

03062

3

24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

FALLA DE ORIGEN

Estudio de la internalización de macromoléculas en
cisticercos de Taenia crassiceps.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

JAVIER ROLANDO AMBROSIO HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. JUAN PEDRO LACLETTE

CIUDAD UNIVERSITARIA, MEXICO DICIEMBRE DE 1991.



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
I. INTRODUCCION	
1. Ciclo de vida de la <u>Taenia solium</u> .	1
2. La Teniasis/Cisticercosis como un problema de salud pública.	4
Cisticercosis.	5
Neurocisticercosis.	5
3. Cisticercosis murina como modelo experimental de la cisticercosis humana y porcina.	6
4. Morfología de los cisticercos de <u>T. solium</u> y <u>T. crassiceps</u> .	8
Tegumento.	12
Glicocálix.	13
5. Adsorción de macromoléculas en la superficie.	14
6. Internalización de macromoléculas del huésped.	15
II. OBJETIVOS.	18
III. MATERIALES Y METODOS.	
1. Cisticercos.	19
2. Purificación de las Inmunoglobulinas.	19
3. Yodación de proteínas.	21
4. Métodos para microscopía de fluorescencia.	22
5. Métodos para microscopía electrónica.	24
6. Internalización de proteínas marcadas radioactivamente en cisticercos.	26
Cinética de la internalización.	26
Saturabilidad de la internalización.	27
Influencia de la temperatura sobre la cinética de la internalización.	28
7. Internalización de proteínas no marcadas radioactivamente.	28

8. Caracterización morfológica de la internalización en cisticercos.

Endocitosis en cisticercos de <u>T. crassiceps</u> .	29
Endocitosis fluida.	30
Endocitosis adsortiva.	31
Endocitosis mediada por receptores.	32

IV. RESULTADOS. 34

1. Internalización de proteínas marcadas radioactivamente.

Cinética de la internalización.	34
Saturabilidad de la internalización.	36
Influencia de la temperatura sobre la cinética de la internalización.	39

2. Internalización de proteínas no marcadas radioactivamente. 39

3. Caracterización morfológica de la internalización en cisticercos. 42

Endocitosis Fluida.	42
Endocitosis Adsortiva.	45
Endocitosis mediada por receptores.	52

V. DISCUSION. 57

VI. REFERENCIAS. 68

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de la <u>Taenia solium</u> .	2
Figura 2. Ciclo de vida de la <u>Taenia crassiceps</u> .	7
Figura 3. Pared vesicular de un cisticerco. Corte semifino observado en microscopía de luz.	9
Figura 4. Pared vesicular de un cisticerco. Corte fino observado en microscopía electrónica.	10
Figura 5. Cisticercos de <u>Taenia crassiceps</u> cepa ORF recuperados de la cavidad peritoneal de ratones infectados.	11
Figura 6. Cinética de internalización de proteínas hacia el fluido vesicular.	35
Figura 7. Saturabilidad del sistema de internalización.	38
Figura 8. Influencia de la temperatura sobre la internalización de proteínas y sobre la radioactividad unida a proteínas internalizadas.	40
Figura 9. Cinética de internalización de una proteína no marcada radioactivamente. Medición de la actividad enzimática de HRP en tejido larvario, fluido vesicular y en el medio de cultivo.	41
Figura 10. Capacidad de endocitosis fluida. Cortes semifinos de cisticercos incubados en ausencia o en presencia de Dextrán-FITC y vistos al microscopio de fluorescencia.	43
Figura 11. Capacidad de endocitosis fluida. Micrografías electrónicas de cortes finos de cisticercos incubados a diferentes tiempos en presencia de oro coloidal.	44
Figura 12. Internalización de peroxidasa de rábano (HRP). Micrografías electrónicas de cortes de cisticercos incubados en ausencia ó en presencia de HRP.	46

- Figura 13. Cinética de la endocitosis adsortiva. Cortes semifinos de cisticercos incubados en presencia de BSA-FITC a diferentes tiempos de incubación y observados al microscopio de fluorescencia. 47
- Figura 14. Endocitosis adsortiva en cisticercos incubados con rojo de rutenio. Micrografías electrónicas en las que se observa la formación de microvesículas. 49
- Figura 15. Endocitosis adsortiva en cisticercos incubados con rojo de rutenio. Micrografías electrónicas en las que se observan gránulos densos en diferentes regiones del tejido parasitario. 50
- Figura 16. Endocitosis adsortiva en cisticercos incubados con ferritina cationizada. Micrografías electrónicas en las que se observan partículas de ferritina cationizada en diferentes regiones del tejido parasitario. 51
- Figura 17. Endocitosis mediada por receptores. Cortes semifinos de cisticercos incubados a diferentes tiempos en presencia de IgG anti-ratón-FITC. 54
- Figura 18. Endocitosis mediada por receptores. Micrografías electrónicas de cisticercos incubados con proteína A-HRP. Se observa al marcador electrodenso dentro de diferentes regiones del tejido parasitario. 56

I. INTRODUCCION

El cisticerco de la Taenia solium es el agente causal de la cisticercosis humana y porcina. El cisticerco (del griego: kystic: vesícula y kercos: cola) es una forma intermedia o de metacéstodo en el desarrollo que sigue el embrión hexacanto para convertirse en el gusano adulto o solitaria. T. solium es un parásito capaz de generar dos formas de enfermedad en el ser humano, y éstas dependen de la fase del parásito que infecta al huésped: la forma adulta o solitaria causa teniasis y la forma larvaria o cisticerco causa la cisticercosis. El único huésped definitivo natural de la T. solium es el ser humano y la prevalencia de la teniasis/cisticercosis depende exclusivamente del vínculo que el hombre establece con los animales y en particular con el cerdo.

1. Ciclo de Vida de la Taenia solium (Fig. 1).

En condiciones naturales, la T. solium o solitaria habita únicamente en el intestino delgado del ser humano. La solitaria está constituida por un escólex o cabeza, que en su parte inferior se adelgaza para formar un cuello, a partir del cual se producen los proglótidos o segmentos. El conjunto de proglótidos unidos entre sí en cadena se denomina estróbilo. Los proglótidos más cercanos al cuello son más jóvenes e indiferenciados. A su vez, los más distantes están totalmente diferenciados y contienen



Figura 1. Ciclo de vida de la *Taenia solium*. (Tomado de Aluja et al., 1987).

un gran número de huevecillos (~50000 c/u), por lo que se dice que se encuentran grávidos. Los proglótidos grávidos, desprendidos espontáneamente por el gusano adulto (promedio de 4-5/día), son evacuados hacia el exterior en las materia fecal del huésped. La primera expulsión de proglótidos de la T. solium generalmente ocurre entre 62 y 72 días después de la infección. Después de quimioterapia, que no produce la expulsión del escólex, la evacuación de los proglótidos reaparece entre los 57 y los 61 días. La putrefacción de los proglótidos grávidos en el medio ambiente permite la liberación de los huevecillos que pueden alcanzar al huésped intermediario por distintos medios (Woodhouse et al, 1982).

Generalmente se acepta que la cisticercosis se adquiere al ingerir alimentos y líquidos contaminados con huevecillos, pero es posible que existan otros vehículos y mecanismos de transmisión (Woodhouse et al, 1982). En el tubo digestivo del huésped intermediario las enzimas proteolíticas y las sales biliares proveen la señal para la activación de la oncosfera (también llamada embrión hexacanto) contenida en el huevecillo. Una vez activadas, las oncosferas penetran la pared intestinal del huésped hasta alcanzar los capilares linfáticos y sanguíneos que las distribuyen a una variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético y cardíaco, cerebro, ojos, etc). Aunque se desconocen muchos eventos que ocurren después de la penetración de las oncosferas, se sabe que el embrión requiere de

cuando menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco (Hird y Pullen, 1979).

El ciclo se cierra cuando el ser humano ingiere carne cruda o insuficientemente cocida proveniente de un cerdo cisticercoso. Nuevamente, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, activan al cisticerco para que se fije en la pared intestinal donde crece y se diferencia hasta convertirse en una solitaria adulta productora de proglótidos grávidos (Aluja, 1987).

2. La Teniasis/Cisticercosis como un problema de salud pública.

La Teniasis/cisticercosis es un problema de salud complejo e importante en países de América Latina, Africa y Asia. La teniasis es una infección intestinal generalmente asintomática cuyo diagnóstico se realiza por detección de proglótidos o huevecillos en las heces. La solitaria puede sobrevivir en su huésped humano hasta por decenas de años y alcanza longitudes de varios metros. La cisticercosis en cambio, ocasiona pérdidas económicas por el decomiso y la destrucción de las canales de cerdo afectadas en países con deficiencias en la producción de proteínas de origen animal. Sin duda, el mayor problema es la cisticercosis en los cerdos criados rústicamente, donde es más difícil de controlar la transmisión, aunado a un mercadeo sin inspección veterinaria y a la práctica de matanza domiciliaria (Aluja, 1982).

Cisticercosis.

La cisticercosis puede afectar prácticamente cualquier tejido del huésped intermediario. El cisticerco de la T. solium se puede localizar en tejidos tan disímolos como tejido conectivo, músculo, parénquima cerebral y otros. Cuando se aloja en los ventrículos cerebrales o en el espacio subaracnoideo el cisticerco puede medir de 3 a 6 cm de diámetro, mientras que cuando se localiza en parénquima cerebral o en músculo mide alrededor de 0.5 cm. Las manifestaciones clínicas de la cisticercosis dependen del número y localización de los cisticercos y de la extensión y la severidad de la respuesta inflamatoria del huésped (Zenteno-Alanís, 1982).

Neurocisticercosis.

La localización más importante del cisticerco por la gravedad de la enfermedad que produce es, sin duda, el sistema nervioso central (SNC). Dentro del SNC, las localizaciones más frecuentes son la porción parenquimatosa del cerebro, el líquido cefalorraquídeo y la mixta. La neurocisticercosis puede adoptar distintas formas según la región del SNC, el grado y tipo de la inflamación del tejido del huésped, las estructuras neurales afectadas y las consecuencias anatómicas y fisiopatológicas que la presencia del parásito origina en el huésped (Zenteno-Alanís, 1982).

3. Cisticercosis murina como modelo experimental de la cisticercosis humana y porcina.

Los factores biológicos que determinan la sobrevivencia o destrucción del cisticerco dentro de su huésped son difíciles de estudiar en el hombre. El cerdo, huésped intermediario natural de la T. solium, aunque es el modelo ideal desde el punto de vista biológico, se ha usado poco en estudios experimentales de la cisticercosis debido a la dificultad de su manejo y a su alto costo. En cambio, la cisticercosis murina causada por la T. crassiceps es un modelo útil para una variedad de estudios sobre relación huésped-parásito en la cisticercosis (Fig. 2). Estos cisticercos son más pequeños que los de T. solium, pero tienen un gran parecido anatómico, especialmente en la pared vesicular que es la estructura involucrada en este trabajo de tesis. Varias son las ventajas de T. crassiceps; los cisticercos se mantienen fácilmente por pasaje intraperitoneal en ratones pudiéndose controlar el número de parásitos usados así como la edad de la infección (con lo que se evita la infección oral con huevos provenientes del parásito adulto). En cuanto al huésped, se pueden utilizar determinadas cepas murinas con lo cual la composición genética del huésped es homogénea (Freeman, 1962; Good et al., 1982; Williams, 1982; Larralde et al., 1989). Otra ventaja de usar T. crassiceps es la posibilidad de mantener los cisticercos indefinidamente en medio de cultivo complejo o en medios mínimos al

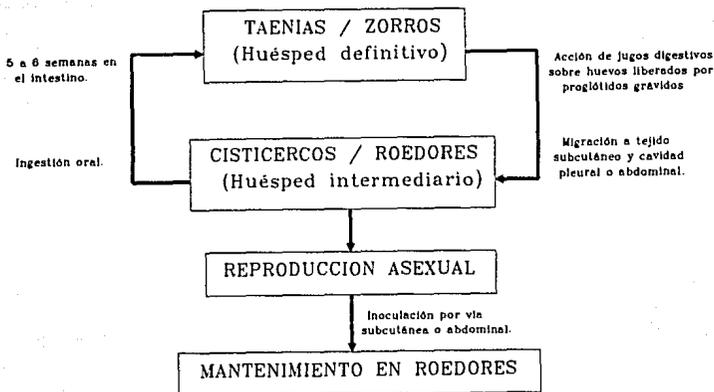


Figura 2. Ciclo de vida de la *Taenia crassiceps*. Se muestra el huésped intermediario y el definitivo. Se indica la etapa evolutiva del parásito y los factores que influyen en el desarrollo de los diferentes estadios evolutivos (Freeman, 1962).

menos por una semana. Esta posibilidad es especialmente conveniente para realizar los estudios que se describen en el presente trabajo.

