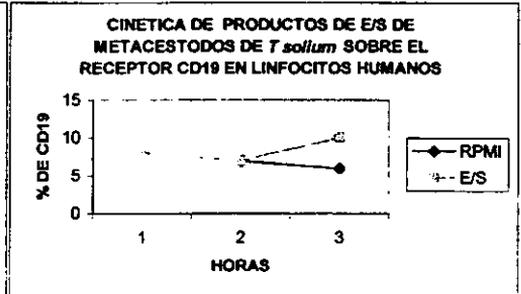


Fig. 4 Cinética de los efectos inducidos por los productos E/S de metacéstodos de *T. solium* sobre receptores CD4+ y CD19+ de linfocitos humanos de sangre periférica. El pane A representa el % de células teñidas cada hora que expresan el marcador CD4+ cuando son cultivadas en RPMI y E/S, el panel B representa el % de células teñidas cada hora que expresan el marcador CD19+ cuando son cultivadas en RPMI y E/S.

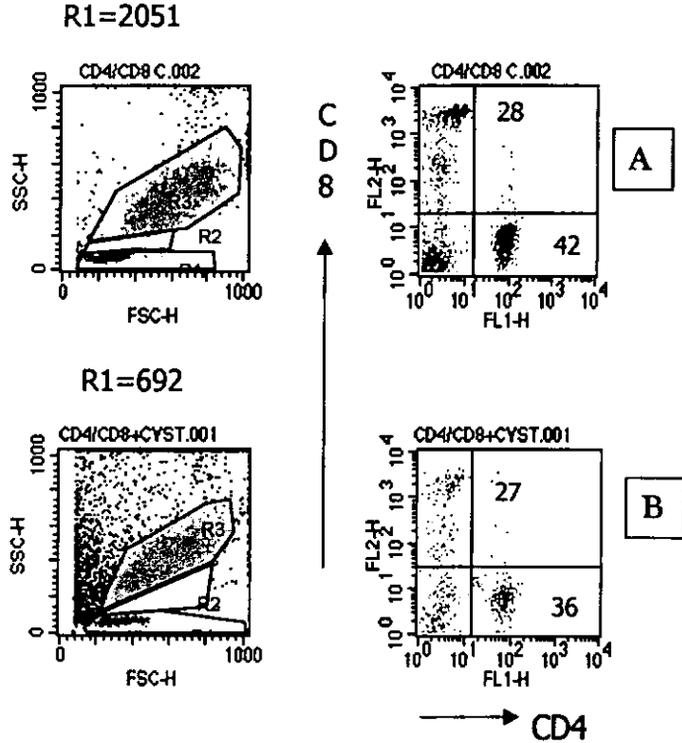


FIGURA.5 EFECTO DE PRODUCTOS DE E/S DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium* EN MARCADORES CD4⁺ Y CD8⁺ DE CÉLULAS HUMANAS EN SANGRE PERIFERICA. Sangre total (200µl) cultivada por 2 hrs a 37°C, 5% CO2 en condiciones reductoras fue tratada con 100µg de E-S, después del cultivo cada 3.5x10⁶ células se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti humano anti CD4+ FITC / PE anti CD8+PE, el cuadrante superior izquierdo representa las células marcadas con PE y el cuadrante inferior derecho las células marcadas con FITC; el panel A muestra el análisis por citometría de flujo de células en RPMI, y el panel B células tratadas con E-S. Los valores señalados están dados en % derivado de la regionalización de linfocitos (R1)Cada plot representa la adquisición de 10000 eventos.

con una reversión a partir de la cuarta hora. La disminución solamente se observó en células T CD4⁺ y no en T CD8⁺ ni linfocitos B (Figuras 3 y 6). Es importante aclarar que el número de eventos durante la cinética también sufrió decremento, pero sin perjudicar la relación entre células T CD8⁺ / CD4⁺ como se observó en condiciones con RPMI (Figuras 6 y 7).

Para conocer si la proteasa involucrada en el efecto de la disminución de la población T CD4⁺ era una cisteína proteasa, se incubaron linfocitos purificados con RPMI, E/S y E/S inhibidos con E-64 durante dos horas. Los resultados de estos experimentos demostraron que los E/S inhibidos con E-64 e incubados con células no son capaces de modificar significativamente la proporción de linfocitos T CD4 que se observa cuando las células son expuestas a RPMI. El decremento que se nota en el panel C de la figura 8 se debe al efecto tóxico del E-64, como se pudo observar en la disminución del número de células adquiridas en la región 1 y en la posición de las células en los cuadrantes. A pesar de esto, se conservó la proporción de CD4⁺/CD8⁺ en forma similar a la observada en el control (figura 8).

