

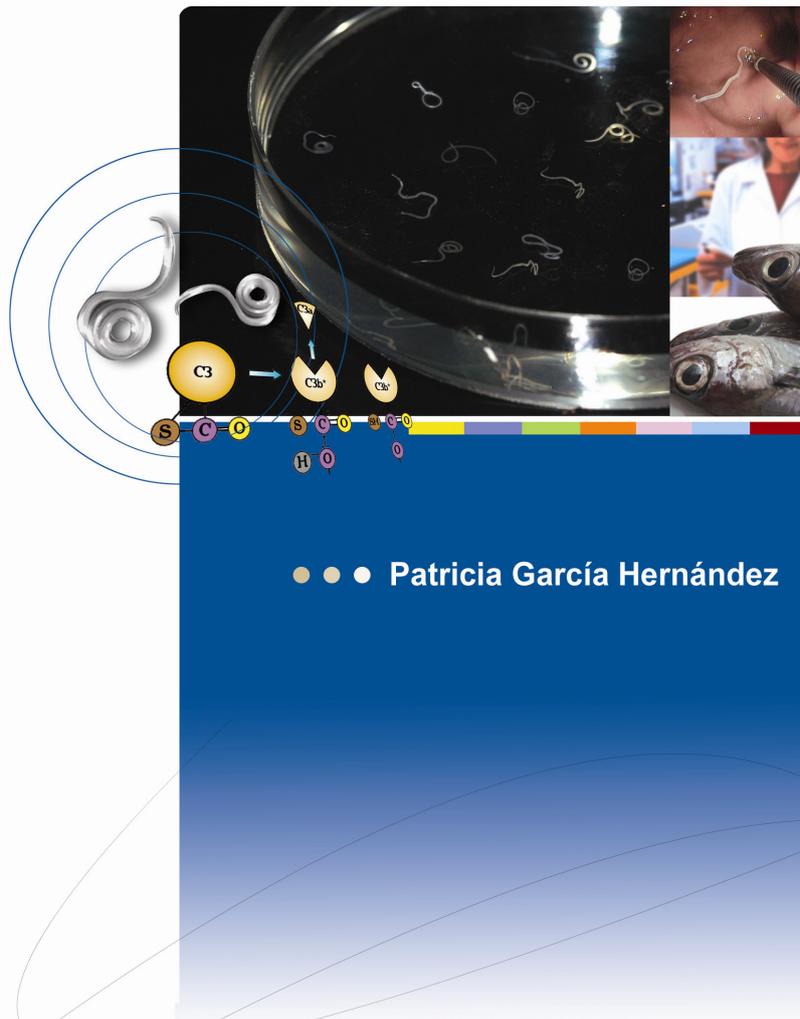
PREMIO: FAES FARMA

LEMA: *Anisakis*

***Anisakis simplex*: ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS LARVARIOS
SOBRE EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO**



***Anisakis simplex*: THE ACTIVITY OF LARVAL PRODUCTS ON THE
COMPLEMENT SYSTEM**



● ● ● Patricia García Hernández



RESUMEN

La anisakidosis es una enfermedad parasitaria causada por la ingestión accidental de larvas de nematodos pertenecientes a la familia *Anisakidae*. La infección se adquiere tras la ingestión de pescado parasitado crudo o poco cocinado (Sakanari & McKerrow, 1989).

Con el fin de estudiar el posible efecto de los productos larvarios de *Anisakis simplex* (extracto total y productos de excreción-secreción) sobre el sistema del complemento, como mecanismo para evadir la primera línea de defensa del hospedador, nos hemos planteado el análisis de los efectos de dichos productos larvarios, tanto por la vía alternativa como por la vía clásica. Tanto el extracto total como los productos de excreción-secreción de *A. simplex* presentaron una mayor actividad moduladora sobre la vía clásica que sobre la vía alternativa. Asimismo, los productos de excreción-secreción manifestaron una actividad mayor a la obtenida por el extracto total. Con el fin de comprobar si la actividad de los productos larvarios se producía mediante un proceso enzimático o mediante depleción de factores del complemento, se estudió la influencia de la temperatura y del tiempo de preincubación. Por otro lado, se estudió la influencia de concentraciones crecientes de cationes bivalentes (calcio y magnesio), para así, verificar un posible efecto quelante de dichos cationes, imprescindibles para la activación del complemento. Finalmente, se investigó una posible interacción de los productos larvarios con el componente C3 del complemento, ya que constituye un elemento fundamental del sistema.



SUMMARY

Anisakidosis is a human disease caused by the ingestion of larval nematodes from the family Anisakidae. The infection is acquired by eating raw seafood or undercooked fish and squid (Sakanari & McKerrow 1989).

The effects of the larval products (crude extract and excretory-secretory) of *Anisakis simplex* on the classical and alternative pathways of human complement system were investigated. This could constitute a mechanism to evade host defences, similarly than in other parasitic diseases. The larval products showed a stronger effect on the classical pathway than on the alternative pathway. The most pronounced modulating effects were found for the excretory-secretory products. In order to investigate the mechanism underlying the anticomplementary effect, the larval products were tested but now using different preincubation conditions. To verify a possible chelating effect, the influence of raising Ca^{2+} and Mg^{2+} concentrations on the inhibitory effects of the larval products was evaluated. In an attempt to refer the inhibitory potential on the lysis of the larval products to a specific mechanism of reaction of the whole complement system, we tested the effect of the larval products on an individual complement component, C3, via the classical and the alternative pathways.

