

Parasitología molecular

HELMINTOLOGÍA

***Schistosoma mansoni* antigens alter cytokine response in cutaneous leishmaniasis**

Aline Báfica, Luciana Cardoso, Giuseppe Tittoni, Ricardo Riccio, Olívia Bacellar, Sergio Costa, Alfredo Costa, Alex Loukas, Edgar M. de Carvalho, Maria Ilma Araújo
Serviço de Imunologia, HUPES, UFBA, INCT-DT (CNPQ/MCT), Brazil

Introduction. *Schistosoma mansoni* infection or parasite products are able to down-modulate the Th1 inflammatory response involved in autoimmune diseases. We evaluate the effects of some *S. mansoni* antigens on the immune response induced by the soluble *Leishmania* antigen (SLA) in cells of cutaneous leishmaniasis patients.

Methods. Cytokines were measured in supernatants of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures stimulated with soluble *Leishmania* antigen in the presence and absence of *S. mansoni* recombinant antigens Sm29, SmTSP-2 and PIII, using a sandwich ELISA technique.

Results. The addition of *S. mansoni* antigens to the cultures resulted in reduction in IFN- γ levels in 37 to 50% of patients. The addition of Sm29, SmTSP-2 and PIII to the cultures resulted in increased levels of IL-10 in 68.4, 52.6 and 47.4% of patients, respectively, while levels of IL-5 were increased in 21.0, 15.8 and 26.3% of them when the tree antigens were added to the cultures. We compare the groups of patients who had or not reduction in IFN- γ production in cultures stimulated with soluble *Leishmania* antigen in the presence of *S. mansoni* antigens. The frequency of individuals who had increased levels of IL-10 and IL-5 in response to *S. mansoni* antigens did not differ significantly between groups. Patients who did not present inhibition in IFN- γ levels by the addition of SmTSP-2 to the cultures had however, smaller lesions size compared to those who presented inhibition in this cytokine production. There was no significant difference in other clinical parameters such as number of lesions and number of Sb(v) courses between these two groups of patients when *S. mansoni* antigens were added to the cultures.

Conclusion. The antigens used in this study down-modulated the *in vitro* proinflammatory response

induced by soluble *Leishmania* antigen in a group of cutaneous leishmaniasis patients by still not well understood mechanisms.

Financial support. CNPQ Universal 479417/-2008.

• • •

Análisis bioquímicos de extractos de vermes adultos de *Fasciola hepatica*

Diana Ballén, Mairym Barrios, Greslena Aparicio, Italo Cesari

Unidad de Trematodiasis, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela

Introducción. *Fasciola hepatica* es un trematodo que causa lesiones en el hígado y las vías biliares que afectan a herbívoros y al hombre, constituyendo un problema de salud pública a nivel mundial. El parásito posee glucoproteínas y enzimas que facilitan su penetración y migración en los tejidos huéspedes.

El objetivo fue evaluar estos componentes en extractos de vermes adultos de *F. hepatica*.

Materiales y métodos. Los vermes adultos se recuperaron de hígados infectados de ganado vacuno, se homogenizaron en agua destilada y la suspensión se ultracentrifugó a 100.000g a 4°C por dos horas, obteniéndose una fracción soluble y otra particulada [extraída con *n*-butanol/agua (v/v)]. Los extractos se analizaron para proteínas, carbohidratos, actividades enzimáticas y por SDS-PAGE-15 % en condiciones no reductoras y reductoras.

Resultados. En la fracción soluble, la concentración de proteínas fue de 1,58 mg/ml y la de carbohidratos fue de 5,63 μ mol/ml. Se detectó gran actividad de: fosfatasa ácida (1,46 μ mol/hora/mg, pH 5,0), así como actividades de fosfatasa alcalina (0,383 μ mol/hora/mg, pH 9,6), leucina aminopeptidasa (0,299 μ mol/hora/mg, pH 8,0), β -N-acetil glucosaminidasa (0,173 μ mol/hora/mg, pH 5,6), α -aminopeptidasa (0,123 μ mol/hora/mg, pH 8,0), α -manosidasa (0,108 μ mol/hora/mg, pH 5,6) y fosfodiesterasa (0,028 μ mol/hora/mg, pH 9,6).