4. Morfología de los cisticercos de T. solium y T. crassiceps.

Aunque existe una gran diversidad de metacéstodos (cisticercos, cisticercoides, plerocercoides, etc), ello no implica que exista diversidad en su citoarquitectura (Cheng, 1973; Lumsden et al., 1982). En las diferentes especies la vesícula difiere en tamaño y forma, sin embargo, la organización tisular es básicamente la misma. Cuando las paredes vesiculares del cisticerco de la T. solium o de la T. crassiceps son observadas con el microscopio de luz, varias son las estructuras más prominentes (Fig. 3). La capa más externa es un tegumento sincicial y continuo en toda la superficie externa de la pared. La membrana que delimita al tegumento hacia el interior del parásito es la lámina basal, bajo la cual se encuentra una capa muscular entre la que se observan los citones tegumentales y otros tipos de estructuras celulares como células flama y depósitos de glucógeno y lípidos. A nivel ultraestructural (Fig. 4), el tegumento presenta una membrana plasmática externa plegada en microtricas (similar a las microvellosidades de los ribetes de cepillo).

Una cepa de T. crassiceps llamada ORF (Fig. 5) no puede infectar a su huésped definitivo debido a que el cisticerco carece de escólex, por lo que se trata de una estructura puramente

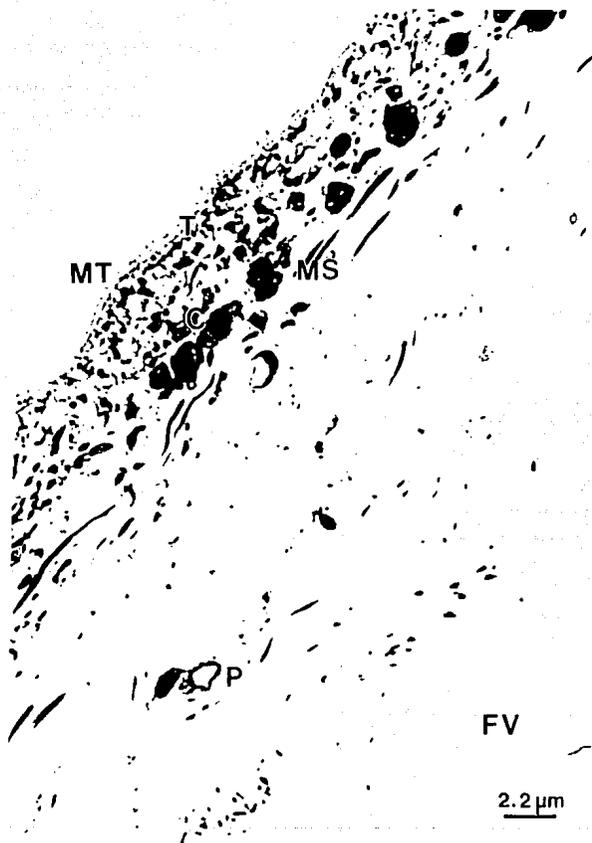


Figura 3. Pared vesicular de un cisticerco. Corte semifino observado en microscopía de luz. Microtricas (MT), tegumento sincicial (T), fibras musculares (MS), citones tegumentales (C), canales protonefridiales (P) y cavidad del fluido vesicular (FV).



Figura 4. Pared vesicular de un cisticerco. Corte fino observado en microscopía electrónica. Membrana plasmática (MP), microtricas (MT), tegumento sincicial (T), vesículas tegumentales (V), membrana basal (MB), intersticio (I), fibras de colágena (FC), puente citoplásmico (PC), citón tegumental (C), bolsa de glucógeno (G) y lípido (L).



Figura 5. Cisticercos de *Taenia crassiceps*. Cisticercos de la cepa ORF recuperados de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c a las 6 semanas de infección.

vesicular. Los cisticercos de la cepa ORF, se reproducen asexualmente por gemación y son fáciles de mantener en este estadio por pases sucesivos en roedores. Esta característica nos llevó a decidir su uso como modelo de estudio del presente proyecto de tesis.

Tegumento.

Dado que los céstodos carecen de un sistema digestivo, todo el intercambio (nutrición, excreción, secreción, etc.) de materiales con su(s) huéspedes se efectúa a través del tegumento. Además, el tegumento es una estructura primordial en la relación de estos parásitos con la respuesta inmune de los huéspedes.

Entre otras funciones, el tegumento ha sido implicado en las siguientes:

- a) Captación selectiva de materiales exógenos, incluyendo los nutrientes.
- b) Síntesis y secreción de materiales endógenos, incluyendo componentes de su membrana plasmática y glicocálix que tienen una función protectora.
- c) Regulación del balance de agua y electrolitos.
- d) Papel sensor.

La morfología de las microtricas ha generado sugerencias de su función: a) que la porción distal de cada microtrica sirva como medio de resistencia de la corriente intestinal y que sirva para agitar el microambiente en la vecindad de donde se mueve el

parásito, lo que generaría movimiento de los fluidos corporales del huésped así como nutrientes y otras sustancias (Threadgold y Dunn, 1983). La porción proximal de cada microtríca es medulada y puede servir como lugar de absorción (Cheng, 1973).

El sincicio está conectado a los citones tegumentales a través de puentes citoplasmáticos, estos puentes inicialmente son muy gruesos y pueden tener mitocondrias, cuerpos secretorios, y vesículas. Ellos también pueden presentar microtúbulos los cuales se proyectan profundamente en el citoplasma sincicial y además penetran dentro de los citones tegumentales. Los citones tegumentales son muy polimórficos, su núcleo tiene pocas áreas de heterocromatina y un simple nucleólo largo y granular. El citoplasma contiene pocas mitocondrias, abundante retículo endoplásmico liso asociado con varios aparatos de Golgi por célula.

Glicocálix.

Análisis histoquímicos de los cisticercos de T. solium muestran que la superficie externa de la membrana plasmática del tegumento posee un abundante glicocálix. En ocasiones, un glicocálix fibroso se observa interconectando las microtrícas a través de filamentos largos y delgados (Ramírez-Bon, 1982).

Al glicocálix se le conocen varias características: a) Tiene una preponderancia de grupos ácidos que provocan una superficie altamente electronegativa, b) Esta superficie cargada concentra

cationes orgánicos e inorgánicos y esto tiene importancia ya que algunos cationes sirven para activar enzimas superficiales y c) Atrapamiento de moléculas de alto peso molecular tales como enzimas del huésped.

Las consideraciones hechas para el glicocálix de Schistosoma mansoni (Kusel y Gordon, 1989), podrán ser aplicadas a las del cisticerco debido a la similitud entre sus superficies. Se propone que el glicocálix modifica el pH y la concentración de iones en la vecindad de las microtricas, además, puesto que hay variabilidad en la densidad de carbohidratos y por lo tanto del número y organización de las cargas negativas en la superficie, puede haber variabilidad en las propiedades superficiales de cada parásito así como diferencias entre regiones del mismo parásito. El medio ambiente generado por este tipo de organización debe provocar que las macromoléculas atrapadas pueden tener limitadas sus acciones sobre la superficie del parásito. Esto es especialmente interesante al respecto de proteínas relacionadas al sistema inmune: anticuerpos, componentes del complemento, antígenos de histocompatibilidad, etc.

5. Adsorción de macromoléculas en la superficie.

Diferentes grupos han mostrado la presencia de macromoléculas del huésped y en especial inmunoglobulinas en la superficie de cisticercos de T. solium (Willms y Arcos, 1977), T. taeniaeformis (Kwa y Liew, 1978), T. crassiceps (Siebert et al,

1981), Hymenolepis diminuta y H. microstoma (Befus, 1977), así como de Mesocestoides corti (Mitchell et al., 1977; Sogandares-Bernal y Voge, 1978). En el caso de T. taeniaeformis se ha especulado que la IgG de rata sufre una adsorción específica en la superficie tegumentaria del cisticerco para posteriormente ser degradada (Hayunga et al., 1989). Los cisticercos de T. solium observados por microscopía electrónica de transmisión muestran una distribución periódica a lo largo de la membrana externa del tegumento (Willms et al., 1982).

6. Internalización de macromoléculas del huésped.

Desde hace más de una década se ha descrito la presencia de proteínas del huésped tales como inmunoglobulinas, albúmina y otras proteínas séricas en el fluido vesicular de diferentes metacestodos: E. granulosus (Coltorti y Varela Díaz, 1972a; 1974), T. taeniaeformis y T. crassiceps (Hustead y Williams, 1977a; 1977b) y T. saginata (Machnicka y Grzybowski, 1986). A pesar de ello, la pregunta de como alcanzaron dicho compartimiento no ha sido resuelta. Algunas observaciones por criofractura de tegumentos de cisticercos han llevado a proponer la existencia de poros que supuestamente comunican el interior del parásito con la superficie. También se ha propuesto que las macromoléculas podrán entrar hacia el fluido vesicular a través de estos poros (Conder et al., 1983). Esta idea ya había sido considerada por otros investigadores (Esch

y Kuhn, 1971) y finalmente descartada por experimentos de estereología.

Un aspecto interesante, en el caso de las inmunoglobulinas es que son internalizadas aparentemente intactas e incluso mantienen su actividad biológica, como se ha demostrado en el caso de metacéstodos de E. granuloso (Coltorti y Varela-Díaz, 1972; Husted y Williams, 1977a). Inicialmente se pensó que ellas podrían entrar por difusión libre (Coltorti y Varela-Díaz, 1972) o que podría estar involucrada una transmembranosis (Rothman, 1967). Sin embargo, luego de experimentos con céstodos adultos de H. diminuta (Lumsden et al., 1970) se descartó tal propuesta. Los experimentos con marcadores de superficie como el rojo de rutenio y partículas de gran tamaño como el dióxido de torio y otros (Lumsden et al., 1970; Threadgold y Hopkins, 1981) mostraron que la internalización se efectuaba por endocitosis y que tales eventos de endocitosis podrían ser similares a los ya conocidos y definidos en diferentes sistemas celulares: Endocitosis fluída, adsortiva y mediada por receptores (Darnell et al., 1986). Las observaciones obtenidas de los experimentos con rojo de rutenio incubado a intervalos de tiempo diferentes, mostraron que el marcador es tomado por vesículas formadas en la membrana plasmática nivel de las bases de las microtrícas (Threadgold y Hopkins, 1981). Estas observaciones, junto con la de estereología de cisticercos de T. crassiceps (Threadgold y Dunn, 1983) fueron determinantes para demostrar la endocitosis principalmente fluída y la mediada por receptores (Husted y

Williams, 1977; Dunn y Threadgold, 1984) aunque en tales experimentos no se emplearon marcadores que caracterizan a cada tipo de endocitosis, ni las condiciones con las que se clasifican tales tipos de endocitosis (Silverstein et al., 1977; Wileman et al., 1985).

Otros resultados muestran que sólo una parte de las macromoléculas internalizadas no es alterada. La otra parte de las proteínas aparentemente son degradadas a nivel de la superficie del cisticerco, pero no a nivel del fluido vesicular como lo demuestran los experimentos con cisticercos de T. taeniaformis (Hayunga et al., 1989).

II.OBJETIVOS.

Mediante la incubación de cisticercos en presencia de proteínas marcadas radioactivamente o acopladas a marcadores fluorescentes y electrodensos, se espera establecer las características de los mecanismos de internalización de tales macromoléculas, así como la forma en que las proteínas del huésped podrían alcanzar el fluido vesicular de los cisticercos sin que pierdan su integridad y mantengan su actividad biológica. Además, se espera conocer que regiones del tejido parasitario están involucradas en la internalización de macromoléculas.

III. MATERIALES Y METODOS

1. Cisticercos.

Se utilizaron cisticercos de T. crassiceps (cepa ORF) recuperados de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c con 6-8 semanas de infección. Estos parásitos han sido mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) mediante pases sucesivos en ratones hembras de 6 semanas de edad. Los cisticercos eran inmediatamente lavados tres veces con una solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) a pH de 7.2, estéril y suplementada con penicilina y estreptomicina: 250 U/ml (Gibco Co.) y cultivados in vitro en RPMI 1640 (Gibco Co) ajustado a pH de 7.2 con HEPES 3.4 mM (Gibco Co.) y bicarbonato de sodio 11.9 mM, durante 24 hr. El medio de cultivo también fue suplementado con una mezcla de antibióticos igual que con el PBS. Los cultivos se mantenían a 37°C, 90% de humedad y 5% de CO₂. Transcurrida esta incubación, los cisticercos eran recuperados, seleccionados por su apariencia y motilidad, agrupados y utilizados en distintos experimentos (ver abajo).

2. Purificación de las Inmunoglobulinas.

La sangre obtenida de las diferentes especies utilizadas (conejos, cerdos y ratones) fue dejada coagular a temperatura ambiente durante 2 h. Una vez formado el coágulo, el suero fué

separado mediante centrifugación (1612.8 xg, 20 min y temperatura ambiente), fraccionado en alícuotas y almacenado a -20°C hasta su uso.