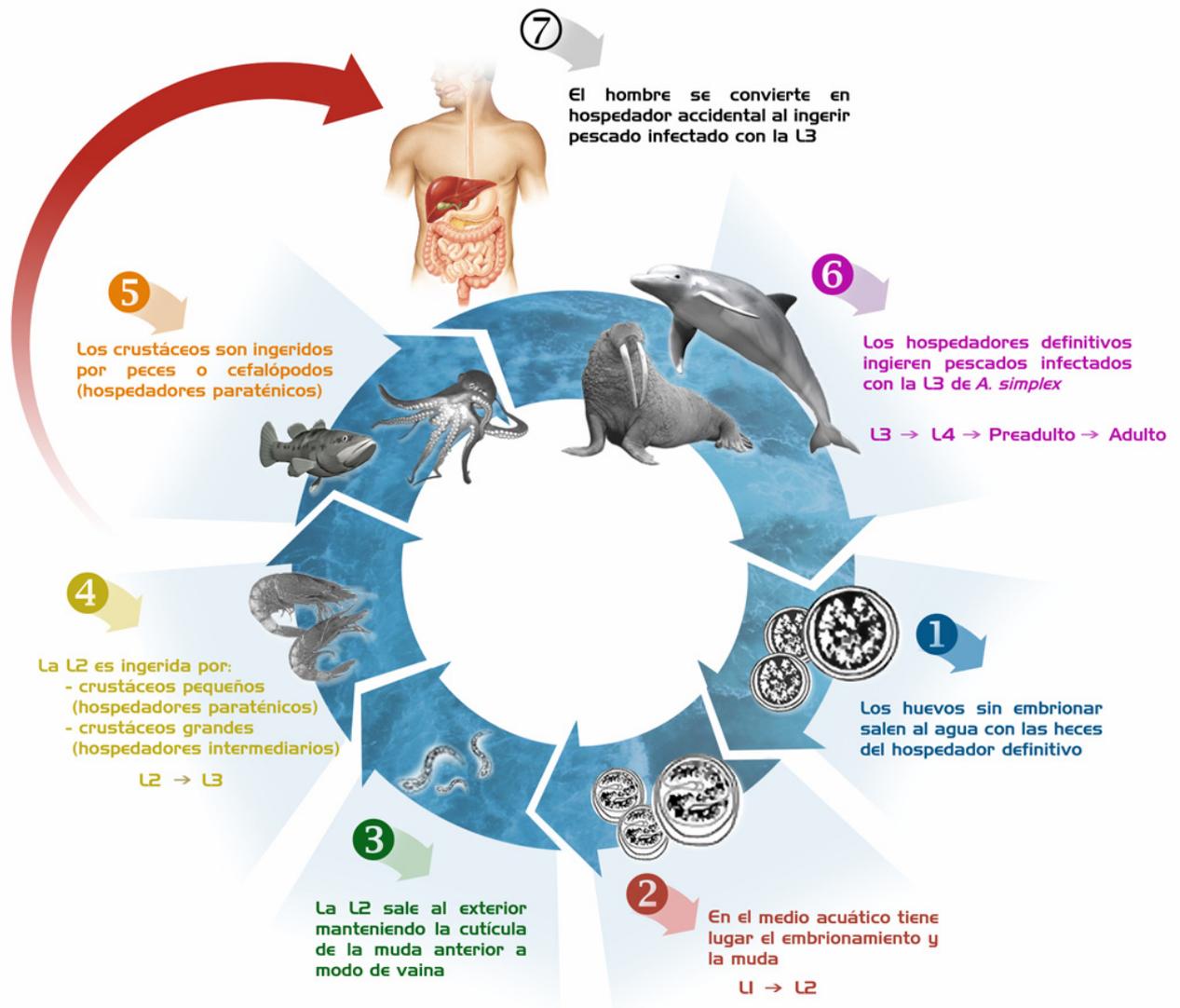


I. INTRODUCCIÓN

1. *Anisakis simplex*

Al igual que el resto de las especies del mismo género, *Anisakis simplex*, presenta un ciclo biológico indirecto en el que se encuentran estadios larvarios de vida libre, estadios larvarios parásitos, en hospedadores tanto paraténicos como intermediarios, y estadios larvarios y adultos, en hospedadores definitivos.

El hombre se convierte en hospedador accidental al ingerir pescado infectado por larvas de tercer estadio (L3). Estas larvas no se desarrollarán hasta adultos, aunque van a causar el cuadro clínico conocido como anisakiosis (Deardorff y col., 1982).





Por lo tanto, la infección se adquiere mediante la ingestión de pescado crudo o poco cocinado parasitado por la L3, que intentará atravesar la mucosa gastrointestinal, dando lugar a las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La invasión de las larvas a través de la mucosa, submucosa y musculatura del tracto gastrointestinal conlleva una serie de signos y síntomas que pueden variar en función de dónde se asiente la larva (Ishikura y col., 1993), aunque, en términos generales, se acompaña de dolor abdominal y epigástrico, náuseas, vómitos, ulceraciones, diarreas e, incluso, presencia de sangre en los jugos gástricos o en las heces (Smith y Wootten, 1978; Oshima y Kliks, 1987; Petithory y Marty, 1988; Ishikura y col., 1993). Antecedentes de ingesta de peces o cefalópodos crudos pueden inducir a la sospecha de la existencia de anisakidosis.

Según su localización, la anisakidosis se divide en gástrica, intestinal o ectópica (Ishikura y col., 1993). Sin embargo, debido a la gran variedad de manifestaciones gastrointestinales que produce dicha enfermedad, la mayor parte de las veces es mal diagnosticada. Asimismo, se debería citar la anisakidosis alérgica como otra variante de esta parasitosis. En este caso los síntomas agudos están causados por una reacción alérgica de tipo I en la pared gastrointestinal (Suzuki y col., 1970; 1975).

Por otra parte, Sakanari y McKerrow confirmaron en 1990, mediante microscopía electrónica, que las larvas de *Anisakis* invaden la mucosa y submucosa gastrointestinal mediante la formación de túneles y zanjas en los tejidos. Estos autores afirmaron que los productos larvarios de excreción-secreción (ES), entre los que se encuentran una serín proteasa con actividad similar a la tripsina de los mamíferos y una metaloproteasa (aminopeptidasa), degradan *in vivo* macromoléculas similares a las que se encuentran en la mucosa y submucosa del estómago e intestino. Asimismo, comprobaron que las serín proteasas son capaces de degradar la mayor parte de los tejidos gastrointestinales, al degradar componentes tales como proteínas y colágeno, siendo incapaces de degradar otras sustancias como la elastina (que no es un componente mayoritario de los tejidos gastrointestinales).

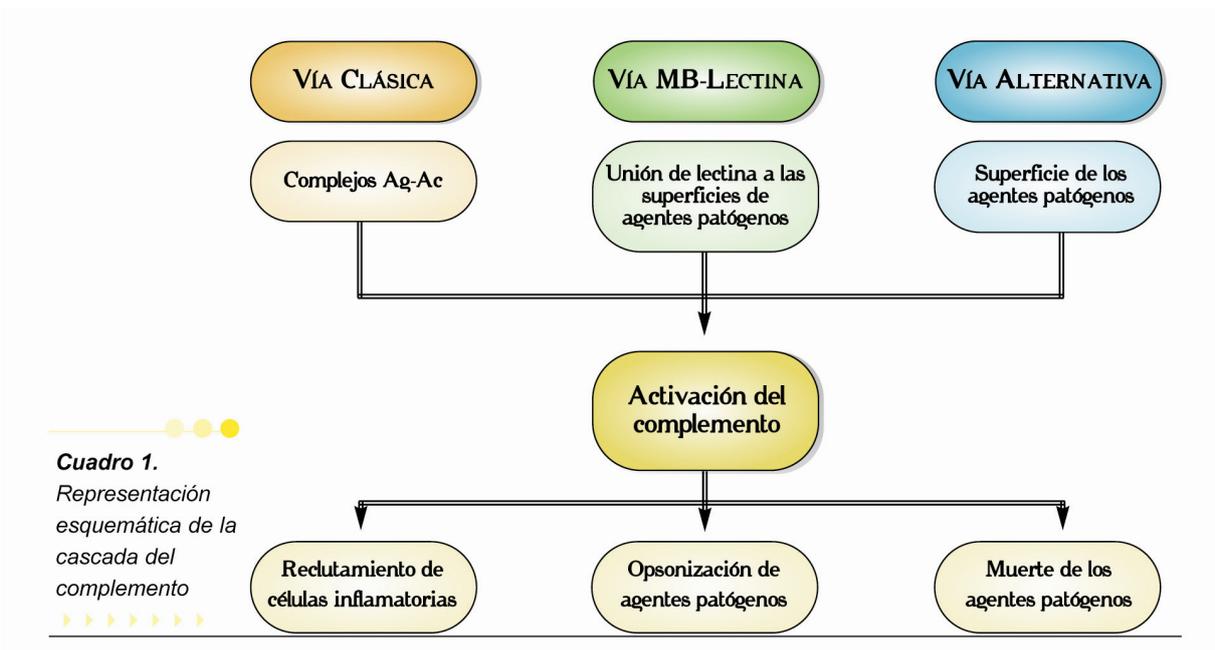
2. SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Se define como complemento un sistema funcional de más de 30 proteínas, que constituyen el 15% del peso de la fracción globulínica del suero, y que se activan de modo secuencial, interaccionando entre sí de modo regulado formando una cascada enzimática, permitiendo una amplificación de la respuesta humoral. Muchos de los componentes del complemento son proenzimas (zimógenos) que se activan cuando son escindidas, y en las que