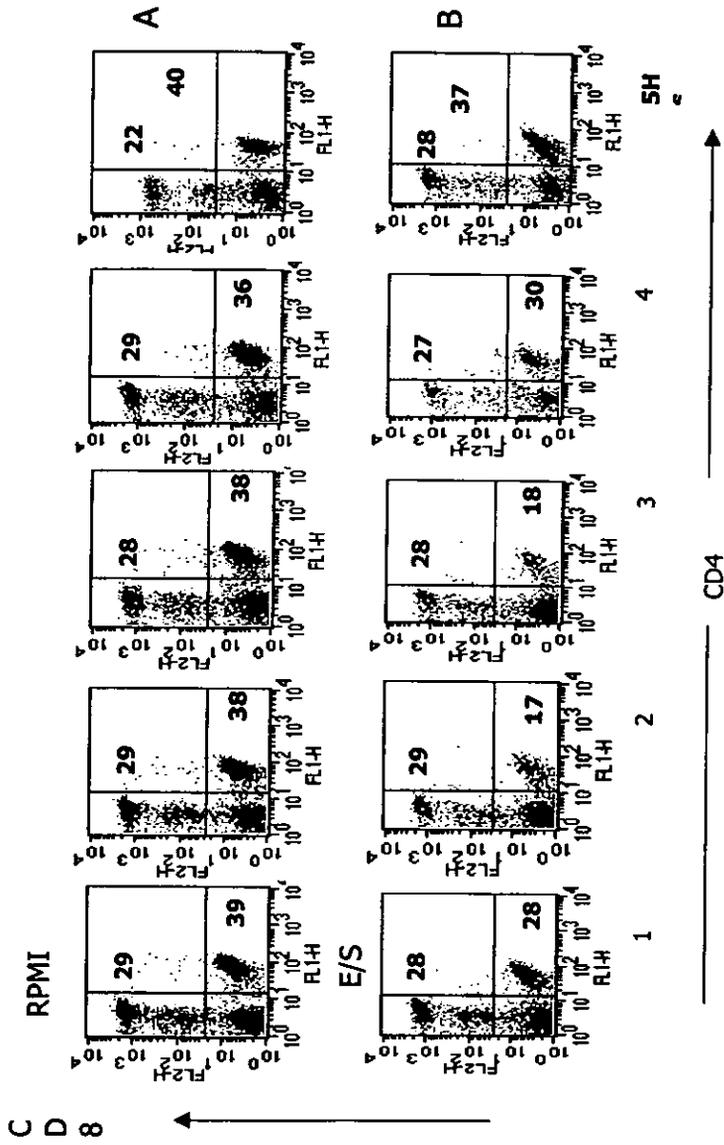


FIG. 6 CINÉTICA DE LOS EFECTOS INDUCIDOS POR LOS E/S DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium* SOBRE LINFOCITOS CD4+ Y CD8+ HUMANOS. Los linfocitos se cultivaron en medio RPMI y 5mM de L-cisteína durante 5h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Cada hora se tomaron muestras de 3.5x10⁴ células y se tñieron con MoAb-FITC anti CD4 y MoAb-Anti CD8,PE. La figura A muestra el análisis por citometría de flujo de células cultivadas en RPMI, el cuadrante superior izquierdo representa las células tñidas con MoAb-PE anti CD8 y el cuadrante inferior derecho las células tñidas con MoAb-FITC anti CD4. La figura B representa el análisis por citometría de flujo de células cultivadas con 100µg de proteína de E.S. Los valores señalados están dados en % derivado de la regionalización de linfocitos (R1) Cada plot representa la adquisición de 10000 eventos.

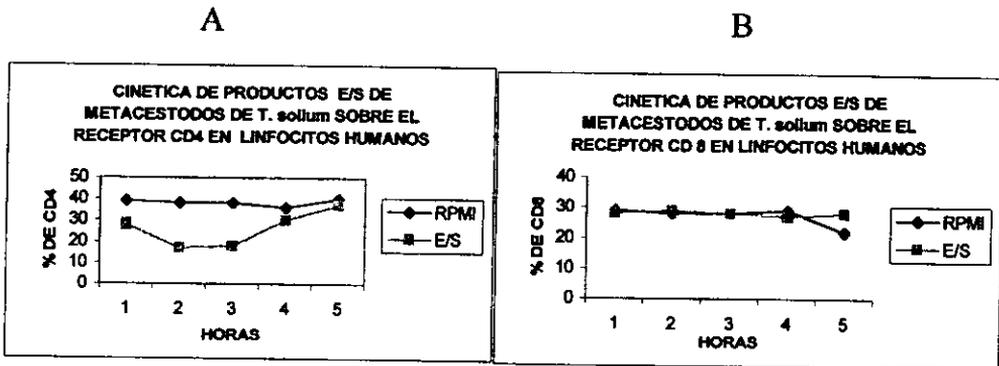


Fig. 7 Cinética de los efectos inducidos por los productos E/S de metacestodos de *T. solium* sobre receptores CD4+ y CD8+ de linfocitos humanos de sangre periférica. El panel A representa el % de células teñidas cada hora que expresan el marcador CD4+ cuando son cultivadas en RPMI y E/S, el panel B representa el % de células teñidas cada hora que expresan el marcador CD8+ cuando son cultivadas en RPMI y E/S.

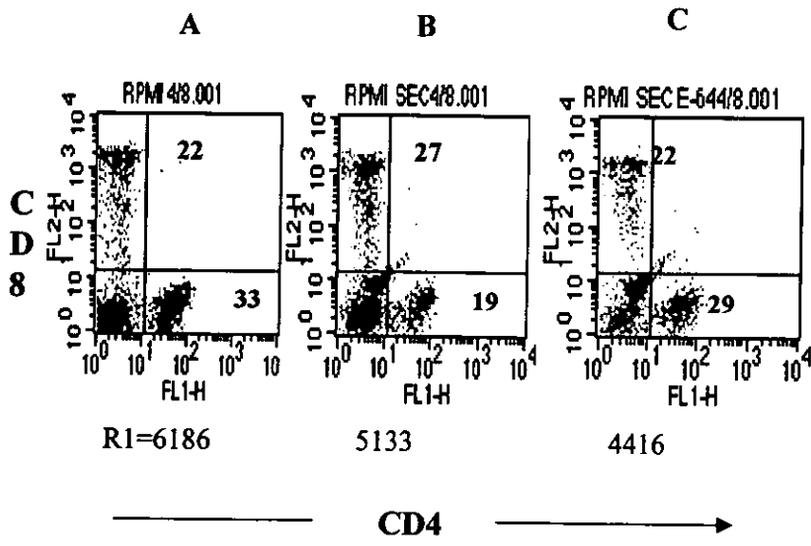


FIGURA. 8 EFECTOS INDUCIDOS POR LOS E/S INHIBIDOS CON E-64 SOBRE LINFOCITOS HUMANOS TCD4⁺.
 Análisis por citometría de flujo de linfocitos cultivados en RPMI ,5mM L-cisteina con o sin 100µg de E/S ó E/S-E64 durante 2h a 37°C,5 %CO₂.
 El panel A muestra el análisis por citometría de flujo de células cultivadas en RPMI, el panel B muestra el análisis por citometría de flujo de células cultivadas con E/S y el panel C Análisis por citometría de flujo de células cultivadas en presencia de productos de ES inhibidos con E-64. Los valores señalados están dados en % derivado de la regionalización de linfocitos (R1). Cada plot representa la adquisición de 10000 eventos.