En la fracción particulada, la concentración de proteínas fue de 0,227 mg/ml y la de carbohidratos fue de 7,9 μ mol/ml. Se observaron valores elevados de fosfatasa alcalina (5,04 μ mol/hora/mg), fosfatasa ácida (1,13 μ mol/hora/mg) y

actividad moderada de fosfodiesterasa (0,280 $\mu\text{mol/hora/mg}$, pH 9,6). La acetilcolinesterasa fue mayor en la fracción soluble que en la particulada (0,058 Vs. 0,008 en una hora). SDS-PAGE (15 %) (no reductoras y reductoras) mostró polipéptidos de 80 a 10 kDa en cada extracto; el pretratamiento con Na-metaperiodato redujo el número de bandas en cada extracto, lo que sugiere la presencia de glucocomponentes.

Conclusiones. Se observaron interesantes diferencias cuantitativas y cualitativas (funcionales) de enzimas y glucocomponentes en la fracción soluble y la particulada de *F. hepatica*, lo cual constituye un aporte a la identificación de posibles blancos inmunológicos y farmacológicos.

• • •

Actividad fibrinolítica y anticoagulante de una anexina de *Schistosoma bovis*

E. de la Torre-Escudero¹, R. Manzano-Román¹, V. Díaz-Martín¹, A. Hernández-González¹, M. Siles-Lucas¹, R. Pérez-Sánchez¹, J. C. Moyano², I. Barrera³, Ana Oleaga¹

¹ Grupo de Parasitología, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, España

² Servicio de Análisis Clínicos, Complejo Hospitalario de Salamanca, España

³ Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca, España

Introducción. Las anexinas son una familia de proteínas multigénicas presentes en muchos organismos. Son proteínas citosólicas solubles que, aunque carecen de péptido señal, se han detectado en fluidos extracelulares y se asocian a la superficie celular donde desempeñan funciones antihemostáticas y antiinflamatorias. En los esquistosomas, la anexina se ha identificado en abundancia en el tegumento, aunque se desconoce su función.

El objetivo fue comprobar si la anexina expresada en la superficie del tegumento de *Schistosoma bovis* presenta alguna actividad fibrinolítica, anticoagulante o ambas.

Materiales y métodos. El ADNc codificante de la anexina se sintetizó a partir de ARN de vermes adultos y se clonó en el vector pSC-A para su secuenciación. Posteriormente, se subclonó en el vector de expresión pQE-30 y se expresó en *E. coli* M15. La anexina recombinante (rSbANX) se empleó para realizar los ensayos de actividad fibrinolítica (fijación y activación de plasminógeno) y anticoagulante (tiempo de protrombina y tiempo parcial de tromboplastina) y en la obtención de una sonda específica para los estudios de expresión tisular.

Resultados. El análisis bioinformático de la secuencia mostró que la anexina de *S. bovis* posee la estructura secundaria y terciaria típica de las anexinas de otros organismos. Los ensayos de actividad revelaron que la rSbANX es biológicamente activa y mostró propiedades anticoagulantes y fibrinolíticas. Finalmente, se demostró la expresión de la proteína nativa en la superficie del tegumento de los vermes adultos y de las esquistosomas pulmonares.

Conclusiones. La anexina podría ser utilizada por *S. bovis*, junto con otras proteínas del tegumento de probada actividad profibrinolítica como la enolasa, para evitar la formación de trombos y otras alteraciones hemostáticas que podrían ser letales para la supervivencia del parásito en el torrente sanguíneo. Las actividades antihemostáticas demostradas, y otras potenciales funciones inmunomoduladoras, convierten a la anexina en una interesante diana para el desarrollo de nuevas vacunas anti-esquistosoma.

• • •

O papel de mediadores da imunidade celular na fasciolose crônica de bovinos naturalmente infectados

Eveline Albuquerque Mendes, Sara Lopes dos Santos, Daniella Castanheira Bartholomeu, Walter dos Santos Lima

Fasciola hepatica, parasito dos ductos hepáticos de hospedeiros vertebrados é responsável pela fasciolose, doença parasitária que apresenta distribuição mundial e importância na medicina humana por ser uma zoonose e na medicina veterinária por causar elevados prejuízos às criações de bovinos e ovinos. Os mecanismos envolvidos nas repostas à infecção sugerem a atuação de um sistema integrado entre componentes do hospedeiro e do parasito que se desenvolve, entre outros, com a participação e interação de tipos celulares e mediadores de processos biológicos essenciais.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão gênica dos mediadores celulares IFN γ e IL-4 na fasciolose crônica de bovinos naturalmente infectados.