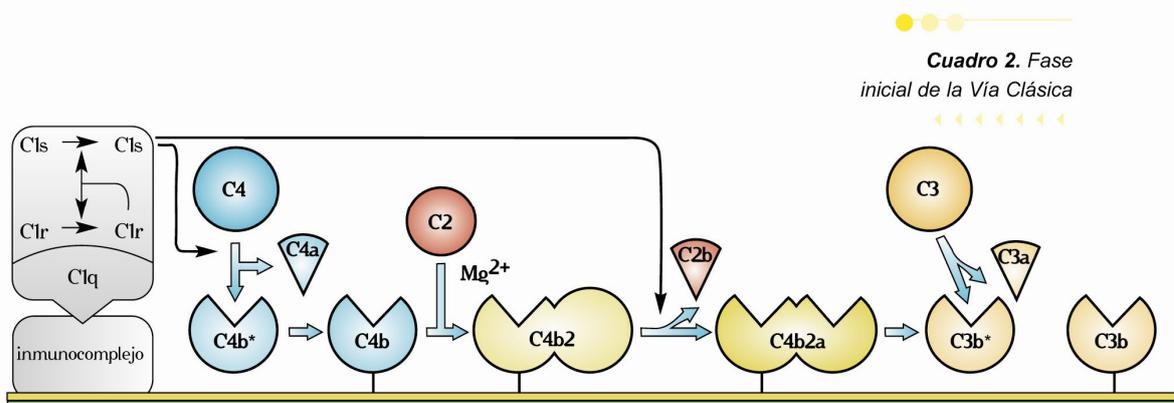


el centro activo está enmascarado, requiriendo su rotura proteolítica para convertirse en enzimas activas. Cada una de las proteínas del complemento además de influir en que la reacción consecutiva prosiga, puede tener a su vez, diferentes acciones biológicas importantes en la defensa del organismo frente a agentes patógenos.

Las funciones efectoras del complemento pueden activarse por tres vías. Hasta hace muy poco se hablaba de dos rutas de activación del complemento, la clásica y la alternativa, pero, recientemente, se ha descubierto una tercera vía, denominada vía de lectina de unión a manano (vía MB-Lectina).

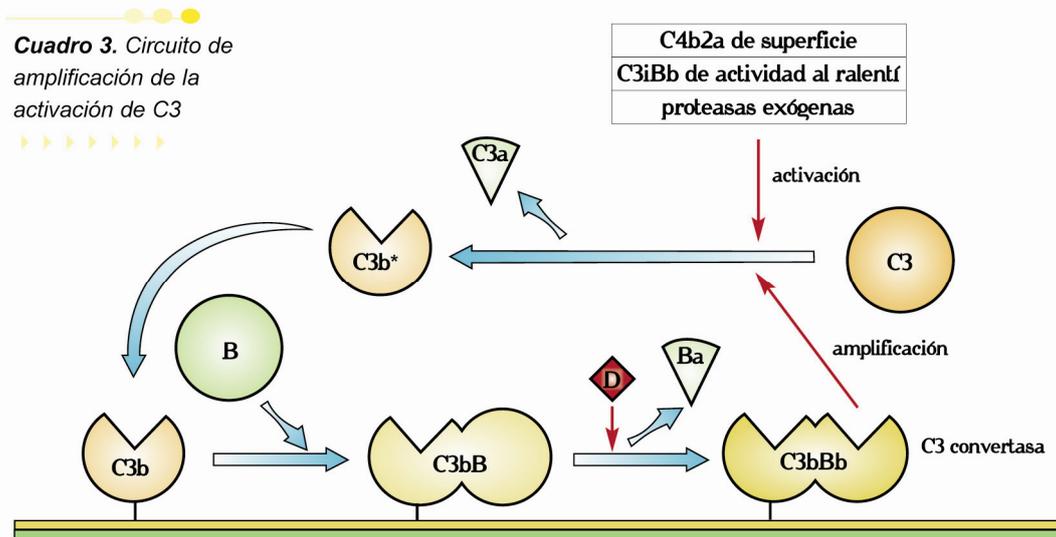


• La **vía clásica** conecta con la respuesta inmune adaptativa por medio de su interacción con inmunocomplejos (se activa por la unión del anticuerpo al antígeno).





- La **vía alternativa** conecta con la respuesta de inmunidad natural o inespecífica, pudiéndose iniciar cuando un componente del complemento, espontáneamente activado, se une directamente a la superficie de un agente patógeno. Esta vía proporciona un bucle de amplificación de la vía clásica de activación del complemento, ya que, uno de los componentes activados de la vía clásica, también es capaz de iniciar la vía alternativa.



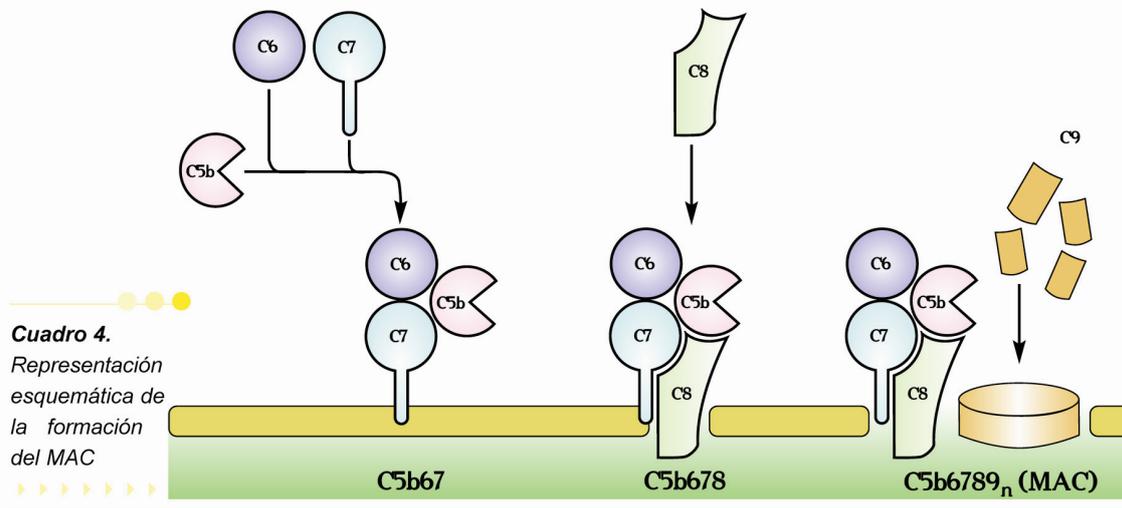
- La **vía MB-Lectina** es una especie de variante de la ruta clásica, pero que se inicia sin necesidad de anticuerpos, y por lo tanto, pertenece a la inmunidad innata. Se inicia por la unión de una lectina del suero, la lectina de unión a manano, a carbohidratos presentes en las superficies de agentes patógenos.

Por tanto, el complemento parece ser una parte importante de la inmunidad humoral innata que ha sido controlada por la respuesta humoral adaptativa. Todo ello convierte al sistema del complemento en un mecanismo de defensa eficaz y efectivo.

Los procesos de la cascada del complemento pueden dividirse en dos secuencias de reacciones, tempranas y tardías. Los procesos tempranos consisten en una serie de pasos proteolíticos en los que una proteína precursora inactiva se escinde en dos, un fragmento de mayor tamaño, que tiende a depositarse sobre las superficies de agentes patógenos (o sobre las superficies de las células vecinas) y que contribuye al siguiente paso de rotura proteolítica, y un péptido pequeño que se libera de la célula, pasando a la fase fluida y que, frecuentemente, media en respuestas inflamatorias. Los procesos tempranos de cada vía finalizan con la producción de una proteasa denominada C3 convertasa, llamada así porque es específica para la rotura proteolítica del componente C3 del complemento, que se une covalentemente a la superficie del agente patógeno.



Los procesos tardíos comprenden el ensamblaje de los componentes finales, y la consiguiente formación del complejo citocida de ataque a la membrana (MAC, del inglés *membrane attack complex*). El resultado final es la formación de un poro en la bicapa lipídica de la membrana, que destruye su integridad.



Los componentes clave activados del complemento están sujetos a una fuerte regulación, y así son rápidamente inactivados a menos que se unan a la superficie del agente patógeno sobre el que se ha iniciado su activación. También existen algunos puntos en los que actúan proteínas reguladoras sobre componentes del complemento, para evitar que su activación inadvertida sobre células del huésped pudiera dañarlas accidentalmente.