EFFECTO DE LOS E/S EN LA SÍNTESIS DE INTERLEUCINAS SOBRE LINFOCITOS HUMANOS

Se trataron linfocitos con los E/S durante dos horas para permitir su interacción ante las secreciones, cuando se analizaron por citometría de flujo se pudo corroborar la disminución de la población de linfocitos T CD4+ (figura A y B).

Cuando estas células se incubaron ahora con Con A durante 48 h se observó que, los linfocitos tratados con E/S fueron capaces de responder al estímulo con Concanavalina A. Por lo que cuando las células marcadas con anti CD25/anti CD4 se analizaron por citometría de flujo, el número de células estimuladas tanto en RPMI, Con A y E/S - Con A aumenta hasta cinco veces más comparado con células no estimuladas con Con A (Figura 9 C y D). Mientras que el monitoreo de producción de citocinas intracelulares como IL-2, IFN γ , e IL-4, se observó que linfocitos tratados con los E/S y estimulados con Con A producen menos IL-2 e IFN- α en comparación con linfocitos estimulados con Con A con valores de P= 0.001 y P= 0.007 respectivamente, (Figuras 10 y 11)., Mientras que linfocitos tratados con los E/S y estimulados con Con A produjeron en uno de dos experimentos, mayores niveles de IL-4 con respecto a linfocitos tratados sólo con Con A. (Figura 12); El análisis estadístico para la confiabilidad de los datos se obtuvo de la aplicación de tablas de contingencia 2X2 con Chi cuadrada.

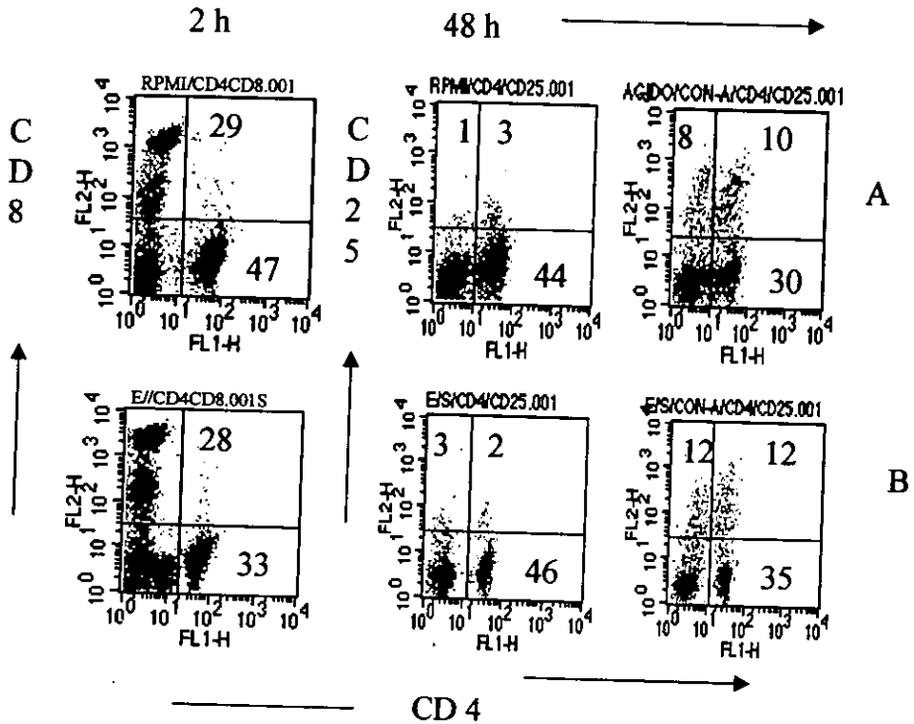


FIGURA. 9 EFECTO DE E/S DE METACÉSTODOS DE *Taenia solium* SOBRE ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA. Linfocitos enriquecidos se cultivaron por 2 horas en medio RPMI y E/S en condiciones reductoras, 3×10^5 células de cada tratamiento se lavaron y tiñeron con MoAb-FITC anti CD4 /MoAb-PE anti CD8, el resto de las células se incubaron de nuevo durante 48 horas en medio RPMI, RPMI concanavalina A (Con A), E/S y E/S Con A a 37°C y 5% CO₂, 3×10^5 células de cada tratamiento fueron lavadas y teñidas con MoAb-FITC anti CD4 /MoAb-PE anti CD25, el cuadrante superior izquierdo representa las células marcadas con PE el cuadrante superior derecho representa las células con doble marca (PE y FITC) y el cuadrante inferior derecho las células marcadas con FITC. Los valores señalados están dados en % derivado de la regionalización de linfocitos (R1) Cada plot representa la adquisición de 10000 eventos.