Los sueros utilizados para la purificación de la fracción de inmunoglobulinas fueron:

a) hiperinmune de conejo contra la GP1 de la T. solium. La GP1 es una glicoproteína de 180 kDa que se localiza en la superficie tegumental del cisticerco. El suero hiperinmune fué obtenido en un trabajo previo en el laboratorio del Dr. Laclette por inmunización de conejos con la proteína purificada (Landa, 1989).

b) hiperinmune de conejo contra un extracto crudo de cisticercos de T. solium (Landa, 1989).

c) normal de cerdo.

d) normal de conejo.

e) normal de ratón.

f) de ratón infectado con cisticercos de T. crassiceps. Los sueros correspondieron a ratones con 6 a 8 semanas de infección.

Los sueros fueron inicialmente precipitados con NH₄Cl para obtener la fracción de globulinas y dializados exhaustivamente contra NaCl 0.15 M amortiguado con fosfatos 10 mM, pH 7.2 (PBS). Todas las inmunoglobulinas fueron purificadas por cromatografía de afinidad en una columna de proteína A-Sepharosa 4B (Sigma Chemical Co.). Para la purificación de inmunoglobulinas de cerdo y conejo, la columna fue equilibrada con una solución de fosfatos 0.1M pH 8.0. La elución de las inmunoglobulinas unidas a la

columna se llevó a cabo aplicando una solución de ácido acético 0.1 M, NaCl 0.15M. Las fracciones eluidas fueron neutralizadas con fosfatos 1M pH 8.0. Las fracciones seleccionadas que contenían proteína fueron mezcladas y concentradas en Minicon B15 (Amicon Co.). Para determinar su contenido de proteínas se utilizó el método de Lowry modificado por Hartree utilizando BSA como patrón (Hartree, 1979). La pureza e integridad de las proteínas purificadas fué determinada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) al 10% bajo condiciones reductoras con dodecilsulfato de Sodio (SDS-PAGE), los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Las inmunoglobulinas purificadas fueron separadas en alícuotas y almacenadas a -20°C hasta su uso. Las inmunoglobulinas de ratón fueron purificadas usando el kit de amortiguadores MAPS (BioRad) que permite el atrapamiento de todas las subclases de IgG incluyendo la IgG1a.

3. Yodación de proteínas.

Muestras de 1 mg de cada proteína fueron yodadas con 0.5 mCi de I^{125} siguiendo el método de la Cloramina T (Garvey, 1982). El tiempo de marcaje de las proteínas fue de 10 min. Las actividades específicas obtenidas generalmente eran de $0.5-1 \times 10^6$ cpm/ug. La radioactividad libre fué separada por filtración en columnas de Sephadex G25 (columna de 1.5 x 50 cm), usando PBS como eluyente. Las fracciones correspondientes al volumen de exclusión de la columna fueron mezcladas y concentradas en un Minicon B51 y

cuantificadas en su contenido de proteína por el método de Lowry. La actividad específica fué determinada por precipitación con ácido tricloro acético (TCA) al 25 y al 12.5%. usando BSA (10 mg/ml) como acarreador. La pureza de las proteínas yodadas fué checada por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE-SDS) aplicando 100,000 cpm/carril y 25 ug de proteína no marcada para permitir la tinción de la proteína con azul de Coomassie. Los geles fueron secados y colocados para autorradiografía en cassetes con película Kodak. Las autorradiografías fueron expuestas a -70°C y reveladas a tiempos de 2, 6, 12 y 24 hr. La comparación de los geles teñidos con sus respectivas autorradiografías indicó que las proteínas no habían sido alteradas físicamente y que no contenían cantidades significativas de otras proteínas contaminantes.

4. Métodos para microscopía de fluorescencia.

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia los cisticercos fueron incubados in vitro, en un medio que contenía algún marcador fluorescente, durante tiempos que iban desde 5 hasta 60 min. Se utilizaron distintos marcadores acoplados a isotiocianato de fluoresceína adquiridos comercialmente: como marcadores de endocitosis fluída se usaron Dextrán fluoresceinado (150 KDa) y amarillo de luciferina (Sigma Chemical Co). Como marcador de endocitosis adsortiva se utilizó albúmina sérica bovina fluoresceínada (Sigma Chemical Co.). Después de la

incubación los cisticercos fueron lavados 3 veces con PBS frío. Para la observación al microscopio de fluorescencia de los cisticercos enteros, las larvas fueron fijadas en acetona durante 10 min a -20°C , lavadas con PBS y observadas al microscopio, mediante un montaje en glicerol-PBS (9:1). En el caso de la observación de cortes de cisticercos, después de los 3 lavados en PBS frío, las larvas fueron colocadas en micropozos a los que se les agregó Tissue-Tek (Miles Laboratories) hasta cubrir las. Posteriormente los micropozos fueron cubiertos con Parafilm y sumergidos en una mezcla de hielo seco/acetona hasta que el Tissue-Tek hubiera solidificado. Los cisticercos congelados e incluidos en el Tissue-Tek fueron cortados en un crióstato (American Optical, Co.) a una temperatura de -20°C . Los cortes obtenidos, de 6 micras de grosor, fueron recuperados sobre portaobjetos los cuales fueron colocados en acetona durante 10 min. Antes de ser observados al microscopio de epifluorescencia, los portaobjetos con los cortes fijados fueron montados en glicerol-PBS (9:1) como se describió para los cisticercos enteros. Las observaciones de los cisticercos enteros y de los cortes se hicieron por medio de un microscopio de epifluorescencia Nikon con objetivos PlanApo de 10, 20, 60 y 100x y con un filtro para fluoresceína de 420 nm.

5. Métodos para microscopía electrónica.

Al igual que en los experimentos de fluorescencia, los cisticercos fueron recuperados después de haber sido cultivados in vitro durante 5 a 60 min en un medio conteniendo algún marcador electrodenso. Como marcador de endocitosis se utilizó rojo de rutenio (RR) (Sigma Chemical Co.). Como marcadores de endocitosis fluida se usaron Dextrán (229 KDa, Sigma Chemical Co.), oro coloidal (20 nm de diámetro, Polysciences, Inc.), peroxidasa de rábano Tipo II (Sigma Chemical Co.), tetrahidrocloruro de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.). Como marcador de endocitosis adsorptiva se utilizó ferritina cationizada (Sigma Chemical Co.). Posteriormente, los cisticercos fueron lavados 3 veces con PBS frío procesados para microscopía electrónica. Para ello, los cisticercos fueron fijados utilizando una ligera modificación de un método convencional (Karnovsky, 1965), en 2% de glutaraldehído, 2.5% paraformaldehído en 0.1 M cacodilatos, pH 7.3, durante una hora a 4°C. Posteriormente, los cisticercos fueron lavados con amortiguador de cacodilatos y post-fijados en OSO_4 al 1% en cacodilatos durante 1 h a 4°C. Los cisticercos fueron cortados en fragmentos pequeños y deshidratados en soluciones seriales de etanol (al 70, 80 y 90%) durante 10 min seguido de tres cambios de 20 min cada uno en etanol absoluto. Para la inclusión los cortes deshidratados fueron incubados dos veces durante 30 min en óxido de propileno y posteriormente transferidos a una mezcla de epon-812:óxido de

propileno (1:1), donde se dejaron penetrar durante 12 h. Luego, los trozos de tejido fueron transferidos a epon solo y mantenidos durante 12 h e incluidos en moldes planos que se dejaron polimerizar por 12 h a 60°C en una atmósfera seca. Los cortes finos de los cisticercos fueron recogidos en rejillas de cobre y observados al microscopio electrónico con o sin tinción posterior. La observación se realizó con un microscopio JEOL 100B a 60 Kv. En algunos experimentos los marcadores utilizados requirieron otros tratamientos de los cisticercos o de sus cortes. Por ejemplo, para los cisticercos incubados con Dextrán se hicieron dobles tinciones con citrato de plomo (Simionescu y Palade, 1971; Simionescu et al., 1972) para intensificar la electrodensidad del marcador.

En el caso de los cisticercos cultivados en presencia de HRP sola o de los conjugados de HRP, se empleó una variación del método empleado para el procesamiento de los parásitos descrito arriba (Bishop y King, 1982). Los cisticercos fueron fijados y lavados como se describió antes y luego incubados durante 20 min a 37°C con 2 ml de una mezcla de DAB (0.5 mg/ml en PBS), cloruro de cobalto al 1.0% y sulfato de amonio y níquel al 1.0% durante 15 min. Para desarrollar la reacción de la HRP se agregaron 20 μ l de H₂O₂ al 1%. La reacción fué detenida lavando inmediatamente con PBS frío (2 lavados de 10 min cada uno). Posteriormente, los cisticercos fueron postfijados con OsO₄ al 1% en 1 M de fosfatos por 90 min y procesados como arriba.

6. Internalización de proteínas marcadas radioactivamente en cisticercos.

Cinética de la internalización

Luego de haber sido acondicionados al cultivo in vitro, los cisticercos fueron seleccionados y distribuidos en grupos de 5 cisticercos. Cada grupo de cisticercos fue depositado en un pozo de una placa Costar de 24 pozos. Los grupos de cisticercos fueron incubados durante 3, 6, 12, 24 y 48 hr en un volumen total de 2 ml de medio de cultivo adicionado con una cantidad de proteína yodada equivalente a 5×10^6 de cpm. Las proteínas yodadas adicionadas al medio de cultivo fueron: inmunoglobulinas de ratón normal, de cerdo normal y de conejo normal, así como inmunoglobulinas (anticuerpos) de ratón infectado con cisticercos, de conejo anti-GP1, de conejo anti-extracto crudo de T solium y BSA. Después de cada incubación los cisticercos fueron recuperados del cultivo y lavados 3 veces con PBS frío. Posteriormente, se determinó la radioactividad de los cisticercos enteros, del fluido vesicular y del tejido larvario. Para la recuperación del fluido vesicular y del tejido larvario los cisticercos fueron colocados sobre un pedazo de papel filtro y puncionados con una navaja. El fluido vesicular fue recuperado en el papel filtro, al igual que el tejido larvario que fue recuperado por raspado del papel. Este tejido larvario fue lavado 3 veces con PBS frío antes de que se determinara la

radioactividad asociada al tejido. Después de determinar la radioactividad en las distintas fracciones: cisticercos enteros, fluido vesicular y tejido, se tomaron alícuotas de 10 μ l que fueron procesadas para determinar la radioactividad libre por precipitación con TCA (ver 3. Yodación de proteínas). Con los resultados obtenidos para los diferentes compartimientos parasitarios, se elaboraron gráficas de cinética de internalización en las que se comparan las velocidades de internalización de todas las proteínas estudiadas.

Saturabilidad de la internalización

Al igual que en los experimentos anteriores, se formaron grupos de 5 cisticercos, los cuales fueron colocados en pozos y mantenidos en cultivo in vitro en presencia de las proteínas yodadas. En estos experimentos de saturabilidad de la internalización, los cisticercos fueron incubados en presencia de mezclas de proteína marcada (5×10^5 cpm/cisticerco) y de proteína no marcada. Para las inmunoglobulinas se utilizaron concentraciones de proteína no radioactiva de 100, 200, 400 y 800 μ g/ml. Solo en los experimentos en los que se utilizó BSA iodada fué posible adicionar mayores concentraciones de proteína (1,600, 3,200, 6,400 y 12,800 μ g/ml) al medio de cultivo. La saturabilidad de la internalización fue medida a las 6 y 12 horas de cultivo in vitro. Al final del cultivo se determinó la radioactividad en los cisticercos enteros, el fluido

vesicular y el tejido larvario. El tratamiento de los resultados fue similar al descrito anteriormente (ver cinética de la internalización).

Influencia de la temperatura sobre la cinética de la internalización

Estos experimentos fueron similares a los dos anteriores solo que los cisticercos fueron cultivados en presencia de las proteínas marcadas (5×10^5 cpm/cisticerco) en diferentes temperaturas de incubación (4, 10, 20, 30, 37°C). Se seleccionaron tiempos de cultivo de 6 y 12 hr. Después del cultivo, los cisticercos fueron procesados, y los resultados analizados como se describió anteriormente (ver cinética de la internalización).

7. Internalización de proteínas no marcadas radioactivamente.

También se estudió la cinética de internalización de una proteína, la peroxidasa de rábano (HRP), que por su actividad enzimática permite su rastreo sin necesidad de ser marcada radioactivamente. Los tiempos de cultivo fueron 5, 10, 15, 30 y 60 min. En estos experimentos, los cisticercos fueron recuperados del cultivo en presencia de HRP y lavados igual que los parásitos incubados en presencia de proteínas marcadas radioactivamente. Para la determinación de actividad enzimática de la HRP

internalizada, los cisticercos fueron centrifugados a 352,900 xg durante 10 min a 4°C en una ultracentrifuga Beckman TL100. El sobrenadante obtenido fue considerado como fluido vesicular mientras que el sedimento se consideró equivalente al tejido larvario. El sedimento recuperado, fue lavado por 3 ocasiones con PBS frío y solubilizado con Tritón X-100 (0.5 mg/ml) durante toda la noche a 4°C, con agitación constante. La suspensión obtenida fue clarificada por centrifugación (716.8 xg, 4°C, 10 min).