Las consecuencias de la activación y fijación del complemento incluyen:

- Destrucción lítica directa del microorganismo o célula diana.
- Oponización de agentes patógenos, con la consiguiente mejora de la fagocitosis y destrucción de los mismos.
- Atracción quimiotáctica de leucocitos hacia las zonas de inflamación y activación de los mismos, incremento de la quimiotaxis sobre los fagocitos, y función anafilotoxina en el control de la respuesta inflamatoria.
- Amplificación de la respuesta humoral específica, facilitando la localización de los antígenos por parte, tanto de los linfocitos B como de las células presentadoras de antígenos (CPA), y reduciendo el umbral de sensibilidad para la activación de los linfocitos B.
- Solubilización y aclaramiento de inmunocomplejos.



3. SISTEMA DEL COMPLEMENTO Y PARÁSITOS

El sistema del complemento representa una parte importante del sistema innato de defensa frente a los agentes patógenos, con una capacidad rudimentaria para discriminar entre lo propio y lo no propio. Por lo tanto, este mecanismo de primera línea de defensa juega un papel crucial frente a virus, bacterias, hongos y parásitos (Joiner, 1988).

Todos los microorganismos, especialmente aquellos que entran en contacto con la sangre, deben evitar, de una u otra forma, el efecto destructivo del sistema inmunológico del hospedador, para lo cual han desarrollado una variedad de estrategias durante la evolución que les permite su supervivencia en un medio hostil. Por lo tanto, el éxito de los microorganismos como parásitos humanos, proviene de su habilidad para evadir el reconocimiento y/o evitar la destrucción por los mecanismos de defensa del hospedador, tanto naturales como adquiridos, entre los que se encuentran citoquinas, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas y el sistema del complemento (McLaren, 1984).

Entre las estrategias empleadas por los patógenos se encuentran la eliminación, inhibición o utilización del complemento en su propio beneficio, para, de este modo, resistir a la fagocitosis o al daño causado por la actividad lítica mediada por el complemento. Algunos de estos procedimientos se basan en imitar, funcional, estructural o antigénicamente, a las proteínas del sistema del complemento del hospedador, incluyendo secuencias homólogas parciales con dichas proteínas. Estas estrategias incluyen dos categorías principales y cuatro subcategorías, siguiendo parte de la terminología propuesta en años anteriores por diferentes autores (Joiner, 1988; Cooper, 1991; Fishelson, 1994; Jokiranta y col., 1995; Kotwal, 1996).

3.1. TÁCTICAS PARA EVITAR EL RECONOCIMIENTO

3.1.1. Enmascaramiento

Las cepas más patógenas de microorganismos son, generalmente, aquellas que sufren una pobre o nula activación del complemento sobre sus superficies, imitando, de esta forma, a las células del hospedador. Estas moléculas suelen ser ácidos siálicos de bacterias encapsuladas (Joiner, 1988) o de parásitos (Kipnis y col., 1981; Joiner, 1988), así como glicoproteínas de superficie (Ferrante y Allison, 1983) y lipofosfoglicanos (Puentes y col., 1988) de parásitos. De este modo actúa *Schistosoma mansoni*, ya que modifica los ácidos siálicos de su superficie para, posteriormente, desprenderse del glicocálix, el cual constituye su principal inmunógeno



y el más potente activador de la vía alternativa, con el fin de evadir su reconocimiento (Marikovsky y col., 1990).

3.2. TÁCTICAS PARA EVITAR LA ELIMINACIÓN

3.2.1. Eliminación del complemento

Una vez desencadenada la activación del sistema del complemento del hospedador, el parásito tiene que utilizar otros mecanismos para evitar su eliminación. Uno de ellos consiste en desprenderse de la unión de los complejos del complemento, en particular de los formados en la fase lítica, donde tiene lugar la formación del MAC. Valiéndose de estas estrategias, *Fasciola hepatica* es capaz de promover la eliminación de los inmunocomplejos iniciales y del componente C1 de su superficie celular (Duffus y Franks, 1980). Por otro lado, tanto *Leishmania major* (Puentes y col., 1990) como *Naegleria fowleri* (Toney y Marciano-Cabral, 1994) desprenden de sus superficies los complejos C5b-9 formados.

Otra táctica de enmascaramiento se basa en provocar un consumo de componentes del complemento en lugares alejados de la diana del microorganismo. De este modo actúa *Taenia solium* que es capaz, a través de polisacáridos sulfatados, de activar el complemento en zonas alejadas de su superficie (White y col., 1992).

Otros mecanismos consisten en la degradación proteolítica y la fosforilación de componentes del complemento, así como en la inactivación de las anafilotoxinas originadas durante la activación de este sistema. Estos tres mecanismos son probablemente formas más seguras para conferir protección frente a la atracción quimiotáctica, la opsonización y la lisis.

El primero de ellos, la degradación proteolítica, lo lleva a cabo *Paragonimus wetermani*, que a través de una cisteín proteasa ácida de 27 kDa degrada al componente C3 (Yamakami y col., 1995). Un ejemplo del segundo mecanismo lo presenta *Leishmania* spp., que a través de diversas proteínas quininas de su membrana plasmática, fosforila los componentes C3, C5 y C9 (Hermoso y col., 1991). Por último, la inactivación de las anafilotoxinas C3a y C5a es llevada a cabo por *Entamoeba histolytica* (Reed y col., 1995) gracias a una cisteín proteasa extracelular de 56 kDa, que actúa provocando la proteólisis de estos factores proinflamatorios, a pesar de que activa el complemento por la vía alternativa al degradar C3.



3.2.2. Inhibición del complemento

Los patógenos utilizan una amplia variedad de mecanismos para inhibir el complemento. Probablemente, el procedimiento más efectivo es aquel que consiste en obstaculizar estéricamente el acceso del complemento, tanto en las fases iniciales de su activación, como en los procesos terminales de ataque a la membrana. *L. major* logra esto gracias a un lipofosfoglicano de superficie de gran tamaño, que es el principal aceptor de C3 (Puentes y col., 1988), y a través del cual es capaz de activar el complemento, evitando posteriormente la lisis gracias a la capa que recubre a este parásito. En el caso de *S. mansoni* la inhibición del complemento es a través de la doble membrana (McLaren y Hockley, 1977), y en los promastigotes de *Leishmania amazonensis* y los amastigotes de *Trypanosoma cruzi* se consigue gracias a constituyentes externos de la membrana (Iida y col., 1989; Nunes y col., 1997).

Otras estrategias incluyen la exposición de moléculas de unión a C1, no necesariamente proteínas, las cuales interfieren directamente con la activación de la vía clásica. La paramiosina de muchos helmintos, entre ellos *S. mansoni* y *T. solium*, bloquea la función de C1q, uniéndose a sus tallos de tipo colágeno, pero no a las cabezas globulares, e inhibiendo directamente el inicio de la vía clásica (Laclette y col., 1992; White y col., 1992).

Durante muchos miles de años de co-evolución junto con sus hospedadores obligatorios, muchos patógenos han desarrollado propiedades funcionales idénticas a aquellas usadas por las células del huésped, con el fin de evitar su destrucción por el complemento (evolución convergente). Así, han sido identificadas un amplio número de proteínas pertenecientes a los patógenos que comparten similitudes funcionales o estructurales con proteínas o receptores del complemento. En otros patógenos, el fenómeno de imitación molecular puede representar la conservación de motivos ancestrales de reconocimiento molecular. En este sentido, *T. cruzi* utiliza una proteína semejante a C9 para escapar de las vacuolas ácidas y pasar al citosol para continuar la infección en el hospedador (Andrews y col., 1990). Otro modelo lo muestra *Onchocerca volvulus*, cuyo antígeno RAL-1 presenta una secuencia homóloga con el receptor de C1q, por lo cual se podría unir a éste inhibiendo la acción del complemento (Malhotra y col., 1993).