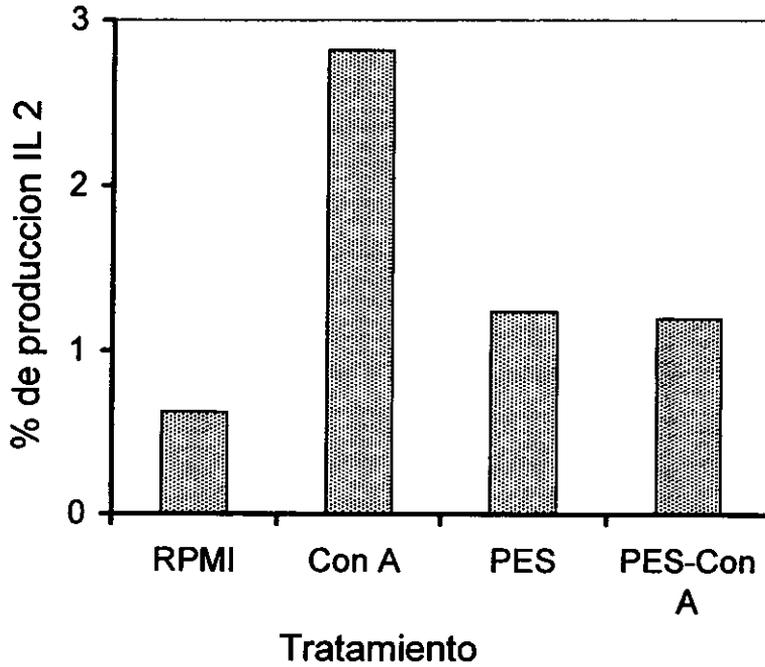


FIGURA. 10 Producción de IL-2 en linfocitos humanos tratados *in vitro* con E/S, se presentan los valores en porcentajes de 10,000 eventos analizados por citometría de flujo para la población CD4⁺ / CD8⁺.

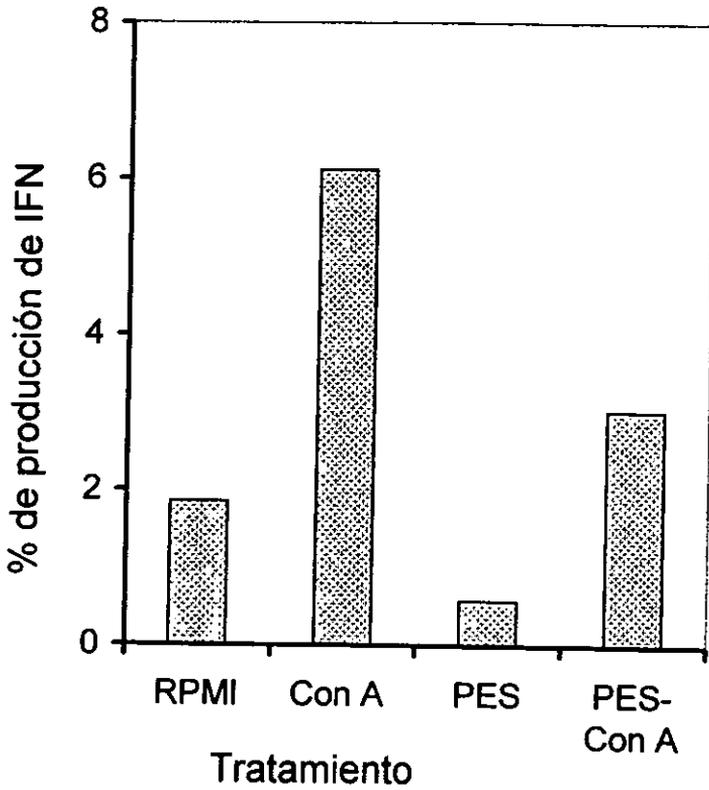


FIGURA. 11 Producción de IFN γ en linfocitos humanos tratados *in vitro* con E/S, se presentan los valores en porcentajes de 10,000 eventos analizados por citometría de flujo para la población CD4⁺ / CD8⁺.

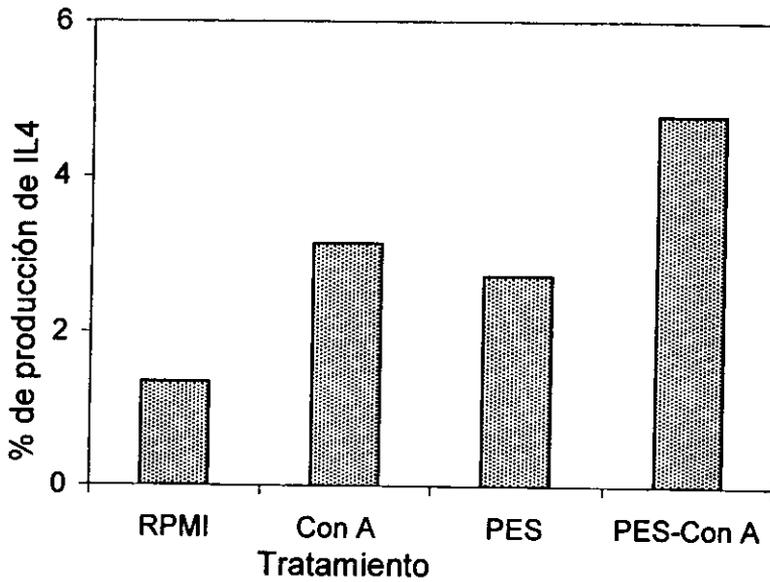


FIGURA. 12 Producción de IL-4 en linfocitos humanos tratados *in vitro* con E/S, se presentan los valores en porcentajes de 10,000 eventos analizados por citometría de flujo para la población CD4⁺ / CD8⁺.

DISCUSIÓN

La liberación *in vitro* de E/S por parte de los parásitos es de considerable interés, ya que se presume que estos productos son liberados *in vivo*. Avances recientes con el fin de entender la bioquímica y biología molecular de los parásitos han llamado la atención particularmente sobre moléculas que son la clave en su ciclo de vida o de la patogénesis. Un grupo de enzimas que están involucradas en estos procesos son las proteasas derivadas de parásitos (MacKerrow et al. 1993). Diferentes tipos de proteasas son frecuentemente expresadas en diferentes estadios del ciclo de vida de los parásitos por ejemplo: ensayos realizados *in vitro* para observar la degradación sobre la matriz extracelular, han mostrado que el daño al tejido es atribuido a *Haemonchus contortus* ya que degrada colágena y elastina (Mckerrow 1989). Estadios larvales de *Schistosoma mansoni*, *Onchocerca sp.* y *Strongyloides stercoralis* utilizan proteasas para atravesar la capa epidérmica, membrana basal, tejido conectivo dérmico y paredes de vasos sanguíneos, estas proteasas han sido caracterizadas como del tipo serina y metaloproteasas (Lackey et.al 1989). Las proteasas de tenidos que se han registrado, corresponden a peptidasas del tipo serina, cisteina y aminopeptidasas probablemente involucradas en la invasión de la mucosa intestinal del hospedero intermediario por oncosferas de *T. saginata* (White 1996). La caracterización de

proteasas de *T. solium* ha mostrado peptidasas del tipo tiol, serina, metalo y aspártico, todas ellas identificadas en los E/S mediante substratos fluorogénicos, cromatografía de filtración por gel ó zimogramas con substratos hidrolizables (White et al. 1992, Molinari et al. 2000).