Fígados dos bovinos infectados foram obtidos de abatedouro em área de infecção natural pelo parasito e fígados dos não infectados obtidos de abatedouro em área livre de infecção. O RNA total das amostras foi extraído pelo método do trizol, a integridade desses avaliada em gel de agarose. O cDNA foi sintetizado a partir de 5 μg de RNA total usando o Kit SuperScript[®] III (Invitrogen).

Os *primers* para IFN γ , IL-4 e GAPDH (gene constitutivo), foram selecionados de sequências de *Bos taurus*, disponíveis no GenBank.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no sistema de detecção ABI PRISM 7500 em presença de master mix SYBR green (*Applied Biosystems*) e analisados no software (SDS) v2.0.1.

As curvas de dissociação com um único pico foram confirmadas para IFN γ e GAPDH, as reações apresentaram eficiência de amplificação acima de 89%. O método do Ct comparativo foi utilizado nas análises.

A análise estatística mostrou que nos animais infectados a expressão do gene IFN γ encontra-se diminuída ($p=0,0006$) em relação aos animais controle, sugerindo uma modulação negativa desta citocina na fasciolose crônica de bovinos naturalmente infectados. As reações de PCR em tempo real para o gene IL-4 estão sendo otimizadas.

• • •

Diferencias moleculares entre cuatro aislamientos de *Trichinella* spp.

Luz Ofelia Franco-Sandoval, Enedina Jiménez-Cardoso
Laboratorio de Investigación en Parasitología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México D.F., México

Introducción. La triquinosis es una enfermedad zoonótica y cosmopolita ocasionada por nematodos del género *Trichinella*, que afecta a un gran número de animales carnívoros y huéspedes incidentales. Existen reportes de la presencia de *Trichinella spiralis* en perros que, al comer carne con larvas viables L1 de este parásito, se infectan y desarrollan la triquinosis, lo que establece una conexión con el huésped natural (el cerdo) que puede servir como reservorio de la infección para el humano. Actualmente, no se han llevado a cabo estudios para determinar diferencias genéticas e inmunológicas entre aislamientos de *Trichinella* spp.

Material y métodos. Las larvas (L1) obtenidas de músculo esquelético de perros, fueron mantenidas en ratas Wistar y recuperadas mediante digestión artificial y la técnica modificada del embudo de Baermann. La amplificación de los genes *5sRNA* e *IsRNA* se hizo de acuerdo con metodologías previamente descritas. Los productos obtenidos se observaron en geles de agarosa al 2 %, teñidos con bromuro de etidio. El análisis bioinformático de la secuenciación se llevó a cabo utilizando los programas Bioedit y Mega5.

Resultados. Al amplificar el gen *5sRNA*, se obtuvo un fragmento de 750 pb, para la cepa de referencia y los cuatro aislados, lo que indica que se trata de especies que poseen larvas encapsuladas; al utilizar el gen *IsRNA*, se generó un amplicón de 290 pb propio de *T. spiralis*. En relación con el alineamiento de las secuencias, se mostró que tienen aproximadamente 83 % de similitud entre ellas, por lo que genéticamente no son iguales.

Conclusiones. La amplificación de los genes *5sRNA* e *IsRNA* no presentó diferencias entre los aislamientos y la cepa de referencia. Sin embargo, el análisis de las secuencias mostró que estas no tienen un 100 % de similitud; esto se debe a la diferencia entre el perro y el cerdo como huéspedes, lo que pudiera estar relacionado con la capacidad patógena.

• • •

Expresión diferencial de glucoproteína P en *Fasciola hepatica* proveniente de animales bovinos, ovinos y cerdos de Cajamarca, Perú, y sus implicancias en el desarrollo de resistencia antihelmíntica

Hugo Solana¹, Silvana Scarcella¹, Pamela Lamenza¹, José Tort², Corpus Cabrera³, María Cabrera³, Carlos Rosales⁴, Pedro Ortiz³

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Argentina

² Facultad de Medicina. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro, Cajamarca, Perú

⁴ Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Centro, Cajamarca, Perú

Introducción. En la fasciolosis existe el fenómeno de infección cruzada, en donde la convivencia de bovinos, ovinos y cerdos permite que el parásito repique entre especies. Estos pasajes entre diferentes huéspedes condicionan modificaciones de adaptación al nuevo entorno. La resistencia antihelmíntica está en franco aumento en todo el mundo y es necesario ampliar los conocimientos de las causas de la expresión de dicho fenómeno. Uno de los mecanismos de manifestación de resistencia es la expresión exagerada de la glucoproteína-P (Gp-P), una bomba extrusora de membrana con amplia especificidad de sustrato, por lo cual la resistencia antihelmíntica podría ser modulada por esta vía.