3.2.3. Utilización del complemento

Los patógenos no sólo utilizan el complemento para invadir las células, sino que también lo hacen para su propia defensa; así la adsorción de proteínas reguladoras del huésped en fase



fluida, como el factor H, constituye una estrategia para inhibir la vía alternativa de activación del complemento. Además, los patógenos intracelulares pueden controlar la maquinaria celular para su propio beneficio, induciendo, por ejemplo, la expresión de proteínas reguladoras del complemento sobre la superficie de las células infectadas, y previniendo su destrucción por el sistema inmune del hospedador.

Rimoldi y col. en 1989 demostraron que la internalización de los tripomastigotes de *T. cruzi* en las células fagocíticas se mejoraba en presencia del componente C1q, el cual se unía al parásito, y actuaba como una opsonina. Así, indicaron la posibilidad de que *T. cruzi* pudiera utilizar el receptor de C1q como mecanismo de entrada en las células del huésped, basándose en el hecho de que la interacción de un ligando con su receptor favorece la internalización del mismo.

Un mecanismo parecido emplean *Babesia rodhaini* (Cooper, 1991), los merozoitos de *Plasmodium* spp. (Cooper, 1991) y los promastigotes de *L. major* (Da Silva y col., 1989), al aprovecharse del depósito de fragmentos de C3 para penetrar en el interior de las células a través de receptor para el complemento tipo 1 (CR1).

Otros tres parásitos son capaces de inducir la activación del complemento mediante la degradación del componente C3, facilitando su entrada en las células. *E. histolytica* lo consigue gracias a una cisteín proteasa de 56 kDa (Reed y col., 1989). Por otro lado, los promastigotes de *Leishmania mexicana* y *Leishmania donovani*, a través de la glicoproteína de superficie gp63, son capaces de degradar el componente C3 para inducir la activación del complemento y, así, ser endocitados por los macrófagos (Chaudhuri y Chang, 1988; Puentes y col. 1989).

Otra posible estrategia que emplean los parásitos en beneficio propio, la constituye el mimetismo molecular de los componentes del complemento. Dicha imitación permite a los patógenos evitar su destrucción, bien directamente, inhibiendo el complemento o empleando el mismo para su entrada en las células hospedadoras, o indirectamente, mediante la adquisición de un inhibidor por imitación de su ligando. De este modo actúan *L. major* y *L. donovani*, ya que su antígeno de superficie gp63 presenta similitud funcional con iC3b y reactividad cruzada con C3, con lo cual se facilita su unión a los receptores CR3 y CR4 (Russell y Talamas-Rohana, 1989).

Por otro lado, la resistencia a la destrucción por el complemento se correlaciona en muchos casos con la virulencia de una especie patógena. Esto queda evidenciado claramente en el caso de *Leishmania tropica*, fácilmente destruida por el complemento y que muestra una infección localizada en piel, mientras que, por el contrario, *L. donovani* es 10 veces más



resistente a la acción del complemento y presenta una infección diseminada a través de las vísceras causando enfermedad a menudo fatal.

El análisis de las estrategias conocidas y la elucidación de las aún desconocidas ayudará, probablemente, al desarrollo de nuevas fórmulas terapéuticas y preventivas para controlar las diversas enfermedades parasitarias.

II. OBJETIVOS

Con el fin de estudiar el posible efecto de los productos larvarios de *Anisakis simplex* sobre el sistema del complemento, como posible mecanismo para evadir la primera línea de defensa del hospedador, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- ❶ Estudio de los efectos de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la actividad del sistema del complemento por la vía alternativa.
- ❷ Estudio de los efectos de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la actividad del sistema del complemento por la vía clásica.
- ❸ Influencia de la temperatura en la actividad de los productos larvarios de *A. simplex* sobre el sistema del complemento.
- ❹ Estudio de la posible quelación de calcio y magnesio por los productos larvarios de *A. simplex*.
- ❺ Efecto sobre el componente C3.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. LARVAS DE TERCER ESTADIO DE *Anisakis simplex*

Las larvas de tercer estadio (L3) de *Anisakis simplex* fueron extraídas manualmente a partir de músculo y vísceras de bacaladillas (*Micromesistius poutassou*) frescas destinadas al consumo humano. Para su obtención, se practicó un corte longitudinal en la parte ventral de las bacaladillas, dejando al descubierto los órganos internos. Con la ayuda de pinzas y agujas enmangadas se extrajeron las larvas, una a una, y se depositaron en placas de Petri con agua corriente. Una vez extraídas y liberadas de sus cápsulas, se lavaron repetidamente con agua



hasta que no quedaron residuos de pescado ni de cápsulas. Tras su identificación al microscopio como tales, se conservaron a 4°C o a -20°C hasta el momento de su utilización, dependiendo de los usos para los que fueran destinadas.

A partir de las larvas se obtuvieron los productos de excreción-secreción (ES) y los extractos larvarios totales necesarios para la realización de los ensayos.

2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado conejos de laboratorio pertenecientes a la raza Nueva Zelanda, siendo alojados en jaulas, y alimentándose a base de piensos y agua a través de biberones.

3. SUEROS HUMANOS

Las muestras de suero empleadas han sido obtenidas a partir de voluntarios sanos, no sometidos a ningún tipo de tratamiento, mediante punción venosa realizada en la Escuela de Especialización Profesional de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. El lugar de elección para realizar la venopunción fue la región venosa antecubital, debido a que, a este nivel, existe una piel fina y móvil y las venas son de grueso calibre y, relativamente, superficiales. La punción se realizó con aguja estéril y desechable, limpiando, previamente, la zona elegida con alcohol de 70°. La sangre se aspiró mediante el émbolo de una jeringa de tamaño variable. Para facilitar la punción venosa, se aplicó en el antebrazo un compresor, retirándose después de introducida la aguja en la vena para evitar una hemoconcentración.

Las muestras de sangre se mantuvieron 30 minutos a temperatura ambiente para facilitar su coagulación y, a continuación, se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos, procediéndose después a la extracción del suero.

Asimismo, se utilizaron sueros deficientes en el componente C3 del sistema del complemento, siendo estos suministrados por *Sigma*®.

4. ERITROCITOS DE CONEJO

Los eritrocitos de conejo se obtuvieron de conejos sanos y no sometidos a ningún tipo de tratamiento, tomándoles la sangre de la vena marginal de la oreja, recogida sobre el mismo volumen de solución de Alsever, y llevando a cabo lavados de los mismos, posteriormente.



5. ERITROCITOS DE CARNERO

Se utilizaron eritrocitos de carneros sanos, no sometidos a ningún tipo de tratamiento y suministrados por *bioMérieux*.