Actualmente, la electroforesis en geles con substratos es la principal técnica de tipo analítico (cualitativo) usada para detectar proteasas, las ventajas que ofrece esta metodología incluyen la posibilidad de detectar específicamente proteasas activas de un extracto crudo complejo (zimogramas), sin la necesidad de someter a purificación preliminar (Michaud 1998). Las proteínas más ampliamente utilizadas como substrato para la detección de proteasas separadas por electroforesis son proteínas comercialmente disponibles como gelatina, caseína, albúmina sérica bovina o hemoglobina.

Particularmente, las proteasas identificadas en los E/S de metacéstodos de *T. solium* por medio de zimogramas utilizando gelatina como substrato, mostraron la presencia de al menos dos enzimas secretadas activamente, una de ellas que hidroliza la gelatina a pH 5.5 en medio reductor, se inhibe con E-64 y migra aproximadamente entre los 35 y 45 Kda. Esta proteasa, por sus características de hidrólisis, probablemente pertenece a la familia de las tiol

proteasas ya que estas enzimas se caracterizan por actuar de pH ácido a básico siendo su óptimo de pH 4.5-5.5 (MacKerrow et al. 1993). Esta característica favorece a la enzima y por supuesto al parásito para actuar en un mayor número de sitios del hospedador, siempre y cuando las condiciones reductoras estén presenten de manera favorable, ya que de lo contrario si el grupo tiol del sitio activo es oxidado pierde esta enzima su capacidad proteolítica. La otra enzima activa identificada en geles con substrato es una proteína con una masa superior a los 70 Kda, su mayor actividad proteolítica es a pH básico pero no se inhibe completamente cuando es incubada con EDTA (datos no mostrados). De manera similar en el extracto crudo de E/S de metacéstodos de *T. solium* se caracterizaron dos proteasas secretadas activamente cuando se utilizaron substratos sintéticos fluorogénicos, la actividad específica observada con el substrato Z-Phe-Arg-AFC se intensificó de 78 a 384 nmoles liberados sólo cuando el buffer de reacción contenía cisteína a pH ácido y se inhibió hasta un 98% cuando se incubó con E-64. Estas propiedades son características de la familia de las cisteína proteasas, las cuales presentan un grupo tiol que es esencial para la actividad proteolítica, además de requerir agentes reductores como L-cisteína, DTT, o 2 mercaptoetanol *in vitro*, para facilitar la conformación óptima y

aumentar su actividad. Debido a que los grupos tiol a menudo son bloqueados de forma natural o experimental, la hidrólisis de Z-Hbr-Arg-AFC no se observó en presencia de EDTA, y con E-64 solo se inhibió un 15%, lo que sugirió la presencia de una metaloproteasa. Sin embargo, no se detectó actividad proteolítica para serina proteasa mediante el uso de sustrato fluorogénico lo que hace suponer que, esta enzima es sintetizada por el metacésto en menor cantidad bajo las condiciones en las que obtienen los productos de E/S. Con el empleo de sustratos sintéticos fluorogénicos específicos para identificar enzimas de las familias tiol, metalo y serina proteasas se confirmó de manera más precisa la presencia de cisteína y metaloproteasas presentes en los extracto crudo de E/S. Esto hace suponer que las dos enzimas que se identificaron por zimogramas corresponden a proteasas de las familias cisteína y metaloproteasas.

En lo que respecta a proteasas de *T. solium* se cuenta con una aproximación del posible papel biológico que pudieran jugar *in vivo*. White et al. (1992) han demostrado la participación de una cisteína proteasa que hidroliza Z-Phe-Arg-AFC, y hemoglobina, también se han caracterizado aspartilproteasas inhibidas por pepstatina y metaloproteasas inhibidas por EDTA, todas ellas presentes en extractos de metacésto de *T. solium*. Por otra parte, Molinari et al. (2000) han

caracterizado proteasas de *T. solium* de las familias serina, tiol y metalo mediante el uso de substratos fluorogénicos, inhibidores específicos y por zimografía.

Una serie de experimentos que se han venido realizando con E/S de parásitos en células humanas han demostrando, sin lugar a dudas, la participación de las proteasas como moléculas de modulación de la respuesta inmune de hospederos.

Los cisticercos de *T. solium* viven por años modulando la respuesta inmune del hospedero (White 1997) sin embargo, infecciones con oncosferas de *Taenia* son asociadas con la depresión de la respuesta inmune. Por ejemplo, cerdos infectados con huevos de *T. solium* tienen disminuidos el número de células CD4⁺ en sangre periférica (Molinari et..al. 1987). Sin embargo, la respuesta inmune es reactivada cuando el cisticerco muere, observándose un considerable aumento de la reacción inflamatoria alrededor del cisticerco.