El objetivo del presente trabajo fue analizar comparativamente el nivel de expresión del ARNm

correspondiente a glucoproteína-P de *Fasciola hepatica* proveniente de bovinos, ovinos y cerdos.

Materiales y métodos. Se procesaron ejemplares adultos de *F. hepatica* que parasitaban bovinos, ovinos y cerdos obtenidos del camal de Cajamarca (Perú) de la forma convencional para la extracción del ARN correspondiente, analizando el nivel de expresión del ARNm para la glucoproteína-P por utilización de *primers* específicos diseñados para tal efecto. Dicha semicuantificación se hizo mediante el análisis de bandas, utilizando el programa ImageJ®.

Resultados. Las fasciolas provenientes de ovinos y bovinos presentaron una mayor expresión de ARNm para la glucoproteína-P en relación con las obtenidas de porcinos. Dichos valores arbitrarios fueron de 2 en el caso del ovino y de 1,5 en el bovino, en relación con el valor 1 del porcino.

Conclusiones. La expresión del ARNm correspondiente a la glucoproteína-P varía según el huésped del cual se deriva el verme adulto. Dicha diferencia se relaciona con el grado de resistencia de los diferentes huéspedes frente a la parasitosis. La convivencia de bovinos, ovinos y cerdos, con las consecuentes modificaciones de adaptación del parásito al nuevo entorno, podría ser un factor desencadenante de resistencia antihelmíntica.

• • •

Respuesta de citocinas en huéspedes de alta y de baja compatibilidad infectados con *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae)

Javier Sotillo, María Trelis, Alba Cortés, Antonio Marcilla, José Guillermo Esteban, Rafael Toledo
Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Valencia, España

Introducción. Los factores involucrados en la expulsión de *Echinostoma caproni* de su huésped definitivo permanecen aún desconocidos. En este sentido, las citocinas juegan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria y, por tanto, tendrían gran importancia en la resolución o en la cronicidad de la infección por *E. caproni*.

El objetivo del estudio fue caracterizar la respuesta por citocinas en huéspedes de diferente compatibilidad con *E. caproni*.

Materiales y métodos. Se infectaron 12 ratones ICR y 12 ratas Wistar con 75 y 100 metacercarias de *E. caproni*, respectivamente, y cuatro animales de cada especie permanecieron sin infectar sirviendo como controles negativos. Se sacrificaron

tres animales cada dos semanas y se extrajo el ARNm del bazo, las placas de Peyer, los ganglios linfáticos mesentéricos y el intestino de cada uno de ellos. El ARNm fue convertido a ADNc mediante RT-PCR.

Se analizaron las citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- α , TGF- β , IL-17, IL-23 y eotaxina/CCL11, por PCR en tiempo real mediante sondas Taqman® e iniciadores diseñados por Applied Biosystems. Los resultados se analizaron mediante el *software* StepOnePlus®.

Resultados. La respuesta del huésped de alta compatibilidad (ratón) se caracteriza por un equilibrio Th1/Th2 en el bazo, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos. Las respuestas de las ratas en estos tejidos fueron similares a la descrita para ratón. En el intestino de los ratones se observó una importante respuesta Th1 con elevados aumentos de IFN- γ , mientras que en el intestino de ratas la respuesta se caracterizó por aumentos de las IL-5, IL-6, IL-13, IL-17 y TGF- β , lo que sugiere un equilibrio Th2/Th17 en este huésped.

Conclusiones. Las infecciones crónicas están asociadas a respuestas Th1 con elevados niveles de IFN- γ , mientras que la expulsión de *E. caproni* se asociaría a respuestas Th2/Th17.

Financiación. Proyectos: PS09/02355 del Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, España) y FEDER (Unión Europea); SAF2010-16263 del Ministerio de Ciencia e Innovación (Madrid, España); PROMETEO/2009/081 de la Conselleria d'Educació, Generalitat Valenciana (Valencia, España); UV-AE-10-23739 y UV-INV-AE11-40915 de la Universitat de València (Valencia, España). Este trabajo ha sido llevado a cabo siendo el tercer autor (A.C.) beneficiario de un contrato pre-doctoral de la Universitat de València (Valencia, España).