Se determinó la actividad de HRP del fluido vesicular y del tejido utilizando Ortofenilendiamina y H₂O₂ como sustrato (Bloom y David, 1976). La densidad óptica fué determinada usando un filtro de longitud de onda de 492 nm en un lector de placas de ELISA BioRad.

8. Caracterización morfológica de la internalización en cisticercos.

Endocitosis en cisticercos de T. crassiceps.

Los cisticercos fueron seleccionados, distribuidos y cultivados in vitro de manera similar a lo efectuado en los experimentos de internalización de proteínas yodadas. Cada grupo de cisticercos fue cultivado en un micropozo de placas Costar, en un volumen de medio de cultivo de 250 ul y en presencia del marcador catiónico rojo de rutenio (RR). La concentración de RR fué de 10 mg/ml. Los controles en estos experimentos fueron

grupos de cisticercos a los que no se les adicionó el marcador, tratados bajo las mismas condiciones de los otros grupos. Los tiempos de incubación fueron de 2, 5, 10, 15, 30 y 60 min. Luego de la incubación, los cisticercos fueron recuperados del cultivo y procesados como se describe en la sección II,5. Métodos para microscopía electrónica. Además de la observación de los cortes finos de los cisticercos incubados en presencia del RR, también fueron observados los cisticercos enteros recién recuperados del cultivo in vitro. Estos cisticercos fueron observados mediante un microscopio estereoscópico con magnificaciones de 2 y 4x.

Endocitosis fluída.

Los experimentos de endocitosis fluída se hicieron siguiendo las recomendaciones para la caracterización de la endocitosis fluída en sistemas celulares eucariontes (Wallace y Ho, 1972; Bloom y David, 1976; Silverstein et al., 1977; Holtzman, 1989; Swanson, 1989), llevando a cabo las observaciones a nivel de microscopía de fluorescencia y electrónica. Los controles en estos experimentos fueron grupos de cisticercos a los que no se les adicionó algún marcador de endocitosis fluída, tratados bajo las mismas condiciones de los otros grupos. Se hicieron experimentos similares a los descritos arriba para caracterizar la cinética de la internalización, así como la influencia de la concentración del marcador y de la temperatura de incubación. En el caso del estudio de la cinética de internalización los

cisticercos fueron incubados a 2, 5, 15, 30, 60 y 120 min en presencia de una concentración fija de los marcadores de endocitosis fluída. Las concentraciones de marcador utilizadas fueron 0.5, 1.0, 5.0, 12.0 y 24 mg/ml. Las temperaturas de incubación estudiadas fueron 4, 10, 20, 30 y 37°C. Los marcadores de endocitosis fluída empleados fueron: amarillo de lucifer, Dextrán-FITC (152 kDa), Dextrán (229 kDa), oro coloidal de 20 nm de diámetro y HRP. Terminadas las incubaciones los cisticercos fueron recuperados y procesados de acuerdo a lo descrito en las secciones II,4 y II,5.

Endocitosis adsortiva.

Estos experimentos fueron similares a los descritos para la endocitosis fluída. A nivel ultraestructural se hicieron experimentos con diferentes concentraciones de ferritina cationizada (0.5, 5.0 y 10 mg/ml) durante 60 min de incubación definido. La BSA-FITC (12 mg/ml) se utilizó como marcador de endocitosis adsortiva a nivel de microscopía óptica. Antes de que los experimentos fueran efectuados, los cisticercos fueron mantenidos in vitro a 4°C durante 60 min en presencia del marcador, para permitir su adsorción a la superficie del parásito. Posteriormente, los cisticercos fueron lavados tres veces con PBS frío y vueltos a incubar en RPMI sin marca por tiempos de incubación definidos (2, 5, 15, 30 y 60 min) a 37°C. Este proceso de adsorción a 4°C y luego incubación a 37°C fue

tomado de lo que se recomendado para células eucariontes (Bullock y Petrusz. 1982). Al final de la segunda incubación los cisticercos fueron lavados con PBS y procesados para microscopía de fluorescencia o electrónica como se describió arriba.

Endocitosis mediada por receptores.

En estos experimentos se utilizaron dos tipos de marcadores:

1) proteínas acopladas a isotiocianato de fluoresceína como proteína A (prot A-FITC) e IgG de conejo anti-IgG de ratón (IgGr-FITC) y 2) proteínas acoplados a marcadores electrodensos como proteína A acoplada a Ferritina (prot A-F), proteína A acoplada a oro coloidal (10 nm) (ProtA-O), proteína A acoplada a peroxidasa de rábano (ProtA-HRP), anti-IgG de ratón en conejo acoplada a oro coloidal (10 nm) (IgGr-O) y anti-IgG de ratón en conejo acoplada a HRP (IgGr-HRP). Todos los marcadores mencionados fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. Las concentraciones de proteína en el medio de cultivo para los conjugados fluorescentes fue de hasta 5 mg/ml y para los marcadores electrodensos fue de 5 y 10 mg/ml.

Para ambos tipos de marcadores se formaron grupos de cisticercos que se preincubaron durante 60 min a 4°C en presencia del marcador y luego lavados como se describió para endocitosis adsortiva, y finalmente incubados durante 2, 5, 10, 15, 30 y 60 min a 37°C en ausencia del marcador. Tambien se incluyeron

grupos de cisticercos como control, los cuales fueron incubados en medio de cultivo sin marcadores en las mismas condiciones que los grupos experimentales. Al final todos los cisticercos fueron procesados para su observación en microscopía de fluorescencia o electrónica.

IV. RESULTADOS

1. Internalización de proteínas marcadas radioactivamente.

Cinética de la internalización.

En los experimentos iniciales, los cisticercos de T. crassiceps fueron incubados a 37°C en presencia de inmunoglobulinas de distintas especies así como de inmunoglobulinas dirigidas en contra de componentes parasitarios (anticuerpos), incluyendo una glicoproteína de superficie (GP1). También se incubaron en presencia de BSA como proteína no relacionada. Como se esperaba, la primera observación realizada indicó que los cisticercos internalizan las proteínas yodadas al fluido vesicular. En las incubaciones de hasta 12 hrs la cantidad de radioactividad internalizada aumenta en relación directa con el tiempo de incubación (Fig. 6). Determinaciones de radioactividad unida a proteína, por medio de precipitaciones con TCA, mostraron que el porcentaje de radioactividad libre también aumenta con el tiempo de incubación. Es decir que paralelo al proceso de internalización, los cisticercos llevan a cabo un proceso degradativo. Sin embargo, los resultados que se presentan en la figura 6 no fueron corregidos, de tal modo que muestran los equivalentes totales de proteína internalizada, es decir que no se toma en cuenta la cantidad de proteína degradada.

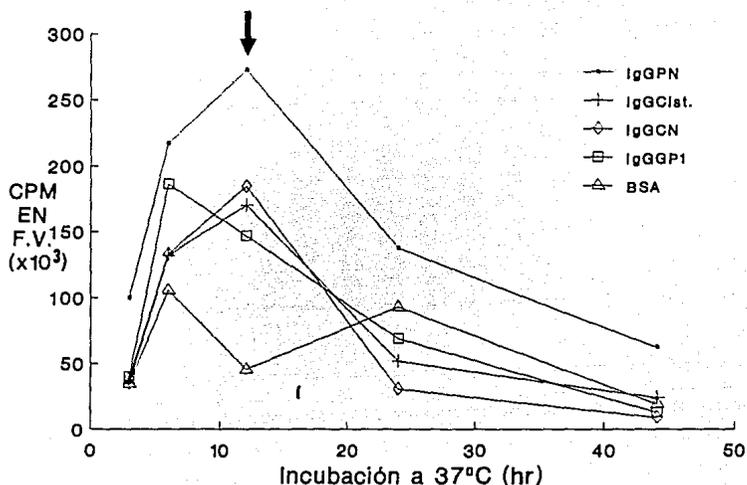


Figura 6. Cinética de internalización de proteínas hacia el fluido vesicular. Los grupos de cisticercos fueron incubados en un medio conteniendo una de las siguientes proteínas yodadas. Inmunoglobulinas: de cerdo normal (IgGPN), de conejo normal (IgGCN), de conejo hiperinmune a GP1 (IgGGP1) y Albúmina sérica bovina (BSA). La flecha indica el tiempo en que los cisticercos fueron transferidos a un medio sin proteínas marcadas. Los puntos representan el promedio de la radioactividad medida de grupos de 5 cisticercos.

El incremento de proteína internalizada proporcional al tiempo de incubación también se observó cuando se evaluó la radioactividad en el tejido parasitario. Asimismo, la velocidad de internalización de todas las proteínas yodadas, incluyendo a la BSA, fue del mismo orden de magnitud. Cabe resaltar que la radioactividad internalizada por los cisticercos durante 12 hrs no disminuyó apreciablemente la radioactividad adicionada al medio de cultivo al inicio de los experimentos. En la misma figura 6 se muestra que si los cisticercos son transferidos a un medio de cultivo libre de proteínas marcadas, la radioactividad en el fluido vesicular disminuye hasta casi desaparecer en el curso de 12 hrs de incubación a 37°C.

Saturabilidad de la internalización.

En la siguiente serie de experimentos se exploró la saturabilidad del sistema de internalización, como una primera aproximación para definir su naturaleza. Se llevaron a cabo experimentos en los que se adicionaban cantidades crecientes de cada proteína al medio de cultivo, usando una cantidad fija de proteína marcada y cantidades variables de proteína fría. Puesto que en los experimentos descritos en la sección anterior se encontró que todas las proteínas eran internalizadas con una cinética similar, se decidió por conveniencia realizar los experimentos de saturación usando BSA. Como se muestra en la figura 7, la cantidad de radioactividad internalizada hacia el

fluido vesicular aumentó proporcionalmente con la concentración de proteína en el medio de cultivo. La saturación solo se alcanza en concentraciones de BSA de entre 6 y 12 mg/ml. Una estimación de la capacidad de internalización de los cisticercos de la T. crassiceps, basada en los resultados de los experimentos de saturación se presenta en la Tabla I. Cada cisticerco es capaz de internalizar mas de 4 ug de BSA en doce horas de incubación. El posible significado de esta estimación se discute en el siguiente capítulo de la tesis.

Tabla I. Determinación de BSA internalizada en el Fluido Vesicular (F.V.).

BSA el medio (ug/ml)	BSA en el F. V. (ug/10 cisticercos)	
	6 h	12 h
0.0	0.0	0.0
0.8	1.25	1.20
1.6	1.46	2.30
3.2	2.60	3.45
6.4	5.37	6.81
12.8	7.06	7.80

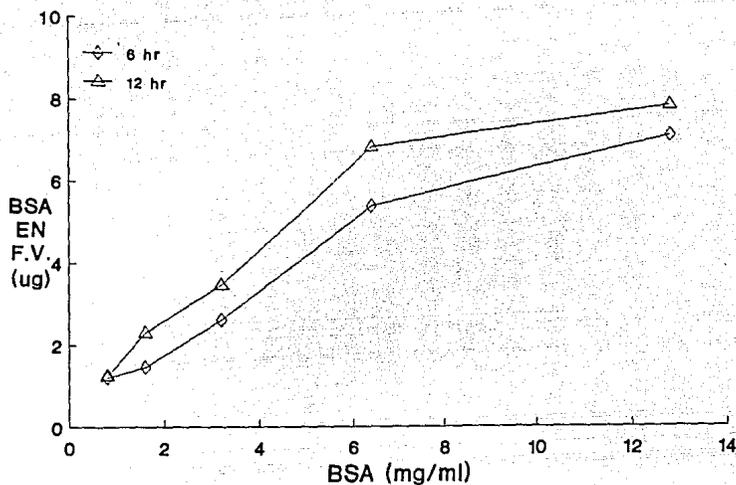


Figura 7. Saturabilidad del sistema de internalización. Los grupos de cisticercos fueron incubados durante 6 ó 12 hrs en un medio que contenía una cantidad constante de BSA radioactiva y cantidades variables de BSA fría. Los puntos fueron calculados a partir de la radioactividad en grupos de 5 cisticercos.

Influencia de la temperatura sobre la cinética de la internalización.

La cantidad de radioactividad internalizada hacia el fluido vesicular es influenciada por la temperatura de incubación. Pequeñas cantidades de radioactividad son internalizadas a 4°C; a partir de los 20°C se incrementa la pendiente en la curva de internalización de la radioactividad (Fig. 8A), alcanzado un máximo a 37°C. Determinaciones de la radioactividad asociada a proteína en el fluido vesicular mostraron un mayor porcentaje de radioactividad unida a proteínas en temperaturas de 4°C, que la cuantificada a 30 y 37°C (Fig. 8B).