Es importante subrayar que el tipo de respuesta inmunitaria hacia el cisticerco depende principalmente de la respuesta inmune celular para *T. solium* y *T. crassiceps* (Molinari et.al 1983a, Molinari et al. 1983b, Robinson et.al 1997). En lo particular, los ensayos realizados con E/S con el propósito de conocer el efecto de las proteasas liberadas por *T. solium*, sugieren que el decremento de células

inmunes sea un factor central de la inmunomodulación. El número de eosinófilos también disminuyó cuando E/S fueron añadidos a sangre total (Figuras 2B R3). La población de linfocitos T CD4⁺ humanos tanto purificados como de sangre total periférica (tratada *in vitro* con E/S) disminuyeron en función del tiempo. Este evento pudiera alterar de manera directa la respuesta inmune celular *in vivo* debido a que las células T cooperadoras están íntimamente relacionadas con la expulsión de parásitos intestinales como ya se ha reportado para *T. muris*, *Trichinella spiralis* (Grencis, Reidlinger & Wakelin 1985) y en *Nippostrongylus brasiliensis* (Katona, Urban y Fikelwan 1985).

Así mismo, de acuerdo a las cinéticas, en donde se utilizaron anticuerpos fluorosceinados anti CD4/ anti CD8 y anti CD19/anti CD4, se observó la recuperación del porcentaje de células T CD4⁺, pero no así del número de eventos, lo que sugiere los E/S probablemente hidrolizan el receptor CD4⁺ y cuando estas células son adquiridas por citometría son contabilizadas pero muchas de ellas no presentan el marcador CD4⁺ por lo que el anticuerpo fluoresceinado no se une al receptor y esto provoca la disminución en la población. Este no es el único evento que puede provocar la disminución de la población T CD4⁺, ya que se ha reportado que los productos de E/S de otros

parásitos inducen apoptosis en diferentes tipos celulares. También se observó decremento en el número de eventos registrados sobre todo entre la segunda y tercera hora, que es el tiempo en que se registran los valores más bajos de marcadores T CD4⁺. Ensayos análogos realizados con E/S han demostrado la hidrólisis de las moléculas CD4⁺ desde la séptima hasta las 24 horas. Esto sugiere que el tiempo, la actividad enzimática, el impedimento alostérico y algunos componentes en los E/S de cada parásito repercuten de forma diferente cuando entran en contacto con diferentes células.

El análisis de los experimentos realizados sugiere a una proteasa de la familia de la cisteína responsable del efecto de la disminución de la población T CD4⁺, ya que cuando se llevaron a cabo ensayos con E/S pre-incubados con E-64, la población de linfocitos T no sufrió alteración en su población.

Estudios con proteasas de otros parásitos han demostrado la disminución de receptores y la participación de una cisteína proteasa que hidroliza moléculas CD14⁺ de monocitos humanos (Shunji Takahisa and Takada 2000). La subunidad alfa CD25⁺ de células T humanas es hidrolizada por una cisteína proteasa de *Dermatophagoides pteronyssinus* y como resultado de esto, las células mostraron marcada disminución en su proliferación. Otro ejemplo, es el

de una metaloproteasa de *Leishmania major* y de *L. donovani* que rompen moléculas CD4⁺ de células T humanas (Hey, Kharazim et al 1994).

Otro evento en el cual están involucrados los linfocitos T CD4⁺ corresponde a la producción de interleucinas como moléculas mediadoras responsables de promover diferentes reacciones inmunopatológicas (Romangnani 1994; Grecis 1993). Específicamente, en los ensayos realizados con E/S de metacéstodos de *T. solium* con linfocitos humanos *in vitro*, se obtuvo activación y proliferación de linfocitos, estos resultados mostraron que al menos una enzima (cisteína proteasa) en los E/S de metacéstodos de *T. solium*, disminuyen significativamente el número de linfocitos T CD4⁺ *in vitro*. Lo que sugiere que el parásito (metacéstodo) puede liberar en el huésped intermediario, las enzimas caracterizadas en este trabajo por lo que *in vivo* podrían estar modulando la respuesta inmune del huésped a través de disminuir importantemente linfocitos T CD4⁺ en los tejidos adyacentes a la ubicación del parásito, principalmente en el sistema nervioso central lo que le permitiría al parásito sobrevivir mucho tiempo en su huésped.

Por otro lado, se observó mayor síntesis de interleucina IL-4 y en menos cantidad de IL-2 e IFN- γ en células tratadas con E/S y estimuladas con Con A, lo que se

pudiera deber a que el número de eventos de la población de las células CD4⁺ se ve disminuído. Se tendrían que realizar experimentos para determinar si existe una polarización real inducida por la incubación con los E/S, por lo pronto no tenemos datos experimentales que apoyen esta hipótesis. Lo que sí está claro es que, los E/S no afectan la producción de citocinas inducida por mitógenos.

CONCLUSIONES

La actividad proteolítica de cisteína proteasa caracterizada por estudios de zimografía y ensayos con substratos sintéticos fluorogénicos sugiere que esta enzima es la responsable de la disminución de linfocitos T CD4⁺ humanos, ya que cuando los E/S son inhibidos con E-64 no se observa dicho evento.

A pesar del efecto de la cisteína proteasa sobre los linfocitos T CD4⁺, éstas células son capaces de responder a estímulos como la Concanavalina A promoviendo la proliferación y síntesis de moléculas mediadoras de la respuesta inmune.

La cisteína proteasa secretada por metacestodos de *T. solium* parece estar íntimamente relacionada con la evasión de la respuesta inmune hacia su hospedador debido al tipo de moléculas que hidroliza.