• • •

Caracterização de cepas de *Strongyloides stercoralis* (Bavay, 1876) Stiles & Hassall, 1902 (Rhabditida, Strongyloididae) isoladas de indivíduos da região de Araraquara, SP, Brasil

Júlio César Miné¹, Cláudia Solano Rocha¹, Marco Túlio Alves da Silva², Regina Maria Barretto Cicarelli¹, João Aristeu da Rosa¹

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP, Brasil

² Instituto de Física, USP, São Carlos-SP, Brasil

Introdução. Estudos sobre frequência de enteroparasitos mostram que a estrogiloidíase é endêmica na região de Araraquara, SP, Brasil. Com o intuito de realizar caracterização morfológica e molecular de diferentes isolados humanos de *Strongyloides stercoralis*, provenientes dos municípios de Araraquara, Américo Brasiliense, Gavião Peixoto, Motuca e Rincão foi feita a mensuração de larvas rabditóides e filarióides e sequenciamento da região ITS-1 do rDNA das larvas filarióides.

Material e métodos. Com o auxílio do programa de captura e mensuração de imagens Motic Images Advanced 3.2., parâmetros morfológicos de larvas rabditóides e filarióides foram obtidos. A extração do DNA genômico das larvas filarióides foi realizada e em seguida realizou-se a amplificação do gene ITS-1 por meio de NESTED-PCR. Os fragmentos de aproximadamente 680 pb obtidos foram purificados, sequenciados e a comparação de sequências foi realizada pelo programa ClustalW.

Resultados. Não foi possível caracterizar diferentes cepas de *S. stercoralis* pela análise morfológica, uma vez que os valores dos parâmetros mensurados foram bastante homogêneos em larvas de pacientes provenientes de municípios distintos. Porém, por meio do sequenciamento da região ITS-1 do rDNA de larvas filarióides de *S. stercoralis* de 43 isolados provenientes de Américo Brasiliense, Araraquara, Gavião Peixoto e Rincão foi possível caracterizar cepas distintas desse nematódeo, uma vez que essas sequências, quando comparadas dentro do mesmo grupo (Araraquara *versus* Araraquara), mostraram alto grau de conservação; entretanto, quando comparadas separadamente (Araraquara *versus* Américo Brasiliense), mostraram-se altamente polimórficas.

Conclusão. Tal observação permite sugerir que a região ITS-1 do rDNA possa ser utilizada como marcador para a caracterização de diferentes cepas de *S. stercoralis*, já que apenas os caracteres morfológicos não são suficientes para detecção de diferentes cepas desse parasito.

• • •

La neurocisticercosis grave en humanos incrementa las células T reguladoras periféricas y su reclutamiento en el sistema nervioso central.

Laura Adalid-Peralta¹, Fleury Agnes¹, Teresa García-

Ibarra², Marisela Hernández², Michael Parkhouse³, José Crispín⁴, Jefferson Proaño⁵, Gladis Fragoso², Edda Sciutto²

¹ Unidad Periférica para el Estudio de Neuroinflamación en Patologías Neurológicas, IIB, UNAM, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA, México, D.F., México

² Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; México, D.F., México

³ Gulbenkian Institute for Science, Oeiras, Portugal

⁴ Department of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, USA

⁵ Unidad Médica de Investigación en Enfermedades Neurológicas. Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional Siglo XXI, México D.F., México

Introducción. La neurocisticercosis humana, causada por el metacestodo de *Taenia solium*, es la enfermedad parasitaria más frecuente en el sistema nervioso central. La mayoría de los casos ocurren con pocos o ningún síntoma neurológico. Sin embargo, en algunos pacientes la inflamación exacerbada conduce a una forma grave de la enfermedad.

El objetivo del estudio fue determinar el papel de las células T reguladoras (Treg) en el control de la inflamación durante la etapa crónica.

Materiales y métodos. Se determinó la frecuencia de células T reguladoras mediante citometría de flujo en muestras pareadas de líquido cefalorraquídeo y de sangre tomadas en ocho pacientes con neurocisticercosis humana. De igual manera, se analizó la respuesta inmunitaria en los pacientes con neurocisticercosis humana por medio del perfil de citocinas, la proliferación por estimulación antigénica y el fenotipo de activación de linfocitos.