2. Internalización de proteínas no marcadas radioactivamente.

Como un segundo sistema de monitoreo de la internalización se utilizó una enzima cuya entrada puede ser rastreada a través de una sencilla determinación colorimétrica. Al igual que las proteínas radioactivas, la HRP fue internalizada hacia el fluido vesicular en relación directa con el tiempo de incubación. A su vez, la actividad enzimática medida en el medio de cultivo fue decreciendo de acuerdo al tiempo de incubación (Fig. 9). La actividad enzimática medida en el extracto del tejido larvario, fue constante en todos los tiempos de incubación indicando que el tejido parasitario actúa solo como lugar de tránsito para la HRP internalizada. La actividad de peroxidasa determinada en los

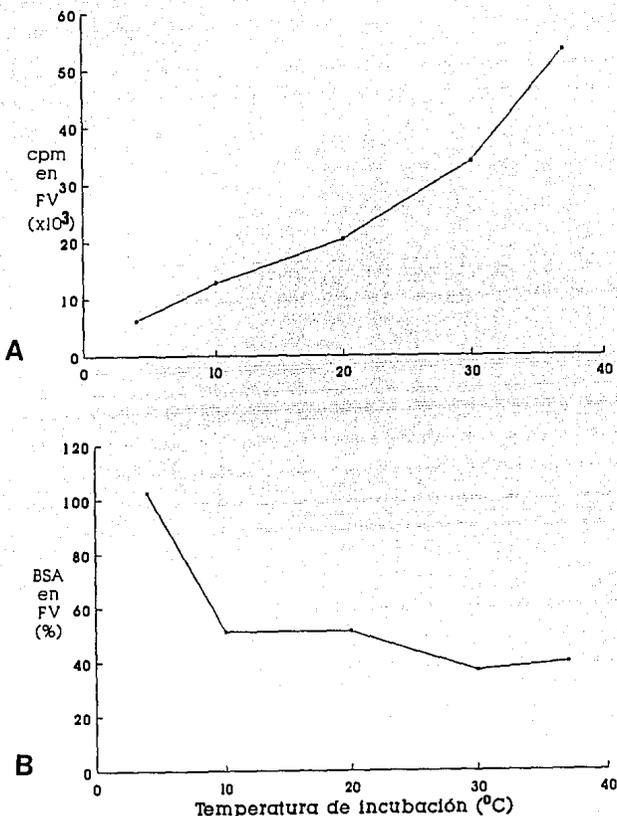


Figura 8. Influencia de la temperatura sobre la internalización de proteínas. Los grupos de cisticercos fueron incubados durante 12 hrs en presencia de BSA marcada radioactivamente en cada una de las temperaturas indicadas. A. Radioactividad total internalizada hacia el fluido vesicular. B. Radioactividad unida a proteína en el fluido vesicular, determinada por precipitación con TCA. Los puntos representan la radioactividad medida en grupos de 5 cisticercos.

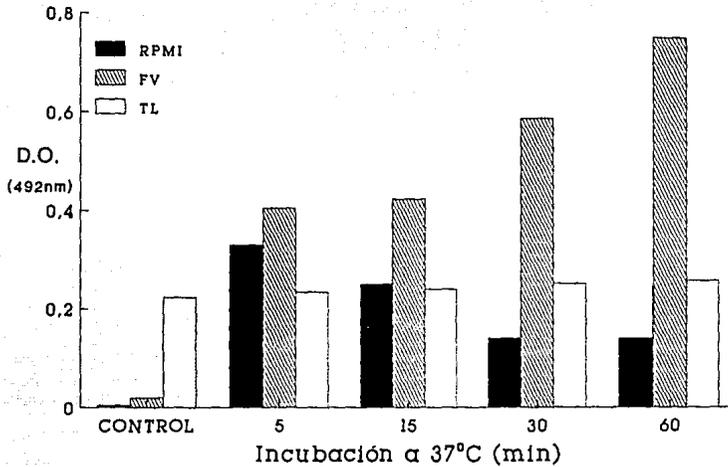


Figura 9. Cinética de internalización de una proteína no marcada radioactivamente. Los cisticercos fueron incubados en un medio que contenía HRP. Después de la incubación, se determinó la actividad de peroxidasa en el medio de cultivo (RPMI), fluido vesicular (FV) y en el tejido larvario (TL). Al grupo control no se le adicionó HRP. Los puntos representan la actividad enzimática medida a grupos de 5 cisticercos.

cisticercos incubados en presencia de HRP fue siempre mayor que la determinada en el grupo control.

3. Caracterización morfológica de la internalización en cisticercos.

Endocitosis Fluída.

En la incubación de cisticercos con Dextrán-FITC se observó que el marcador aparecía concentrado en uno de los polos de los cisticercos. Esta concentración polar de Dextrán-FITC se hizo mas pronunciada entre los 30 y 60 min de incubación. La observación de cortes semifinos de estos cisticercos mostró que el dextrán-FITC se concentra sobre la superficie externa del polo (Fig. 10). La observación de los cortes a nivel ultraestructural indicó que el Dextrán no es internalizado. Similarmente, el amarillo de lucifer no fue aparentemente internalizado.

Cuando los cisticercos fueron incubados en presencia de oro coloidal, el marcador fue solamente observado sobre la punta de las microtricas (Fig. 11A). En algunos casos los granos de oro se observaron agrupados sobre la superficie de una microtrica (Figs. 11B y C), sin embargo, solo extraordinariamente se detectó algún grano en el interior del tejido (Fig. 11D).

En contraste, en los experimentos en que se usó HRP en el medio de cultivo para rastrear morfológicamente su entrada, se observó claramente una internalización mediada por

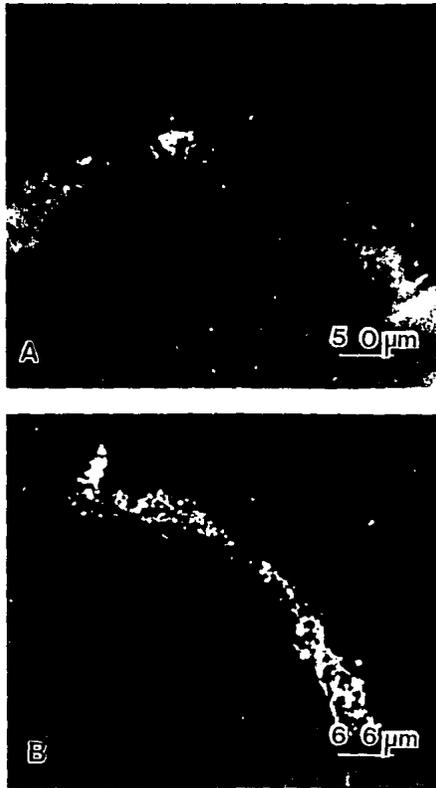


Figura 10. Capacidad de endocitosis fluída (Dextran). Cortes semifinos de cisticercos incubados durante 60 min a 37 °C, en ausencia (A) o presencia (B) de dextrán-FITC.

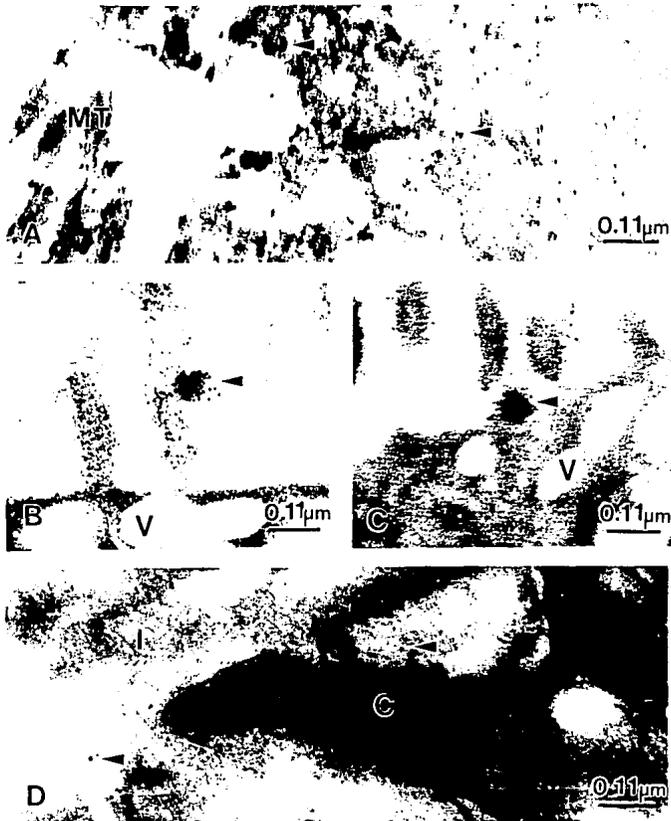


Figura 11. Capacidad de endocitosis fluida (oro coloidal).

Micrografías electrónicas de cortes de cisticercos incubados durante diferentes tiempos a 37°C en presencia de oro coloidal. Las flechas muestran las partículas de oro en: (A) el material denso sobre las puntas de las microtricas (MT), (B y C) dentro de gránulos densos asociados a las microtricas y (D) en el intersticio (I), microvesículas (V) y citón tegumental (CT).

microvesículas. La actividad de oxidasa endógena, evaluada en los cisticercos control (Fig. 12A y C) no impidió la detección de la HRP internalizada in vitro (Fig. 12B y D). La HRP fue detectada adherida a la membrana plasmática de las microtricas (Fig. 12B), en el interior de microvesículas tegumentales (Fig. 12C) y en el espacio intersticial por debajo de la membrana basal.

Sorprendentemente, la HRP fue observada siempre asociada a las membranas del cisticerco, por lo cual su categorización como marcador de endocitosis fluída se considera dudosa; la internalización de la HRP más bien parece representar un proceso de endocitosis adsortiva (ver siguiente sección).

Endocitosis Adsortiva.

La capacidad de los cisticercos para realizar endocitosis adsortiva fue evaluada inicialmente usando BSA-FITC como marcador. A 4°C, se observó que la distribución de la fluorescencia no era homogénea en todo el tejido parasitario. Se encontraron regiones muy fluorescentes, especialmente los polos y las gemaciones vegetativas (no mostrado). Cuando los cisticercos fueron llevados a temperaturas de incubación de 37°C, la marca fluorescente aparece progresivamente en regiones mas profundas del tejido vesicular de acuerdo con el tiempo de incubación (Fig.13).

En la evaluación ultraestructural de la endocitosis adsortiva, el RR permitió una observación detallada del proceso

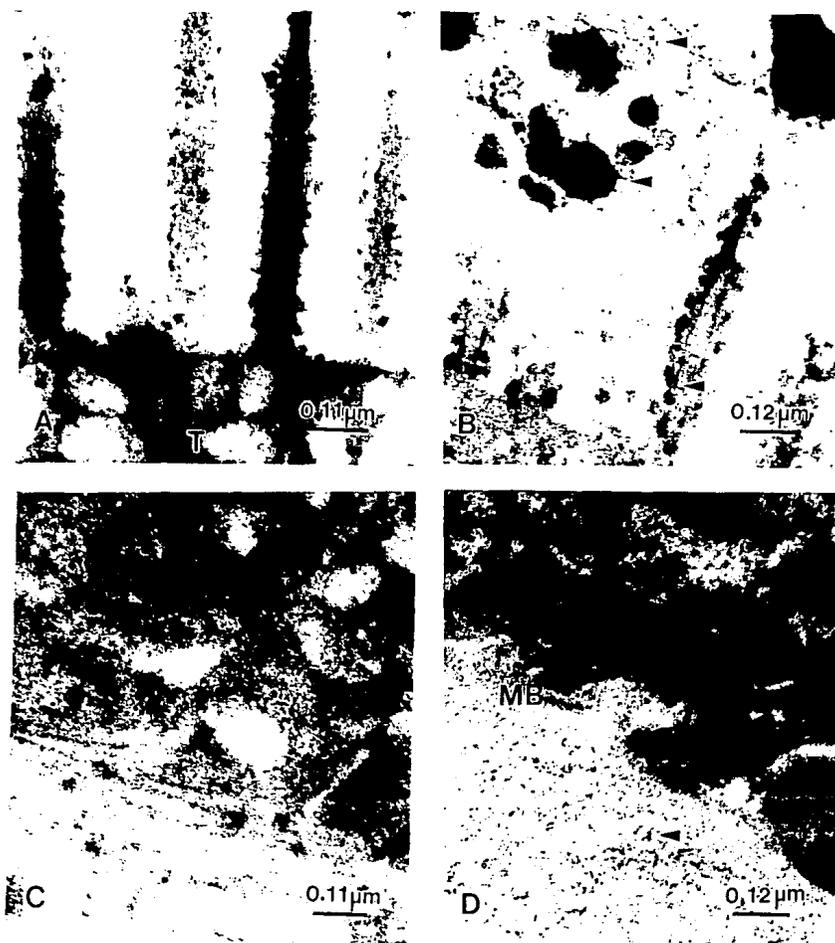


Figura 12. Internalización de peroxidasa de rábano. Micrografías electrónicas de cortes de cisticercos incubados en ausencia (A y C) y en presencia de HRP (B y D). La presencia de HRP en el tejido de los cisticercos se reveló usando DAB como sustrato. Membrana basal (MB). Tegumento (T).