REFERENCIAS

- Arachavaleta, F., Molinari, J. L. and Tato, P. 1997. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecific inhibits cytokines production. *Parasitol.Research.* 84:117-122.
- Auriault, C., Joseph, M., Dessaint, J. P., and Capron, A. 1980. Inactivation of rat macrophages by peptides resulting from cleavage of IgG by *Schistosomma* larvae proteases. *Immunology Letters.* 2 :135-139.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Carmona,C. Dowd,A.J. Smith, A.M.and Dalton, J.P. 1993. Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to new excysted juveniles. *Mol. Biochem.parasitol.* 62 : 9-18
- Craig, F. and Faust, R. *Parasitología clínica* Salvat México 1981 : 502-509.
- Davis, S. W. and Hammerberg, B. 1988. Activation of the alternative pathway of complement by larval *Taenia taeniformis* in resistant and susceptible strains of mice. *Int. J Parasitol.* 18 :591-597.
- Gawble, H. R., Anderson, W. R., Grahaw, C. E., and Murell, K. D. 1983. Diagnosis of swine *Trichinosis* by Enzymes Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Vet Parasitol.* 13: 349-361.
- Grencis, K. R. 1993. Cytokine mediated regulation of intestinal helminth infections: The *Trichuris muris* model. *Annu, Trop. Med. And Parasitol.* 87 : 643-647.

- Grewal, S. J., Kur, S., Bhatti, G., Singh, I. M., Ganguly, N. K., Majan, R. C. and Malla, N. 2000. Cellular immune responses in human neurocysticercosis. *Parasitol. Res.* 86 : 500-503.
- Grisolia, S., and Widerholt, W. C. 1982. CNS Cysticercosis. *Arch. Neurol.* 39 : 540-544.
- Harrison, L. J. and Sewell, M. H. 1981. antibody levels in cattle naturally infected with *Taenia saginata* metacestodes in Britain. *Res vet science.* 31: 62-64.
- Hawerberg, B and Williams, J. F. 1978. Interaction between *Taenia taeniformis* and the complement system. *J Immunol.* 120 :1033-1038.
- Heath, D. D., Lawrence, S. B., Glennie, A. and Twaalfhoven, H. 1985. The use of the escretory and secretory antigens of the scolex of *Taenia ovis* for the serodiagnosis of infection in the sheps. *J. parasitol.* 71:192-199.
- Heinzel, F. P., Sadick, M.D., Holaday, B. J., Coffman, R. L. and Locksley, R. M. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or Interleikin 4 during the resolution of progression of murine Leishmaniasis., *J. Exp. Med.* 169 : 59-72.
- Hill, P.E. and Sakanari, J.A. 1997. Trichuris suis. TioI protease activity from adult worms. *Exp Parasitol.* 85 : 55-62.
- Hill, D.E., Gawble, H.R., Rhoads, M.L., and Urban, J.F., 1993. Trichuris suis: A zinc metalloprotease from culture fluids of adult parasites. *Exp. Parasitol.* 77:170-178.
- Hey, A S., Theander, T. G., Hviid, L., Hazati, M. S., Kemp, M. and Kharazmi, A. 1994. The Mayor surface Glycoprotein (gp63) from *Leishmania mayor* and *L donovani* cleaves CD4⁺ Molecules on human T cell. *J Immunol.* 152 :4542-4548.
- Hoez, P. J., and Ceraw, A. 1983. Secretion of a proteolytic anticoagulant by Ancylostoma hookworms. *J Exp Med.* 157: 1594-1603.

- Kong, Y., Chung, Y. B., Cho, S. Y. and Kang, S. Y. 1994. Cleavage of immunoglobulin G by excretory/secretory Cathepsin S -like protease of *Spirometra mansoni*. *Parasitol.* 109 :611-621.
- Laemmli, U.K. 1970 cleavage of a structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685
- Lackey, A., James, E. R., Sakanari, J. A., Resnick, S. D., Brown, M., and Mckeroow, J.H. 1989. Extracellular proteases of *Onchocerca* . *Exp. Parasitol.* 68 :176-185.
- Laclette, J. P., Lamda, A., Arcos, C., Willms, K., Davis, A. E. and Shoemaker, C. B. 1991. Paramyosin in the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44 : 287-295.
- Laclette, J. P., Shoemaker, C. B. and Richter, D. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. immunol.* 148 : 124-128.
- Lantz, S. M. and Ciborowsk, P. 1989. Zimographic techniques for characterization of proteases. *Clin. Chem. Acta.* 185 : 357-392.
- Lewert, R. M. and Lee, C. L. 1956. Quantitative studies of the collagenase like enzymes of cercariae of *Schistosoma mansoni* and the larvae of *Strongyloides ratti* . *J infect Diseases.* 99 :1-4
- Mansfield, L.S. and Urban, J.F., Jr. 1995. The pathogenesis of necrotic proliferative colitis in swine is linked to whipworm induced suppression of mucosal immunity. *Exp. Parasitol.* 66 : 135-143.
- McCormick, G., Zee, C. and Herden. 1982. Cysticercosis Cerebri. *Arch. Neurol.* 39 : 534-539.
- Makerrow, J. H. Jones, P. Sage, H., and Pino-Heiss, S. 1985. Proteinases from invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective tissue and basement membrane macromolecules . *Biochem.J.* 231 : 47-51.

- Mckerrow, J. H. 1987. The role of proteases in the pathogenesis and immune response to parasite disease. *Mol strateg parasitic invasion* 19 : 553-557.
- Mckerrow, J. H., and Doenhoff, M. 1988. *Schistosoma* proteases. *Parasitol. Today* . 12 : 334-339.
- Mckerrow, J. H. 1989. Parasite Proteases. *Exp. parasitol* . 68 : 111-115.
- Michaud, D . 1998. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. *Anal. Chem. Acta.* 372 : 172-185.
- Moczon, T. 1996. A serine proteinase in the penetration glands of the hexacanth of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda Cyclophyllidea). *Parasitol. Res.* 82 : 67-71.
- Molinari, J. L., Meza, R., Suarez, B., Palacios, S., Tato, P., Renata, A., 1983a *Taenia solium* . Immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasitol.* 55: 340-357.
- Molinari, J. L., Meza, R., Tato, P. 1983b. *Taenia solium* : Cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in Naturally Parasitized immunized Hogs. *Exp. Parasitol.* 56 : 327-338.
- Molinari, J. L., Tato, P., Aguilera, L. R., and White, A .C Jr. 1993 . Effects of serum from Neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* Oncospheres. *J.Parasitol.* 79 : 124-127.
- Molinari, J. L., Tato, P. and Valles, Y. 1987. Immunodepression of T lymphocytes in pigs modulated by cysticercus cellulosae. *Rev. Lat.Microbiol.* 29 : 293-300.
- Molinari, J. L., Mejia, H., White, A. C Jr., Garrido, E., Borgonio, V. M., Baig, S., and Tato, P. 2000. *Taenia solium*: A Cysteine Protease Secreted by Metacystodes Depletes human CD4⁺ Lymphocytes in Vitro. *Exp. Parasitol.* 94 : 133-142.
- Ng, T. F. and Ko, R. C. 1994. Serodiagnosis of cysticercosis specificity of different antigens and ELISAs. *Trans.Trop. Med. Hyg.* 88 :421-422.