Resultados. Nuestros datos revelaron un aumento en células T reguladoras periféricas, definidas como células CD4+CD25^{high}, CD4+CD25^{high} FoxP3⁺, CD4+CD25^{high} CTLA4⁺ y CD4+CD25^{high} IL10⁺ en pacientes con neurocisticercosis humana, tanto tratados como no tratados. Estas células mostraron una correlación positiva con las células T reguladoras encontradas en el sistema nervioso central. El incremento en las células T reguladoras se acompaña de depresión específica y no específica en la respuesta de proliferación, y por una correlación negativa en los marcadores de activación temprana (CD69⁺) en CD4⁺ y CD8⁺ en la sangre. Estos datos sugieren un efecto regulador de las células T reguladoras en la neuroinflamación.

Conclusiones. Los hallazgos reportados en este trabajo sustentan la hipótesis de que las células T reguladoras del líquido cefalorraquídeo

y las sistémicas contribuyen a limitar la respuesta inflamatoria y, posiblemente, reducen el daño tisular resultante, aunque pudieran disminuir la eficiencia de la inmunidad específica para destruir al parásito.

• • •

***Schistosoma* spp. antigens down-modulate the Th1-inflammatory response in HTLV-1 infected individuals**

Luciane Mota Lima¹, Silvane Braga Santos¹, Aline Báfica¹, Luciana Santos Cardoso¹, Sergio Costa Oliveira², Alfredo Miranda Góes², Alex Loukas³, Edgar M. de Carvalho¹, Maria Ilma Araújo¹

¹ Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brasil

² Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

³ Division of Infectious Diseases, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland, Australia

Introduction. The HTLV-1 (human T cell lymphotropic virus type 1) is the causal agent of adult T cell Leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). While the immune response to HTLV-1 infection is polarized to the Th1-type, in chronic schistosomiasis there is a deviation toward a Th2-immune response. In the last five years it has been demonstrated in experimental models that infection with *S. mansoni* or injection of *S. mansoni* antigens modulate the Th1 response involved in some auto-immune diseases. The objective of this study was to evaluate the capacity of *Schistosoma* spp. antigens in modulates the inflammatory response in patients infected with HTLV-1.

Methodology. The *Schistosoma* antigens Sm29, ShTSP2 and PIII were added to the cultures of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients infected with HTLV-1 (n=19) and the levels of cytokines in the supernatants were measure using the ELISA sandwich method.

Results. Compared to the levels of cytokine in non stimulated PBMC cultures, the levels of IFN- γ and TNF- α were reduced by the presence of Sm29 in 50 and 46.7% of patients (mean reduction 48% and 43% respectively, p<0.05), in 61.1 and 33.3% of them by the presence of ShTsp2 (mean reduction 46% and 48% respectively, p<0.05) and in 44.4 and 53.3% when PIII was added to the cultures (mean reduction=34% and 59%, respectively; p<0.05). On the other hand, the levels of IL-10 increased by the

addiction of Sm29, ShTsp2 and PIII in 68.4, 78.9 and 52.6% of individuals (mean increase=1029, 1897 and 41%, respectively; p<0.01).

Conclusion. *Schistosoma* spp. antigens are able to down-modulate the *in vitro* IFN- γ and TNF- α production in a significant number of HTLV-1 infected individuals. **Financial support.** CNPQ (Universal 479417/2008 3), NIH (R01AI079238A).

• • •

Expresión diferencial de Sec14Tsol en cisticercos de *Taenia solium* obtenidos del sistema nervioso central y el músculo esquelético de cerdos

H. Palafox-Fonseca¹, C. Helguera², I. Estrada², N. Villalobos³, M. Hernández¹, B. Hernández⁴, G. Rosas⁵, R. Bobes¹, E. Sciutto¹, G. González¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México

² Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México

⁴ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México

⁵ Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, México

Introducción. La cisticercosis es una enfermedad causada por el cisticerco de *Taenia solium*, el cual puede alojarse en sistema nervioso central y el músculo esquelético de cerdos y humanos. En cerdos, se ha observado que los cisticercos alojados en sistema nervioso central permanecen en forma vesicular por periodos prolongados, a diferencia de los de músculo esquelético. En este trabajo se evaluó la expresión diferencial de genes entre cisticercos recuperados de diferentes regiones anatómicas del cerdo.