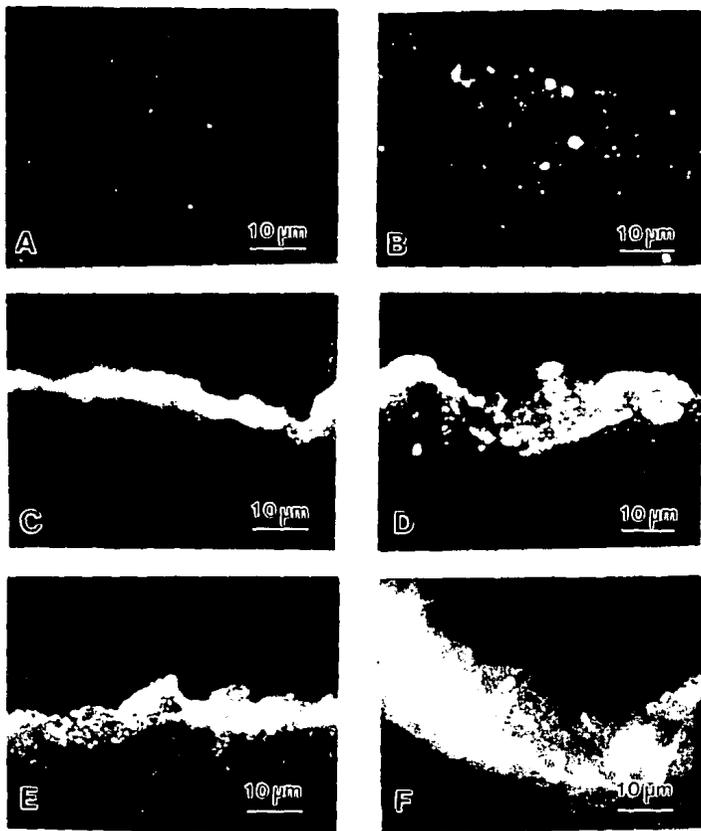


Figura 13. Cinética de la endocitosis adsortiva. Cortes semifinos de cisticercos incubados en presencia de BSA-FITC durante A) 60 min a 37°C en ausencia del BSA-FITC (Control), B) 20 min a 4°C (Control), C) 5 min a 37°C, D) 15 min a 37°C, E) 30 min a 37°C y F) 60 min a 37°C.

de atrapamiento en microvesículas y de su descarga al espacio intersticial por debajo de la membrana basal del tegumento. En la figura 14 se presentan imágenes aparentemente secuenciales del atrapamiento del RR en microvesículas tegumentales; nótese la distribución difusa del RR sobre la cara interna de las microvesículas. En otras imágenes igualmente comunes, el RR se observa formando agregados electrodensos sobre la superficie de las microtricas, que parecen ser atrapados en microvesículas tegumentales y luego vaciados hacia el espacio intersticial, mediante una fusión de la vesícula con la membrana basal (Fig.15).

La ferritina cationizada fue el tercer marcador de endocitosis adsorptiva empleado. El uso de altas concentraciones (10 mg/ml de proteína) de ferritina en el medio de cultivo, aparentemente produce un bloqueo de la internalización. En este caso se observaron grandes cantidades de ferritina cationizada únicamente en la superficie de las microtricas. Las partículas de ferritina en el interior del tejido solo se observaron raramente (Fig. 16A). Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones de 0.5 y 5 mg/ml la ferritina era claramente endocitada. Las partículas sobre la superficie tegumental son tomadas mediante invaginaciones de la membrana plasmática que se transforman en microvesículas (Fig. 16B y C). Hacia los 60 min de incubación a 37°C fue común observar la acumulación de microvesículas cargadas de partículas de ferritina en cuerpos multivesiculares (Fig. 16D) en los puentes citoplásmicos que comunican al tegumento con los

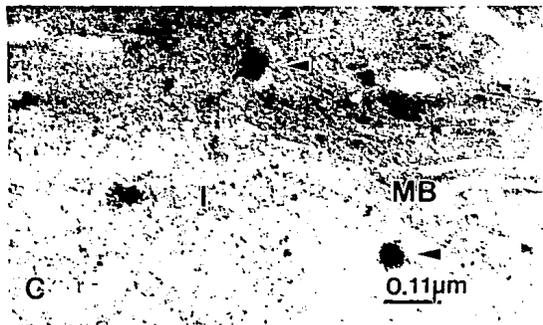


Figura 15. Endocitosis adsortiva en cisticercos (rojo de Rutenio II). Micrografías de cortes de cisticercos incubados en presencia del RR. Se observan gránulos densos en los que se encuentra el RR, los cuales se encuentran en diferentes regiones del tejido parasitario: A nivel de tegumento (T) dentro de microvesículas (A y B) y (C) en el intersticio (I) por abajo de la membrana basal (MB).

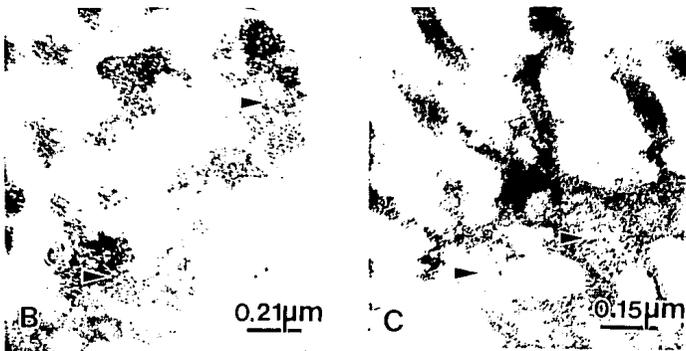


Figura 16. Endocitosis adsortiva en cisticercos (ferritina cationizada). Micrografías de cortes de cisticercos incubados en presencia de FC. Las flechas muestran la FC en: (A) las microtrícas por arriba del tegumento (T), dentro de invaginaciones de membrana plasmática (B), en el interior de microvesículas tegumentarias (C) y dentro de cuerpos multivesiculares a nivel de puente citoplásmico (PC).

citones tegumentales. Asimismo, a los 60 min de incubación las partículas de ferritina se pudieron observar en el interior de vesículas del citoplasma de los citones tegumentales (no mostrado).

Endocitosis mediada por receptores.

Para caracterizar la endocitosis mediada por receptores se aprovechó una observación previa en la que se demostró la presencia de IgG del huésped (ratón) sobre la superficie externa de los cisticercos de T. crassiceps. En estos experimentos, los cisticercos fueron incubados en presencia de IgG de conejo anti-IgG de ratón, acoplada a FITC (IgGr-FITC). La distribución de la IgGr-FITC en los cisticercos enteros y en sus cortes fue diferente dependiendo del tiempo de incubación a 37°C. Durante los primeros minutos de incubación, la fluorescencia se encontraba por todo el cisticerco alcanzando mayor intensidad en los polos y en las gemaciones. Luego de 30 min de incubación, la marca fluorescente desapareció de algunas regiones del cuerpo vesicular y de las gemaciones. La observación de los cortes de éstos cisticercos mostró que la desaparición de la fluorescencia de la superficie se debía a que el marcador era internalizado. Después de la preincubación a 4°C, la fluorescencia se encontraba solamente en la superficie parasitaria (Fig. 17A). Quince minutos después de transferir a los cisticercos a una temperatura de 37°C, la fluorescencia fue internalizada hacia el interior del

tejido parasitario, quedando marca sobre la superficie parasitaria (Fig. 17B). Después de 30 min de incubación, la marca fluorescente internalizada era concentrada aparentemente en puntos de fluorescencia en el interior del tejido, quedando poca marca sobre la superficie (Fig. 17C).

Experimentos en los que se usó prot A-FITC como marcador de endocitosis mediada por receptores, mostraron los mismos patrones de internalización que la IgGr-FITC (no mostrados).

A nivel ultraestructural, sólo la prot A-HRP pudo ser utilizada con éxito para observar su internalización mediada por receptores. Al igual que con la fluorescencia de la IgGr-FITC, la distribución de la marca en el tejido parasitario fue influenciada por el tiempo de incubación. En los primeros minutos de incubación con prot A-HRP, una cantidad importante de marca electrodensa fue observada en la membrana plasmática de las microtricas y en menor cantidad por arriba de las microtricas (Fig. 18A). La marca electrodensa también fue observada en el interior de microvesículas tegumentales (Fig. 18A). La observación de otras regiones del tejido parasitario demostró la existencia de marca en microvesículas alojadas en los puentes citoplásmicos (Fig. 18B), así como en microvesículas del citoplasma de los citones tegumentales. Este último hallazgo fue mas común hacia los 60 min de incubación a 37°C, tiempo en el que la marca era aparentemente concentrada en los citones tegumentales (Fig. 18C y D).

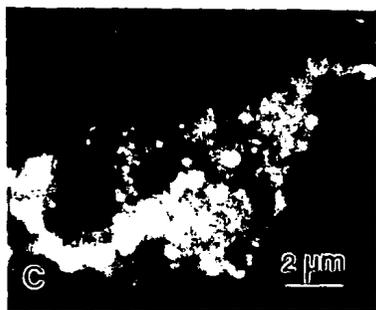
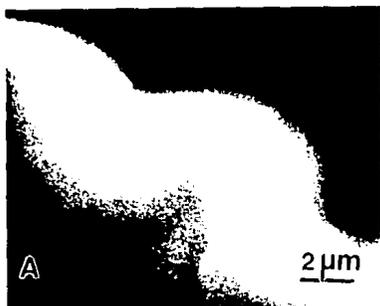


Figura 17. Endocitosis mediada por receptores en cisticercos (IgG de ratón). Fotografías de cortes de cisticercos incubados en presencia de IgGr-FITC. La inmunoglobulina se observa en: (A) la marca localizada en la superficie a tiempo 0 de incubación a 37°C, a los 15 min de incubación (B) y a los 30 min de incubación (C).

La observación al microscopio electrónico de los otros marcadores electrodensos utilizados (ver sección II,8) para caracterizar la endocitosis mediada por receptores, mostró que su internalización era pobre o no se efectuaba. En general, estos marcadores fueron observados en el material agregado por arriba de la punta de las microtricas. En pocos casos se observaron partículas adheridas a la membrana plasmática de las microtricas y en casos excepcionales se observaron partículas dentro de vesículas tegumentarias.

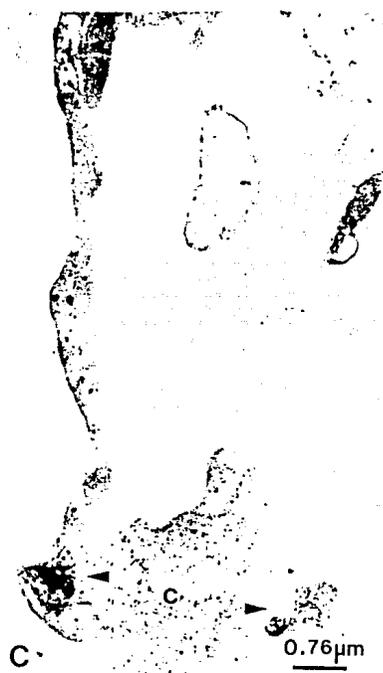
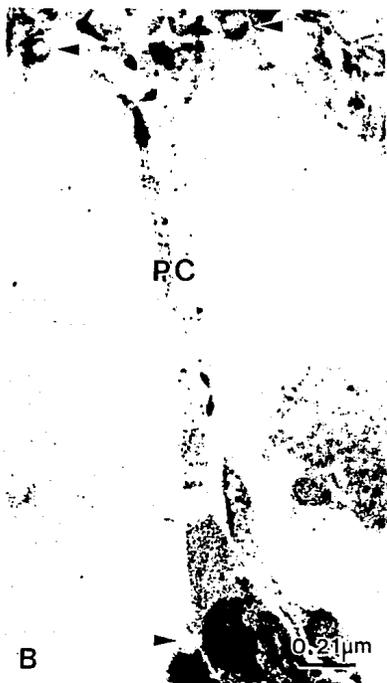
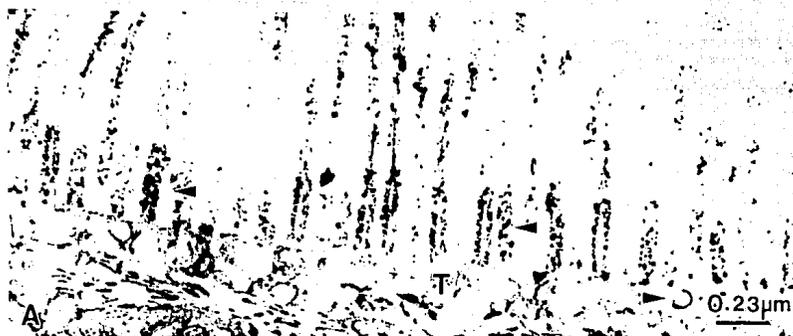


Figura 18. Endocitosis mediada por receptores en cisticercos.
Micrografías electrónicas de cisticercos incubados en presencia de proteína A-HRP. Se observa la marca distribuida sobre la superficie de las microtrícas, dentro del tegumento (T) recubriendo la membrana interna de microvesículas tegumentarias (A), en el nacimiento de los puentes citoplásmicos (PC) (Fig. B) y en el interior de los citones tegumentales (C) (Fig. C y D).