6. SOLUCIONES Y REACTIVOS

- **Stock VSB (cloruro sódico 0,71 M; barbital sódico 24,74 mM; pH 7,35)**

Cloruro sódico (NaCl)	20,75 g
Barbital sódico (C ₈ H ₁₁ N ₂ NaO ₃)	2,55 g
H ₂ O destilada	400 ml
Ajustar el pH a 7,35 y el volumen a 500 ml con agua destilada	

- **Stock EGTA solution (EGTA 0,2 M; sulfato magnésico heptahidratado 0,12 M; pH 7,35)**

EGTA (C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀)	3,8 g	} a
H ₂ O destilada	22,5 ml	
Ajustar el pH a 7,35 con lentejas de NaOH		
Sulfato magnésico heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1,537 g	} b
H ₂ O destilada	22,5 ml	

Mezclar a + b y ajustar el volumen a 50 ml con agua destilada

- **EGTA-VB (cloruro sódico 0,71 M; barbital sódico 24,74 mM; EGTA 0,2 M; sulfato magnésico heptahidratado 0,12 M; pH 7,35)**

Stock VSB	200 ml
Stock EGTA solution	40 ml
Ajustar el pH a 7,35 y el volumen a 1 l con agua destilada	

- **Stock Ca/Mg solution (cloruro magnésico hexahidratado 0,5 M; cloruro cálcico dihidratado 0,15 M)**

Cloruro magnésico hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	5,08 g
Cloruro cálcico dihidratado (CaCl ₂ .2H ₂ O)	1,10 g
H ₂ O destilada c.s.p.	50 ml

- **VSB⁺⁺ (cloruro sódico 0,71 M; barbital sódico 24,74 mM; cloruro magnésico hexahidratado 0,5 M; cloruro cálcico dihidratado 0,15 M; pH 7,35)**

Stock VSB	100 ml
Stock Ca/Mg solution	500 ml



H₂O destilada c.s.p.500 ml

Ajustar el pH a 7,35

- **Alsever's solution (glucosa 0,11 M; cloruro sódico 0,072 M; ácido cítrico monohidratado 2,62 mM; citrato sódico dihidratado 27,2 mM; pH 6-6,2)**

Glucosa (C₆H₁₂O₆)2,05 g

Cloruro sódico (NaCl)0,42 g

Ácido cítrico monohidratado (C₆H₈O₇.H₂O)0,055 g

Citrato sódico dihidratado (Na₃C₆H₅O₇.2H₂O)0,8 g

H₂O destilada c.s.p.100 ml

Ajustar el pH a 6-6,2

- **Solución salina (cloruro sódico 0,15 M)**

Cloruro sódico (NaCl)9 g

H₂O destilada c.s.p.1 l

- **Medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Earle (L-glutamina 2mM; bicarbonato sódico 26,2 mM; gentamicina; pH 5,0)**

Medio Mínimo Esencial de Eagle con Sales de Earle9,6 g

L-glutamina (C₅H₁₀N₂O₃)0,292 g

Bicarbonato sódico (NaHCO₃)2,2 g

Gentamicina0,05 g

Ajustar el pH a 5,0 y el volumen a 1 l con agua destilada

- **PBS (fosfato monosódico dihidratado 2,56 mM; fosfato disódico dodecahidratado 7,34 mM; cloruro sódico 0,15 M; pH 7,2-7,4)**

Fosfato monosódico dihidratado (NaH₂PO₄.2H₂O)0,40 g

Fosfato disódico dodecahidratado (Na₂HPO₄.12H₂O)2,63 g

Cloruro sódico (NaCl)8,5 g

H₂O destilada c.s.p.1 l

Ajustar el pH a 7,2-7,4

7. EXTRACTO LARVARIO TOTAL DE *Anisakis simplex*

Para la preparación del extracto larvario total, las L3 de *A. simplex* se lavaron varias veces con agua destilada estéril y se fragmentaron mediante homogeneización manual en mortero hasta obtener una "pasta". A continuación esta pasta se sonicó al 70% de potencia mediante 6



pulsos de 10 segundos cada uno, con un sonicador *Virsonic 5 (Virtis)*, manteniendo el producto en baño de hielo durante toda la duración del proceso.

Tras dejar al homogeneizado extrayéndose toda la noche en PBS a 4°C, se dispersó la pasta en 7 volúmenes de PBS y se delipidó con 3 volúmenes de n-hexano, mediante agitación enérgica y decantación de la fase superior.

La fase acuosa se centrifugó a 11.400 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C (*Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech*), recogiendo el sobrenadante como extracto crudo o total. Dicho sobrenadante se dializó (membranas de diálisis *Dialysis Tubing-Visking 24-32'' – 19.0 nm: 30M, Medicell Internacional Ltd.*) frente a PBS durante 24 horas y su contenido proteico fue valorado mediante el método de Bradford (1976). El extracto se congeló a -20°C hasta su posterior utilización.

8. PRODUCTOS DE EXCRECIÓN-SECRECIÓN DE *Anisakis simplex*

Para obtener los productos de ES, se aislaron L3 de *A. simplex* vivas y se lavaron repetidas veces con agua destilada estéril hasta que no quedaron restos de pescado ni de cápsulas, todo ello en el interior de una campana de flujo laminar.

A continuación, manteniendo las condiciones de esterilidad, 50 larvas, aproximadamente, se sembraron en tubos de 30 ml con 20 ml de Medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Earle (*Sigma®*) y se incubaron a 28°C, realizando cambios semanales del medio, aspirándolo asépticamente y reemplazándolo por un volumen igual de medio estéril.

El medio obtenido se dializó (membranas de diálisis *Dialysis Tubing-Visking 24-32'' – 19.0 nm: 30M, Medicell Internacional Ltd.*) frente a PBS durante 48 horas a 4°C, realizando un cambio de PBS a las 24 horas. Tras concentrar el antígeno mediante una célula de concentración bajo presión positiva (célula de concentración *Amicon*), provista de su correspondiente membrana de concentración (membranas para concentrar *YM-10, Amicon*) y valorar la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (1976), los productos de ES se conservaron congelados a -20°C hasta su posterior utilización.

9. VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

Se preparó una curva patrón de albúmina sérica bovina (BSA) en PBS, a partir de una concentración de 1 mg/ml, mediante diluciones de la misma.



Se añadieron 200 μ l de reactivo de Bradford (*Bio-Rad protein assay, Cat.No. 500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH*) por cada 800 μ l de muestra (diluciones patrones, diluciones problema y blanco) y se dejó reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se realizaron las lecturas de las absorbancias de las muestras en el espectrofotómetro a 595 nm (*Pharmacia LKB-Ultrospec III, Pharmacia*).

Finalmente, tras realizar la curva patrón de concentraciones/absorbancia con los datos obtenidos para las diluciones de BSA, se extrapolaron en la misma curva los valores obtenidos para las diluciones problema, determinando de esta manera la concentración de proteínas.

10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO POR LA VÍA CLÁSICA

Para la realización de estos ensayos se siguió la técnica descrita previamente por Klerx y col. (1983).

10.1. PREPARACIÓN DE LOS ERITROCITOS DE CARNERO

Los eritrocitos de carnero se diluyeron en solución salina en proporción 1:4 y se centrifugaron durante 5 minutos a 2.500 r.p.m. (*Centrifuge 5403, Eppendorf*). Después de eliminar el sobrenadante, se resuspendió el sedimento en 5 ml de solución salina y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriormente señaladas. El lavado del sedimento se realizó una vez más, tras lo cual se mantuvieron los eritrocitos en hielo.

A continuación, se resuspendió una alícuota de 200 μ l de sedimento en 9,8 ml de tampón VSB⁺⁺, ajustándose la concentración de eritrocitos de esta suspensión a 4×10^8 células/ml. Para calcular el volumen de tampón VSB⁺⁺ a adicionar, se tomó una alícuota de 100 μ l de esta suspensión y se hemolizó con 4,9 ml de agua destilada, midiendo a continuación su absorbancia a 410 nm en un espectrofotómetro (*Pharmacia LKB-Ultrospec III, Pharmacia*). Una DO₄₁₀ de 0,522 corresponde a una suspensión de eritrocitos de 4×10^8 células/ml. Por tanto, el volumen adicional del tampón VSB⁺⁺ que se añadió a la suspensión de eritrocitos se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Volumen adicional de VSB}^{++} = (\text{Vol. Inicial} - 100 \mu\text{l}) \times \frac{\text{Absorbancia} - 0,522}{0,522}$$



Tras adicionar el volumen necesario de VSB⁺⁺, se mantuvo la suspensión de eritrocitos en hielo.

10.2. SENSIBILIZACIÓN DE LOS ERITROCITOS

Una vez obtenida la concentración adecuada de eritrocitos, se procedió a su sensibilización con anticuerpos anti-eritrocitos de carnero (*Hemolisina; Sigma; Product No. S1389*). Para ello se incubó una alícuota de 7,5 ml de esta suspensión de eritrocitos con el mismo volumen de una dilución del anticuerpo (1:800) en tampón VSB⁺⁺, durante 10-15 minutos a 28°C.