Materiales y métodos. Se extrajo el ADN y ARN de cisticercos obtenidos del sistema nervioso central y el músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados y se analizó la variación genética mediante *Random Amplified polymorphic DNA* (RAPD) y de expresión genética mediante DD RT-PCR de tres cisticercos por cada localización anatómica.

Resultados. Se encontraron diferencias en los perfiles de expresión genética entre los cisticercos recuperados de distintas localizaciones que no se deben a diferencias genéticas. Se expresaron diferencialmente 22 bandas entre los cisticercos obtenidos de sistema nervioso central y músculo esquelético, de las cuales se eligieron seis

para análisis posteriores; cuatro de ellas están expresadas exageradamente en cisticercos provenientes de sistema nervioso central y dos en parásitos recuperados de músculo esquelético. Con las secuencias de cada una de las bandas, se procedió a su identificación en las bases de datos públicas (*Genebank*). De las seis secuencias, una presentó una identidad de 100 % con la proteína Sec14/Tsol, que fue expresada diferencialmente en los cisticercos procedentes del sistema nervioso central. La expresión exagerada del gen que codifica a la proteína Sec14/Tsol, se confirmó por medio de RT PCR en tiempo real, aunque por inmunohistoquímica no se observó una mayor expresión de la proteína en los parásitos recuperados del sistema nervioso central.

Conclusión. La expresión diferencial de la proteína Sec14 Tsol puede ser regulada por el microambiente en el que se encuentre el parásito o por sus propios mecanismos de regulación de expresión génica.



Variabilidad genética de cisticercos de *Taenia solium* recuperados de pacientes con neurocisticercosis

H. Palafox-Fonseca¹, L. Texco¹, D. Piñero², G. Cárdenas³, M. Hernández¹, J. Proaño⁴, A. Fleury⁵, R. Bobes¹, E. Scitutto¹, G. González¹

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F., México

² Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México; México, D. F., México

³ Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México

⁴ Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco, Secretaría de Salud, México D.F., México

⁵ Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Dr. Manuel Velasco, Secretaría de Salud, México D.F., México

Introducción. La neurocisticercosis humana es una parasitosis causada por el estado larvario de *Taenia solium* cuando se aloja en el sistema nervioso central. La neurocisticercosis es una enfermedad heterogénea clínica y radiológicamente, ya que puede haber pacientes con cisticercos únicos o múltiples, localizados en el espacio subaracnoideo de la base del cráneo y en los ventrículos, y con inflamación nula, moderada o exacerbada. La heterogeneidad observada en la neurocisticercosis podría estar dada por factores del huésped, del parásito o de ambos. El presente trabajo pretende determinar si hay variaciones genéticas entre

cisticercos recuperados de diferentes individuos con neurocisticercosis y de diferentes localizaciones del sistema nervioso central, y si las variaciones se asocian con la heterogeneidad de la enfermedad en los pacientes.

Materiales y métodos. Se recolectaron cisticercos de 13 pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis. Se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Se practicaron PCR y secuenciación de los productos de PCR con los marcadores moleculares mitocondriales *cyt b* y *cox 1*. Se ensamblaron y alinearon las secuencias con el *software* Clustalx y se crearon fenogramas con el *software* Mega 4. Se hizo una relación entre las características clínicas de los pacientes y la variación genética de los parásitos.

Resultados. Se evaluó un total de 28 cisticercos de 13 pacientes para el marcador *cyt B* y 7 cisticercos de 5 pacientes para el marcador *cox 1*. Se encontró de variabilidad genética entre los parásitos de distintos pacientes, sin asociación con la localización de los cisticercos en el sistema nervioso central o del proceso inflamatorio que circunda al parásito.

Conclusión. Se detectó que sí hay variabilidad genética en los cisticercos recuperados de pacientes con neurocisticercosis, utilizando dos marcadores mitocondriales (*cox 1* y *cyt b*), variaciones que no se encontraron relacionadas con la localización en el sistema nervioso central y ni con el grado de inflamación a su alrededor.