V. DISCUSION

El estudio de la internalización de proteínas en cisticercos de T. crassiceps, fue planeado con la finalidad de definir las características de la internalización de macromoléculas en cisticercos. El objetivo final era determinar el papel de esta internalización en el mantenimiento de la relación huésped-parásito en la cisticercosis.

Los experimentos de incubación de los cisticercos en presencia de proteínas marcadas radioactivamente fueron realizados como un acercamiento directo, para evaluar la capacidad de los parásitos para internalizar macromoléculas. Cabe hacer notar que la arquitectura de los cisticercos facilita este enfoque puesto que se trata de organismos vesiculares que permiten un acceso sencillo para manipular los compartimientos externos e internos.

Se utilizaron cisticercos de ratón obtenidos mediante infecciones experimentales, ya que la información previa acerca de su capacidad para tomar macromoléculas del medio de cultivo, los hace equivalentes a los de T. solium. Además, la infección de los ratones es sencilla, se mantienen fácilmente "in vitro" y se pueden manejar poblaciones homogéneas de cisticercos no solo con respecto a su cepa sino también a su edad, tamaño, etc. La principal diferencia de los cisticercos de T. crassiceps cepa ORF con respecto a los cisticercos de T. solium, es que carecen de

escolex. Esta característica limita su utilidad como modelos para algunos aspectos fisiológicos, sin embargo, es particularmente adecuada en los estudios de internalización ya que se trata de parásitos constituidos única y exclusivamente por la pared vesicular.

Desde los primeros experimentos fue posible detectar la entrada de las proteínas al fluido vesicular de los cisticercos. La mayoría de las proteínas probadas fueron inmunoglobulinas debido a que es la proteína más abundante en el fluido vesicular de distintas especies de metacéstodos. Se probaron inmunoglobulinas de distintas especies incluyendo las de ratón, que es el huésped intermediario de la T. crassiceps. Además se probaron inmunoglobulinas de sueros hiperinmunes anti-cisticercos e inmunoglobulinas dirigidas específicamente en contra de una glicoproteína bien caracterizada en los cisticercos de la T. solium, también presente en T. crassiceps. Finalmente, se probó la internalización de BSA para manejar una proteína no relacionada. La idea detrás de probar tal variedad de inmunoglobulinas era la de encontrar alguna preferencia ya sea debida a la especie animal de la inmunoglobulina o a su especificidad. Se pretendía averiguar, por ejemplo, si una inmunoglobulina unida a una proteína de superficie del cisticercos era internalizada a mayor o menor velocidad que la inmunoglobulina no unida. En consecuencia, la observación de que todas las proteínas, incluyendo la BSA eran internalizadas con

una velocidad similar hizo pensar en un sistema inespecífico de internalización.

Los resultados obtenidos con los cisticercos de T. crassiceps concuerdan con resultados de experimentos similares en formas larvarias de otras especies de taénidos cultivados in vitro (Hustead y Williams, 1977).

La influencia observada de la temperatura sobre la velocidad de internalización claramente excluye la posibilidad de que las proteínas se escurren hacia el fluido vesicular por algún tipo de fisuras de la pared vesicular de los cisticercos, como había sido propuesto previamente (Esch y Kuhn, 1971; Conder et al., 1983). Este hallazgo es un indicio de que la internalización de proteínas ocurre a través de procesos endocíticos, como sucede en las células de otros eucariontes (Silverstein et al., 1977; Steinman et al., 1983; Holtzman, 1989). Cabe hacer notar que a pesar de que la internalización alcanza su máximo a temperaturas de 37°C, una pequeña cantidad es todavía internalizada a 4°C. Resultados de experimentos de estereología de las microvesículas tegumentales en cisticercos de T. crassiceps sugieren que los procesos endocíticos permanecen parcialmente activos a temperaturas frías (Dunn y Threadgold, 1984).

Los resultados obtenidos al evaluar la saturabilidad del sistema deben ser considerados con especial atención. El sistema es saturable, sin embargo, la saturación solo se alcanza en concentraciones de proteína en el medio de cultivo de 12 mg/ml. La alta concentración necesaria para saturar al sistema de

internalización podría ser una adaptación a las concentraciones de proteína que normalmente enfrenta el cisticerco dentro de su huésped. Por ejemplo, es sabido que durante una infección primaria con cisticercos de T. crassiceps se produce una hiperglobulinemia debida casi exclusivamente al aumento de una sola subclase: IgG1 (Siebert et al., 1981; Good et al., 1982). Aún en condiciones normales, los ratones tienen grandes cantidades de proteínas totales séricas [Proteínas totales 57 mg/ml: Albúmina 36.8 mg/ml y Globulinas 6 mg/ml (Melby, 1974)]. Las concentraciones de saturación con BSA mas que implicar que la superficie parasitaria esta saturada de receptores para albúmina, mas bien parecen sugerir que se trata de interacciones de baja afinidad. Además, puesto que todas las proteínas son internalizadas por igual, parece tratarse de un mecanismo mas general para adsorber proteínas en su superficie. En este sentido, la extraordinaria densidad de carga negativa observada desde hace muchos años en la superficie de los metacéstodos taénidos (Lumsden et al., 1970; Lumsden, 1972; Trimble III y Lumsden, 1975), sugiere que las proteínas simplemente se unen por carga electrica a la superficie tegumental. Los resultados de la exploración morfológica del proceso de internalización parecen apoyar esta idea (ver adelante).

Cualquiera que sea la explicación al punto anterior, la interrogante a responder se refiere a la capacidad real del sistema en términos de las cantidades de proteína que son internalizadas. Esta pregunta es pertinente ya que una capacidad

pequeña de internalización aunque podría explicar la presencia de proteínas del huésped en el fluido vesicular de los cisticercos, podría no tener relevancia en el contexto de la relación huésped-cisticerco. La estimación a partir de los experimentos de saturación con BSA fue realizada considerando la cantidad de marca internalizada en condiciones de saturación, es decir a máxima capacidad del sistema. De acuerdo a estos cálculos un solo cisticerco es capaz de internalizar 1.7×10^{19} moléculas de BSA/seg. Si esta aproximación inicial es cercana a la realidad esto significa una capacidad enorme de movilización de macromoléculas.

Las determinaciones de radioactividad unida a proteína sugieren que las proteínas internalizadas son posteriormente degradadas. Sin embargo, el proceso degradativo no fue explorado en la presente tesis, debido a que ya había sido estudiado anteriormente en otro proyecto en el mismo laboratorio. Solo se mencionará que experimentos en los que se incubaron proteínas yodadas con fluido vesicular de cisticercos de T. solium demuestran que la actividad proteolítica no reside en el fluido vesicular (Landa, 1988. Comunicación personal). Similares observaciones han sido obtenidas para cisticercos de T. taeniaeformis (Hayunga et al., 1989). Lo anterior sugiere que las proteínas intactas en el fluido vesicular son tomadas y degradadas por algún tipo celular en contacto con el fluido.

La estrategia experimental utilizada en los experimentos de internalización de proteínas marcadas radioactivamente, también

fue aplicada en los experimentos de caracterización morfológica de la internalización. En los experimentos de caracterización morfológica también se exploró la cinética de internalización (con tiempos de incubación de 2 a 60 minutos), empleando concentraciones de proteínas que saturan al sistema. También se aprovechó otra información obtenida anteriormente como la susceptibilidad del proceso de internalización a bajas temperaturas. Las macromoléculas utilizadas en la caracterización morfológica de la internalización fueron seleccionadas de acuerdo al tipo de proceso endocítico por estudiar, siguiendo recomendaciones bien establecidas en el campo (Steinman, 1983; Holtzman, 1989; Swanson, 1989). Sólo en el caso de la caracterización de la endocitosis fluída se emplearon sustancias no proteínicas (como el dextrán y el amarillo de lucifer que es un compuesto de bajo peso molecular impermeable a membranas plasmáticas).

Las primeras observaciones de caracterización morfológica fueron hechas al microscopio electrónico con cisticercos incubados en presencia de RR, que es un marcador catiónico electrodenso e impermeable a las membranas plasmáticas (Luft, 1971; Colin-Hughes, 1976). Los resultados mostraron que el RR se adhiere a la membrana plasmática de las microtricas o se encuentra formando agregados electrodensos sobre la superficie de las microtricas y desde estos lugares es tomado y llevado hacia el interior de los cisticercos a través de microvesículas tegumentales. Observaciones similares han sido realizadas en

metacéstodos de otras especies de céstodos como S. solidus y L. intestinalis (Threadgold y Hopkins, 1981), T. crassiceps (Threadgold y Dunn, 1983; Dunn y Threadgold, 1984) T. bovis (Scharamlová y Blazek, 1988). En todos los casos se estableció al menos una citología característica de endocitosis: microvesículas lisas y cubiertas, así como lisosomas (Threadgold y Dunn, 1983) sin que se hubieran utilizado marcadores específicos de endocitosis como se hizo en el presente proyecto de tesis.

La caracterización morfológica de la endocitosis fluída abarcó la utilización de marcadores considerados como clásicos de este tipo de endocitosis, así como de experimentos considerados definitorios (incubaciones en presencia de los marcadores por largos periodos de tiempo en altas concentraciones de marcador en el medio). Bajo estas condiciones no se observó endocitosis de los marcadores. La peroxidasa de rábano establecida como marcador clásico de endocitosis fluída por su nula adsorción a las membranas plasmáticas de células eucariontes (Bloom, 1976; Silverstein et al., 1977; Steinman, et al., 1983) no es considerado como tal en el caso de los cisticercos, ya que se adsorbe a la membrana plasmática de las microtricas.

La adsorción de la peroxidasa a la membrana plasmática no es una observación ya que ha sido establecido que el marcador no es inerte y tiene glicoproteínas que contienen manosa las cuales pueden enlazarse a receptores específicos de manosa (Holtzman, 1989). Al igual que el RR, la HRP fue observada formando aglomerados densos sobre la punta de las microtricas, además de

haber sido vista en microvesículas tegumentarias y en el intersticio. La concentración de la HRP dispersa sobre la punta de las microtricas y la HRP localizada en el intersticio estuvo relacionada con el tiempo de incubación. Estos resultados al compararlos con la determinación de la actividad enzimática de la HRP en el fluido vesicular muestran correlación. Estos dos resultados de experimentos diferentes muestran que los cisticercos internalizan la HRP hacia el intersticio que es bañado por el fluido vesicular, sin que la enzima pierda su actividad, es decir, manteniéndose intacta. Esta puede ser la ruta que siguen las proteínas para alcanzar el fluido vesicular sin que sean alteradas, como las inmunoglobulinas que conservan su actividad biológica dentro del fluido vesicular del quiste hidatídico y de los cisticercos de T. saginata (Coltorti y Varela-Díaz, 1972; Machnicka y Grzybowski, 1986). La internalización de la HRP desde la superficie parasitaria a través del tegumento por medio de microvesículas, así como su depósito en el intersticio por abajo de la membrana basal, parece un fenómeno similar a lo descrito como transcitosis de las inmunoglobulinas A y G monomérica en epitelio intestinal (Mostov y Simister, 1985; Simons y Wandinger-Ness, 1990).

La endocitosis de la ferritina cationizada, del RR y de la HRP, muestran que estos marcadores se adsorben a la superficie tegumental y luego son tomados por microvesículas tegumentales. Luego de algunos minutos de incubación las partículas de ferritina fueron observadas dentro de cuerpos multivesiculares.

Estos cuerpos multivesiculares también han sido vistos en células eucariontes al utilizar éste y otros marcadores (Helenius et al., 1983; Park et al., 1991) y han sido identificados como parte de los compartimientos endosomales (Helenius et al., 1983; Wileman et al., 1985; Holtzman, 1989; Park et al., 1991).

La utilización de IgGr y prot A como marcadores de endocitosis mediada por receptores se basó en los hallazgos de que en la superficie de varias especies de metacestodos hay inmunoglobulinas (Befus, 1977; Willms y Arcos, 1977; Threadgold y Befus, 1977; Sogandares-Bernal y Voge, 1978; Siebert et al., 1981). Los cortes de los cisticercos incubados con los marcadores a 4°C no mostraron internalización del marcador, sólo cuando los cisticercos son incubados a 37°C los marcadores eran internalizados.

La prot A-HRP fue un marcador especialmente adecuado para rastrear su internalización a través del tegumento. En este caso prácticamente no se observó señal por debajo de la membrana basal. En cambio la prot A-HRP fue fácilmente localizada en los puentes citoplásmicos, lo cual pudiera significar que un segundo destino de las macromoléculas internalizadas son los citones tegumentales.