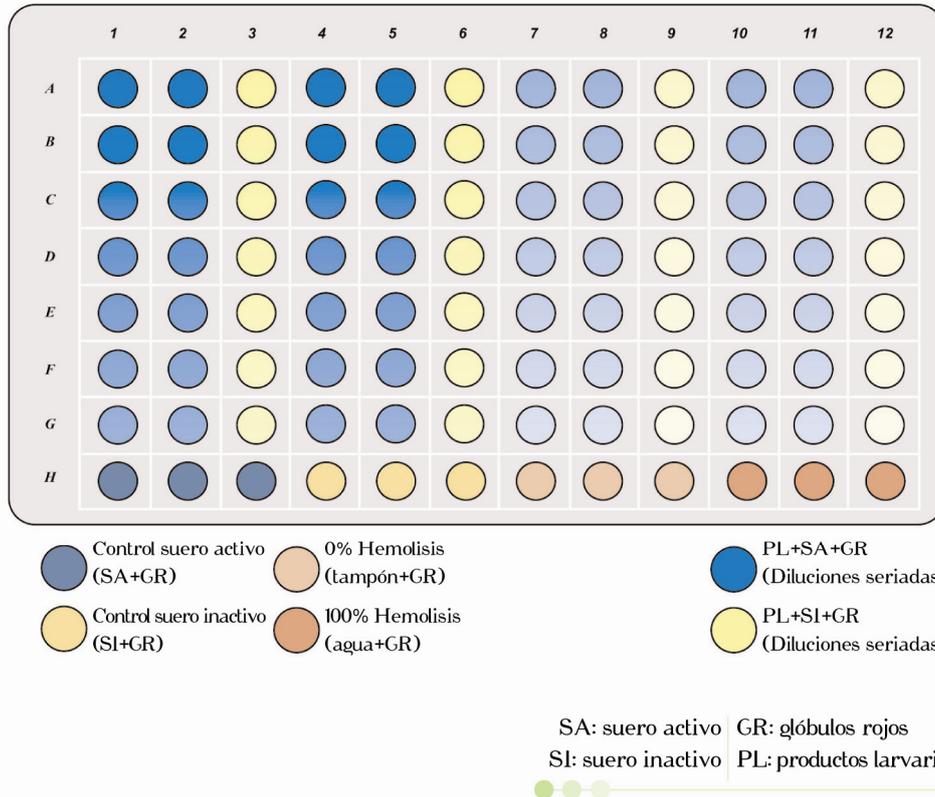
Tras dicha incubación, se centrifugó 5 minutos a 2.500 r.p.m. y se resuspendieron los eritrocitos sensibilizados en 15 ml de tampón VSB⁺⁺, obteniéndose una concentración final de 2×10^8 células/ml.

10.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Cada concentración de los productos larvarios problema (50 µl/pocillo) se ensayó por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo cónico (*Nunc Plate Cod. 442587, InterMed Nunc*). Para realizar diluciones seriadas se partió de 100 µl de muestra y se traspasaron 50 µl de éstos a los pocillos siguientes, a los que previamente se había adicionado 50 µl de tampón VSB⁺⁺.

A dos de los tres pocillos de cada concentración se añadieron 50 µl de una dilución de suero humano fresco (120 µl de suero activo + 10 ml de tampón VSB⁺⁺), mientras que al tercer pocillo (pocillo control) se le añadió el mismo volumen de una dilución (63 µl de suero inactivo + 5 ml de tampón VSB⁺⁺) de suero inactivado previamente (56°C durante 30 minutos).

En cada placa se establecieron, por triplicado, pocillos control de hemólisis en el suero activo (tampón VSB⁺⁺ con suero activo en proporción 1:1), pocillos control de hemólisis en el suero inactivado (tampón VSB⁺⁺ con suero inactivado en proporción 1:1), pocillos control de 100% de hemólisis (agua destilada) y pocillos control de 0% de hemólisis (tampón VSB⁺⁺).



A continuación, se preincubaron las placas durante 30 minutos a 37°C (condiciones estándar), tras lo cual se añadieron a cada pocillo 50 µl de la suspensión de eritrocitos sensibilizados, volviéndose a incubar las placas, en esta ocasión, durante 60 minutos.

Finalmente, se centrifugaron las placas a 2.500 r.p.m. durante 2 minutos y se transfirieron 50 µl de los sobrenadantes a placas de fondo plano (*Cod. 655111, PCS 50*) que contenían 200 µl/pocillo de agua destilada, midiéndose las absorbancias a 405 nm en un lector de placas (*Elx 800, Bio-Tek instruments, inc.*).

Una vez realizados los ensayos bajo condiciones estándar de preincubación (30' 37°C), se modificaron los parámetros de tiempo y temperatura con el objeto de observar posibles variaciones en la actividad de los productos larvarios a estudio. Estas nuevas condiciones de preincubación fueron 0 y 15 minutos a 37°C, y 30 minutos a 4°C (Halkes y col., 1997).

Otro de nuestros objetivos fue conocer la posible quelación de calcio y/o magnesio por parte de los productos larvarios de *A. simplex*; para ello se aumentaron 2, 4 y 8 veces las concentraciones normales de dichos iones, empleándose tampones 0,3, 0,6 y 1,2 mM de calcio y 1, 2 y 4 mM de magnesio (Halkes y col., 1997).

Por último, se utilizaron sueros deficientes en el componente C3 del complemento, con el fin de clarificar el posible mecanismo de acción de estas sustancias. Al protocolo, en esta ocasión, se le añadió un nuevo paso, la adición a todos los pocillos de 25 µl del suero



deficiente (dilución 1:10 con tampón VSB⁺⁺) tras la preincubación (Halkes y col., 1997), añadiendo seguidamente la suspensión de eritrocitos sensibilizados e incubando 60 minutos a 37°C.

Para el cálculo de la actividad del suero expresado como porcentaje de lisis, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad del suero expresado como \% lisis} = \frac{\text{DO control hemolisis SA} - \text{DO control hemolisis SI}}{\text{DO control 100\% hemolisis} - \text{DO control 0\% hemolisis}}$$

Y para la determinación del porcentaje de la actividad inhibitoria de las muestras problemas frente al control se llevaron a cabo los siguientes cálculos:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{DO pocillos SA} - \text{DO pocillos SI}}{\text{DO control hemolisis SA} - \text{DO control hemolisis SI}}$$

DO: densidad óptica
SA: suero activo
SI: suero inactivo

11. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEMENTO POR LA VÍA ALTERNATIVA

11.1. PREPARACIÓN DE LOS ERITROCITOS DE CONEJO

Para la obtención de los eritrocitos de conejo se realizaron extracciones de sangre de la vena marginal de las orejas de conejos sanos, recogiendo sobre solución de Alsever en proporción 1:1. A continuación se añadieron 7,5 ml de solución salina y se centrifugó durante 5 minutos a 2.500 r.p.m. (*Centrifuge 5403, Eppendorf*). El sedimento obtenido se resuspendió en 12,5 ml de solución salina y se volvió a centrifugar. Este procedimiento se repitió una vez más, tras lo cual se mantuvo el sedimento de glóbulos rojos en hielo hasta su posterior utilización.