Referencias

- Picker, J. L., Singh, M. K., Zdraveski, Z., Treer, J. R., Waldrop, S. L., Bergstresser, P. R., Maino, V. C. 1995. Direct Demonstration of Cytokine Synthesis Heterogeneity Among human Memory/Effector T Cell By flow Cytometry. *The Amer Haematol* . 86 :1408-1419.
- Rabiela, M.T., Rivas, A., Rodríguez, J., Castillo, S., and Cansini, F. 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis present state of knowledge and perspectives. A. Flisser, K. Willms., J.P. Lacleste. C. Larralde. C. Ridaura. And F. Beltran New York. Academic press. 179-199.
- Richards, f., Shantz, P., Ruiz, E., and Sorvill, O. F., 1985. Cysticercosis in the Angeles Country. *J. Med.Assoc.* 254 : 3444-3448.
- Romangnani, S., 1994. Lymphokine production by human T cells in Disease states. *Annu.Rev.Inmunol.* 12 : 227-257.
- Robinson, P., Atmar, R. L., Lewis, D. E., White, A. C Jr. 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect Immun.* 65 : 2925-2931.
- Rojas, W.G., Tato, P., Solano, S., Herrera, M., Gutiérrez, Q. M., Salazar, P.M. 1994. Immune humoral response in pigs infected with eggs and posoncospheres of *Taenia solium* *Bol. Chil.Parasitol.* 54 : 57-62.
- Sagawara, S., Nemoto, E., Toda, H., Miyake, K., Imamura, T., and Takada, H. 2000. Proteolysis of human Monocyte CD14+ by Cisteine proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* Leading to Lipopolysaccharide Hyporesponsiveness. *J. immunol.* 165 :411-418.
- Salgado, P., Rojas, R., Sotelo, J., 1991. Cysticercosis Clinical clasificaciomm based on imagin studies. *Arch.Intern. Med.* 157 (22) 1991-1997.
- Sarti, E. 1989a. Epidemiología de la teniasis y cisticercosis. En Flisser, A., Malagón, F (Eds). *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México.* Edit. Limusa Noriega. Méx. 233-242.

Referencias

- Sarti, E. 1989.b La teniosis y cisticercosis en México. *Rev Salud Pública. México.* 39: 225-231.
- Scott, P, Pearce, E., Cheever, A. W., Coffman, L. R., & Sher, A. 1989. Role of Cytokines and CD4 T cell subsets in the Regulation of Parasite Immunity and disease. *Inmunol Reviews.* 112. 160-182.
- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R. L., Pearce, E and Sher, A. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines That transfer protective immunity or exacerbation belong to different helper subset and respond to distinct parasite antigen. *J. Exp. Med.* 168 : 1675-1684.
- Scott, P., Caspar, P. and Sher, A 1989. Protection against *Leishmania mayor* in BALB/C mice released by promastigote. *J. Immunol.* 68 : 1242-48.
- Shepherd, J.C., Aitken, A., McManus, P.P. 1991. A protein secreted *in vitro* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *J. Exp. Med.* 44 : 81-90.
- Sotelo, J. 1988. Cysticercosis *Handbook clinical Neurobiol.* 8 (52). 529-534.
- Shulz, O., Sewell, H. F., and Shakib, F. 1998. Proteolytic cleavage of CD25 , The alfa Subunit of the human T cell interleukin 2 Receptor, by Der p1, a Mayor mite Allergen whit Cysteine Protease activity. *J. Exp. Med.* 187 : 271-275.
- Souza, P. E., and Haffezz, M. D. 1999. Detection of *Taenia solium* Cysticercosis in the pigs by elisa Whith an excretory secretory antigen. *Vet Res Comun.* 23 : 293-298.
- Tato, P., Valles, Y., Molinari, J. L. 1987. Inmunodepresión de linfocitos T en cerdos modulada por *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29 : 293-302.
- Tato, P., White, Jr. Clinton ., Willms, K., Rodriguez, D., Solano, S., Sepulveda, J., Molinari, J. L. 1996. Inmunosuppression and anhibition of inflamation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA- peptide to implanted *T. solium* metacercostodes. *Parasitol. Res.* 82 : 590-597.

- Villagrán, J., Rabiela, J. E ., 1988. Cisticercosis humana estudio clínico y patológico de 481 casos de autopsia. *Patolo.* 26 : 149-156.
- White, A. C Jr., Tato, P., Molinari, J. L. 1992. Host - Parasite interactions in *Taenia solium* Cysticercosis. *Infet. Agents and Disease* .1 : 185-193.
- White, A. C Jr., Baig, S. and Robinson, P. 1996. *Taenia saginata* oncosphere excretory/secretory peptidases. *J. parasitol.* 82 : 7-10.
- White, A. C Jr., Baig, S.. and Cappell, C. I. 1997 Characterization of a cysteine protease from *Taenia crassiceps* cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 85: 243-253
- Willms, K., and Merchant, M. T. 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: Ultrastructural and light microscopic observation. *Parasite immunol.* 2 : 261-275.