Los experimentos en los que se utilizaron marcadores como oro coloidal y ferritina acoplados a las proteínas mostraron una muy escasa internalización. Varias pueden ser las causas que impiden que estos marcadores se observen en el interior del parásito. Una de ellas puede ser la insolubilidad del marcador

que impida su internalización. Otra posibilidad consiste en que los marcadores sean modificados en la superficie parasitaria. Se sabe por ejemplo, que el oro coloidal ya no es visto al microscopio electrónico en ciertas condiciones de pH (Bullock y Petrusz, 1982). Si esto sucede en la superficie del cisticerco tendrá que ser dilucidado posteriormente.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sugieren que los cisticercos de T. crassiceps no efectúan endocitosis fluída. En cambio, tanto la evidencia bioquímica como la morfológica indica que llevan a cabo una muy activa endocitosis adsortiva. Este parece ser el principal mecanismo de entrada de las macromoléculas al fluido vesicular. Inicialmente, las macromoléculas en el medio de cultivo se adsorben a la superficie parasitaria para luego ser incluidas en microvesículas tegumentales. A partir de entonces las microvesículas pueden tener dos posibles destinos. Por un lado las microvesículas pueden ser movilizadas hacia la membrana basal del tegumento y descargar su contenido en el espacio intersticial, en cuyo caso las macromoléculas simplemente difunden hacia el fluido vesicular. Esta podría ser la ruta que explica la presencia de las proteínas séricas del huésped en el fluido vesicular. Por el otro lado, algunas microvesículas son acarreadas hacia los citones tegumentales vía los puentes citoplásmicos, en cuyo caso es posible que su contenido no sea descargado hacia el fluido vesicular.

Varias líneas de evidencia indican que las macromoléculas internalizadas son posteriormente degradadas. Al respecto, la única información inequívoca es que la degradación no se lleva a cabo en el fluido vesicular. Una posibilidad es que algunos tipos celulares en contacto con el fluido vesicular tomen y degraden las macromoléculas para descargar los productos de deshecho nuevamente en el fluido vesicular.

Parece probable que un proceso similar ocurre "in vivo", aunque su significado en el contexto de la relación huésped-cisticerco es difícil de definir. Las proteínas del huésped pueden constituir una segunda fuente de nutrientes para el parásito, complementaria o alternativa a las micromoléculas (azúcares, aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, etc), que son tomadas a través de sistemas de transporte razonablemente bien caracterizados. Además, la internalización de macromoléculas puede cumplir una función de limpieza molecular en la interfase huésped-parásito, para remover proteínas (anticuerpos, proteínas del complemento, etc) potencialmente deletéreas.

El aclarar el significado biológico del proceso de internalización de macromoléculas va más allá de los alcances de la presente tesis. Sin embargo, la información presentada aquí, además de ampliar el entendimiento del potencial fisiológico de la pared vesicular de los cisticercos, reduce el número de posibilidades a investigar en futuros estudios dirigidos a aclarar estas interrogantes.

VI. Referencias.

Aluja, A. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in México. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 53-62.

Aluja, A.; Escobar, A.; Escobedo, F.; Flisser, A.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Madrazo, I.; Velázquez, J. y Willms, K. (1987). Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por Taenia solium. Biblioteca de la Salud. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.

Befus, A. (1977). Hymenolepis diminuta and H. microstoma: mouse immunoglobulins binding to the tegumental surface. Exp. Parasitol. 41: 242.

Bishop, G.A. y King, J.S. (1982). Intracellular horseradish peroxidase injections for tracing neuronal connections. In tracing neuronal connections with horseradish peroxidase. Ed. M.M. Mesulan. John Wiley and Sons, LTD. Págs: 185-247.

Bloom, B.R. y David, J.R. (1976). In vitro Methods in cell mediated and tumor immunity. Edit. Academic Press. Inc. U.S.A. Págs: 379-386.

Bullock, G.R. y Petrusz, P. (1982). Techniques in immunocytochemistry. Vol II. Cap. Colloidal gold markers for cytochemistry. Págs: 249. Edit. Academic Press. U.S.A.

Cheng, T.C. (1973). General Parasitology. Ed. Academic Press. U.S.A.

Colin Hughes, R. (1976). Membrane glicoproteins. Ed. Butterworths. London, Great Britain. Págs: 6- 27.

Coltorti, E.A. y Varela-Díaz, V.M. (1972). IgG levels and host specificity in hydatidic cist fluid. J. Parasitol. 58(4); 753-756.

Coltorti, E.A. y Varela-Díaz, V.M. (1974). Echinococcus granulosus: Penetration of macromolecules and their localization in the parasite membranes cysts. *Exp. Parasitol.* 35; 225-231.

Conder, G.A., Marchiondo, A.A.; Williams, J.F. y Andersen, F.L. (1983). Freeze-etch characterization of the teguments of three metacestodes: Echinococcus granulosus, Taenia crassiceps, and Taenia taeniaeformis. *J. Parasitol.* 69 (3); 539-548.

Darnell, J.; Lodish, H. y Baltimore, D. (1986). *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc. U.S.A. Cap. 15, Págs.: 638-666.

Dunn, J., y Threadgold, L.T. (1984). Taenia crassiceps: temperature, polycations, polyanions, and cysticercal endocytosis. *Exp. Parasitol.* 58; 110-121.

Esch, W. y Kuhn, R.E. (1971). The uptake of ¹⁴C- Chlorella protein by larval T. crassiceps (cestoda). *Parasitol.* 62; 27-29.

Freeman, R.S. (1962). Studies on the biology of Taenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40; 969-990.

Garvey, S. J. (1982). *Methods in Immunology*. 3d. edition. Ed. W.A. Benjamin. U.S.A. Págs: 171-182.

Good, A.H.; Siebert, A.E.; Robbins, P. y Zaun, S. (1982). Modulation of the host immune response by larvae of Taenia crassiceps. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 593-610.

Hartree, E. (1979). Determination of protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Chem.* 28: 422.

Hayunga, E.G.; Sumner, M.P. y Letonja, T. (1989). Evidence for selective incorporation of host Immunoglobulin by strobilocerci of Taenia taeniaeformis. *J. Parasitol.* 75 (4); 638-642.

Helenius, A.; Mellman, I.; Wall, D. y Hubbard, A. (1983). Endosomes. TIBS. July. 245-250.

Hird, W. y Pullen, M. (1979). Tapeworms, meat and man: A brief review and update of cysticercosis caused by Taenia saginata and Taenia solium. J. Food Protection. 42; 58.

Holtzman, E. Lysosomes. (1989). Edit. Plenum Press. New York, U.S.A.

Hustead, S.T. y Williams, J.F. (1977a). Permeability studies on taeniid metacestodes: . Uptake of proteins by larval stages of Taenia taeniaformis, Taenia crassiceps, and Echinococcus granulosus. J. Parasitol. 63 (2); 314-321.

Hustead, S.T. y Williams, J.F. (1977b). Permeability studies on taeniid metacestodes: II antibody-mediated effects on membrane permeability in larvae of Taenia taeniaformis and Taenia crassiceps. J. Parasitol. 63 (2); 322- 326.

Karnovsky, M.A. (1965). Formaldehyde-glutaraldehyde of high osmolality for use in electron microscopy. J.Cell.Biol. 15; 173.

Kusel, J.R. y Gordon, F. (1989). Biophysical studies of the schistosome surface and their relevance to its properties under immune attack. Parasite Immunol. 11 (5); 431-451.

Kwa, B. y Liew, F. (1978). Studies on humoral immunity against Taenia taeniaeformis infection in rats. J. Helminthol. 52: 99.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London). 227: 680-685.

Landa, P.A. 1989. Estudio de las glicoproteínas de superficie del cisticerco de la Taenia solium. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

Larralde, C.; Sciutto, E.; Huerta, L.; Terrazas, I.; Fragoso, G.; Trueba, L.; Lemus, D.; Lomeli, C.; Tapia, G.; Montoya, R.M.; Díaz, M.L. y Govezensky, T. (1989). Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia*. 57 (2); 131-134.

Luft, J.H. (1971). Ruthenium red and Violet. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.* 171; 347-368.

Lumsden, R.D.; Oaks, J.A. y Alworth, L. (1970). Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. IV. Localization and cytochemical properties of membrane-fixed cation binding sites. *J. Parasitol.* 56 (4); 736-747.

Lumsden, R.D.; Threagold, L.T.; Oaks, J.A. y Arme, C. (1970). On the permeability of cestodes to colloids: An evaluation of the transmembranosus hypothesis. *Parasit.* 60; 185-193.

Lumsden, R.D. (1972). Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. VI. Cytochemical evaluation of electrostatic charge. *J. Parasitol.* 58 (2); 229-234.

Lumsden, R.D.; Voge, M. y Sogandares-Bernal, F. (1982). The metacestode tegument: Fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 307-361.

Machnicka, B. y Grzybowski, J. (1986). Host serum proteins in *Taenia saginata* metacestode fluid. *Vet. Parasitol.* 19; 47-54.

Melby, E.C.M. (1974). Handbook of laboratory animal science. Vol. II. Edit. CRC Press. U.S.A.

Mitchell, G., Marchalonis, J., Smith, P., Nicholas, W. y Warner, N. (1977). Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Immunoglobulins associated with the larvae of *Mesocestoides corti*. *Aust. J. Exp. Biol. and Med. Sci.* 55: 187.

Mostov, K.E y Simister, N.E. (1985). Transcytosis. *Cell*. 43 (part 1), 389-390.

Park, J.E.; Lopez, J.M.; Cluett, E.B. y Brown, J.B. (1991). Identification of a membrane glycoprotein found primarily in the prelysosomal endosomal compartment. *J. Cell.Biol.* 112 (2); 245-255.

Ramírez-Bon, E.; Merchant, M. T.; González-del Pliego, M. y Cañedo, L. (1982). Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of Taenia solium. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 261-280.

Rothman, A.H. (1967). Colloid transport in the cestode Hymenolepis diminuta. *Exp. Parasit.* 21; 133- 136.

Scharamlovà, J. y Blazek, K. (1988). Cisticercus bovis: pynocytosis in the cysticercus tegument. *Folia Parasitologica*. 35(3); 223-226. Tomada de Helm. Abstracts. (series A) 58(9); 348. Abstract 2831.

Siebert, A.E., Blitz, R.R.; Morita, C.T. y Good, A.H. (1981). T. crassiceps: Serum and surface immunoglobulins in metacestode infections in mice. *Exp. Parasitol.* 51. 2413-2426.

Silverstein, S.C.; Steinman, R.M. y Cohn, Z.A. (1977). Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46; 669-722.

Simionescu, N. y Palade, G.E. (1971). dextrans and glycogen as particulate tracers for studying capillary permeability. *J. Cell. Biol.* 50: 616.

Simionescu, N.; Simionescu, M. y Palade, G.E. (1972). Permeability of intestinal capillaries. Pathway followed by dextrans and glycogens. *J. Cell. Biol.* 53; 365-392.

Simons, K. y Wandinger-Ness, A. (1990). Polarized sorting in epithelia. *Cell* 62; 207-210.

Sogandares-Bernal, F. y Voge, M. (1978). Immunoglobulins on the surfaces of tetrathyridia of Mesocestoides corti. *Hoepli 1925 (Cestoda)*, from laboratory infections of ICR mice. *J. Parasitol.* 64: 620.

Steinman, R.M. ; Mellman, I.; Muller, W.A. y Cohn, Z. (1983). Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 96; 1-27.

Swanson, J.A. (1989). Fluorescent labeling of endocytic compartments. *Meth. Cell Biol.* 29; Págs: 137-151.

Threadgold, L.T. y Befus, A. (1977). Hymenolepis diminuta: Ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument. *Exp. Parasitol.* 43. 169.

Threadgold, L.T. y Hopkins, C.A. (1981). Schistocephalus solidus and Ligula intestinalis: Pinocytosis by the tegument. *Exp. Parasit.* 51; 444-456.

Threadgold, L.T. y Dunn, J. (1983). T. crassiceps. Regional variations in ultrastructure and evidence of endocytosis in the cysticercus tegument. *Exp. Parasit.* 55; 121-131.

Trimble III, J.J. y Lumsden, R.D. (1975). Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in Taenia crassiceps larvae. *J. Parasitol.* 61 (4); 665-676.

Varela-Díaz, V.M. y Coltorti, E.A. (1972a). Further evidence of the passage of host immunoglobulins into hydatidic cysts. *J. Parasit.* 58 (5); 1015- 1016.

Varela-Díaz, V.M. y Coltorti, E.A. (1972b). IgG levels and host specificity in hydatidic cist fluid. *J. Parasit.* 58 (4); 753-756.

Wallace, R.A. y Ho, T. (1972). Protein incorporation by isolated amphibian oocytes. II. A survey of inhibitors. *J. Exp. Zool.* 181; 303-318.

Wileman, T.; Harding, C. y Stahl, P. (1985). Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 232; 1-14.

Williams, J.F.; EngelKirk, P.G. y Lindsay, M.C. (1982). Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 621-630.

Willms, K. y Arcos L. (1977). Taenia solium: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396.

Willms, K.; Merchant, M.T.; Diaz, S. y Arcos, L. (1982). Host-parasite interface in the metacestode of Taenia solium. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 397-411.

Woodhouse, E.; Flisser, A y C. Larralde. Seroepidemiology of human cysticercosis in México. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 11-23.

Zenteno-Alanís, G.H. A classification of human cysticercosis. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Ed. A. Flisser et al. Academic Press. New York, U.S.A. Págs: 107-126.