Caracterización y expresión del gen para la glucoproteína P de *Fasciola hepatica* sensible y resistente a triclabendazol

Pamela Lamenza¹, Silvana Scarcella¹, José Tort², Marcela Larrosa³, Fermín Olaechea³, Hugo Solana¹

¹ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, Buenos Aires, Argentina

² Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

³ EEA Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Bariloche, Argentina

Introducción. La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por *Fasciola hepatica*. Su control se basa principalmente en el uso de triclabendazol. El uso intensivo de triclabendazol ha generado el desarrollo de trematodos resistentes. En *Haemonchus contortus* la resistencia a los benzimidazoles es causada por mutaciones en los genes de β -tubulina. En *F. hepatica* resistente

a triclabendazol no se han detectado dichos cambios, por lo cual la resistencia la obtendría de otras modificaciones genéticas o metabólicas. La glucoproteína P es una proteína de membrana con función de bomba extrusora y con amplia especificidad de sustrato, por lo cual la resistencia a triclabendazole podría ser modulada por dicha bomba.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la glucoproteína P y analizar su expresión en fasciolas sensibles y resistentes a triclabendazole.

Materiales y métodos. Se caracterizó el gen para glucoproteína P y la expresión del ARNm correspondiente, en cepas de *F. hepatica* sensibles y resistentes a triclabendazole. Para ello, se hizo un análisis de RT-PCR con posterior secuenciación y análisis de las secuencias mediante BLASTx.

Resultados. Las secuencias de glucoproteína P presentaron una identidad de 76 % para la cepa sensible a triclabendazol y un 72 % en el caso de la cepa resistente con respecto a la secuencia correspondiente a la glucoproteína P de *Schistosoma mansoni*. En ambos casos las secuencias presentan homología con una secuencia correspondiente a glucoproteína P de tipo 1, 2 y 3. Cuando se analizó el nivel de expresión del ARNm correspondiente, se detectaron diferencias no significativas entre ambas cepas.

Conclusiones. Se identificó el gen de glucoproteína P y su expresión en cepas de *F. hepatica* sensible y resistente a triclabendazol, sin detectarse diferencias significativas entre ambas cepas. Si bien no se observaron diferencias significativas en la expresión del ARNm correspondiente, no debería descartarse que la glucoproteína P esté involucrada en la expresión del fenómeno de la resistencia a triclabendazol.

• • •

Caracterización de proteasas en productos de excreción y secreción de la larva L₂ de *Toxocara canis*

Valeria Cruz-Aguilar^{1,3}, María de Lourdes Caballero-García¹, Tania Nieto-Lima^{1,2}, Daniel Pinilla-Pinilla¹, Benjamín Noguera-Torres², Eneida Jiménez-Cardoso¹

¹ Laboratorio de Investigación en Parasitología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México

² Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México

³ Universidad Simón Bolívar, México

• • •

Introducción. La toxocariasis humana es una zoonosis producida por la infección de un estado juvenil de segundo estadio perteneciente al género *Toxocara*. El parásito posee enzimas proteolíticas que participan activamente en sus funciones vitales y en las relaciones directas con el huésped, lo que ha permitido proponerlas como posibles blancos para el control de enfermedades parasitarias y su diagnóstico.

El objetivo del presente trabajo fue analizar la actividad proteolítica con diferentes pH e identificar el tipo de proteasa en productos de excreción-secreción de larvas de *Toxocara canis*.

Materiales y métodos. Las larvas L₂ de *T. canis* se cultivaron en medio líquido RPMI 1640 y se recolectaron los productos de excreción-secreción. Se practicó electroforesis SDS-PAGE al 12 % para analizar el peso molecular de las proteínas y se visualizaron con nitrato de plata. La actividad enzimática se determinó con electroforesis SDS-PAGE al 10 % copolimerizados con gelatina al 2 % con diferentes pH, y se usaron diferentes inhibidores para determinar el tipo de proteasas que poseen los productos de excreción-secreción del parásito.

Resultados. Los resultados presentaron que los productos de excreción-secreción de las larvas de *T. canis* cultivadas *in vitro* expresaron proteasas de pesos moleculares altos. Se encontró actividad proteolítica a partir de pH 5 hasta 9,6 y se encontró que el parásito expresa proteasas de tipo metaloproteasas.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron que el parásito tiene metaloproteasas, las cuales le sirven para degradar la matriz extracelular durante su migración, y su expresión fue evidente a pH 7. Estos resultados permiten sugerir una relación directa con las funciones del parásito durante su migración al infectar diferentes órganos en el humano, que pueden ser aprovechadas en métodos profilácticos o de diagnóstico de la enfermedad.