Posteriormente se calculó, como se hizo en el ensayo de la vía clásica, la dilución necesaria del sedimento para conseguir, en este caso, una concentración de eritrocitos de $1,15 \times 10^8$ células/ml suspendidos en tampón EGTA-VB. Para ello se resuspendieron 400 µl del sedimento en 7,1 ml del tampón. De esta solución se tomaron 100 µl y se hemolizaron con 6,4 ml de agua destilada, determinando a continuación su absorbancia a 410 nm en un



espectrofotómetro (*Pharmacia LKB-Ultrospec III, Pharmacia*). El volumen adicional de tampón EGTA-VB se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen adicional de EGTA-VB} = (\text{Volumen Inicial} - 100 \mu\text{l}) \times \frac{\text{Absorbancia} - 1,230}{1,230}$$

11.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA

Como en el protocolo descrito en el ensayo de activación del complemento por la vía clásica, las distintas concentraciones de los productos larvarios se dispusieron por triplicado en las placas de fondo cónico (*Nunc Plate Cod. 442587, InterMed Nunc*), pero añadiendo, para realizar las concentraciones seriadas, un volumen de 200 μl /pocillo, inicialmente, y tras pasando 100 μl a los siguientes pocillos, a los que previamente se había adicionado 200 μl /pocillo de tampón EGTA-VB.

Se establecieron los mismos pocillos control que en el ensayo anterior: control de hemolisis del suero activo, control de hemolisis del suero inactivado, control de 100% de hemolisis y control de 0% de hemolisis, pero utilizando, en este caso, tampón EGTA-VB en lugar del tampón VSB⁺⁺ empleado para la vía clásica.

Tras la adición de 25 μl de suero normal (dilución 50% en EGTA-VB) en los pocillos problema y 25 μl de suero inactivado (dilución 50% en EGTA-VB) en los pocillos control, las placas se preincubaron bajo condiciones estándar (30 minutos a 37°C).

A continuación, se añadieron 25 μl /pocillo de la suspensión de eritrocitos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C, tras lo cual se procedió a la centrifugación de las placas durante 2 minutos a 2.500 r.p.m. Posteriormente se transfirieron 50 μl de los sobrenadantes a placas de fondo plano (*Cod. 655111, PCS 50*) con 200 μl de agua destilada, midiéndose sus absorbancias a 405 nm en un lector de placas (*Elx 800, Bio-Tek instruments, inc.*).

Al igual que en los ensayos de la vía clásica, se variaron las condiciones de preincubación (0 y 15 minutos a 37°C y 30 minutos a 4°C (Halkes y col., 1997)), para observar, del mismo modo, posibles variaciones en la actividad de los productos larvarios a estudio.

Debido a que sobre la vía alternativa sólo influye el ión magnesio, se aumentó al doble la concentración normal de este ión, empleándose tampones de 1 y 2 mM de magnesio (Halkes y col., 1997), para conocer su posible quelación por parte de los productos larvarios de *A. simplex*.



Y por último, también se realizaron pruebas sobre esta vía utilizando sueros deficientes en el componente C3 del complemento. Al protocolo, al igual que en el caso de la vía clásica, se le añadió el paso de la adición de 25 μ l del suero deficiente (dilución 1:10) a todos los pocillos tras la preincubación (Halkes y col., 1997), tras lo cual se continuó con el protocolo añadiendo los 25 μ l/pocillo de la suspensión de eritrocitos e incubando 30 minutos a 37°C.

Las fórmulas empleadas tanto para la determinación de la actividad del suero como porcentaje de lisis, como para el cálculo del porcentaje de inhibición, son idénticas a las utilizadas para la vía clásica.

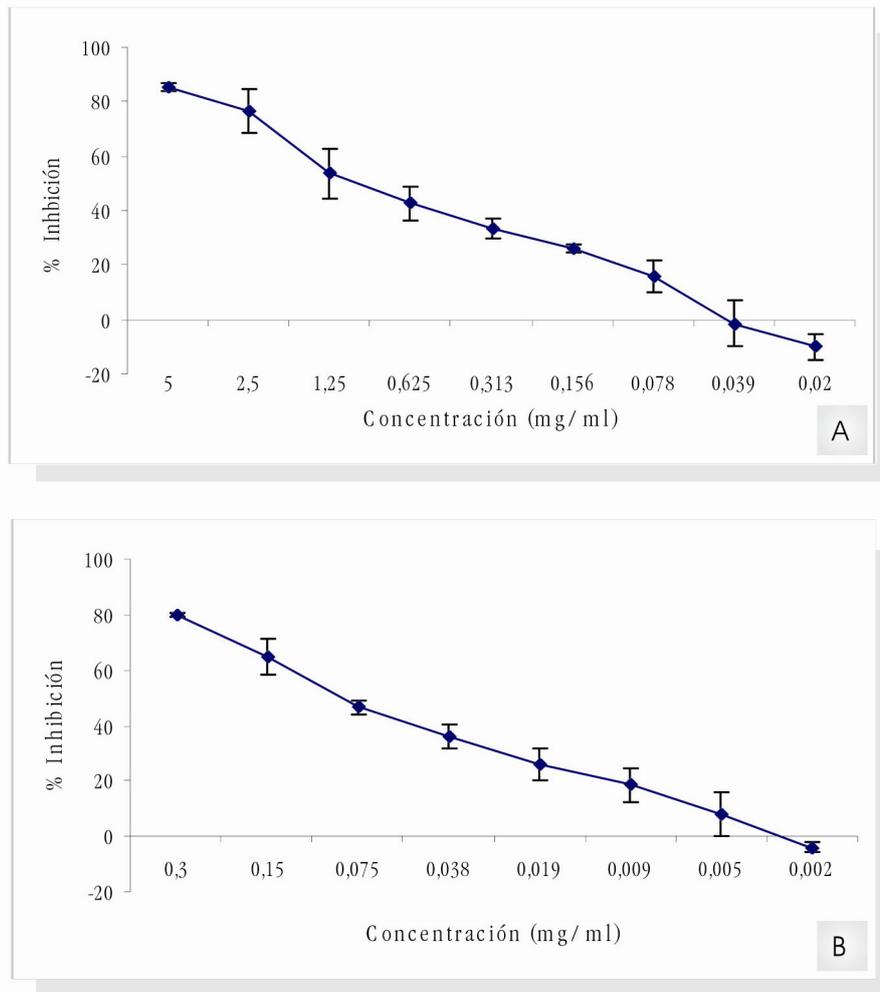
IV. RESULTADOS

1. EFECTO DE LOS PRODUCTOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex* SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO POR LA VÍA ALTERNATIVA

El presente trabajo de investigación ha tratado de poner de manifiesto la actividad de los productos obtenidos a partir de las L3 de *Anisakis simplex*, extracto total y productos de excreción-secreción (ES), sobre el sistema del complemento, mediante la cuantificación de su actividad hemolítica producida tras la formación del complejo de ataque a la membrana.

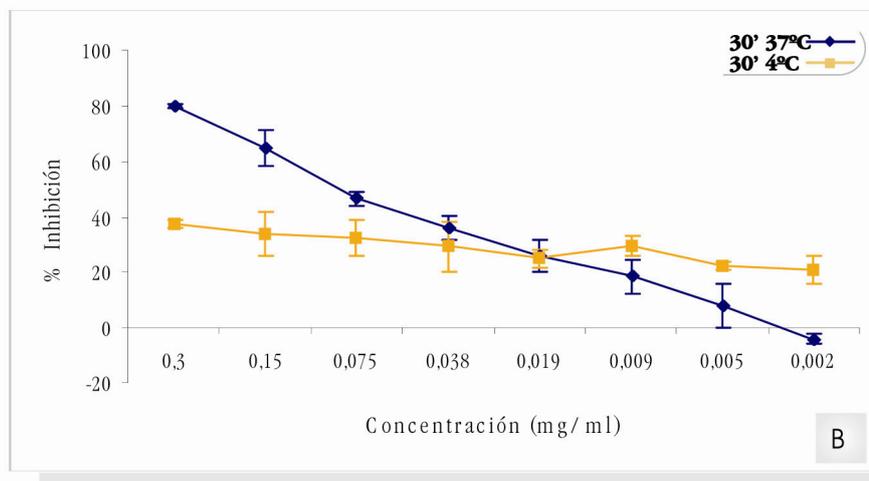
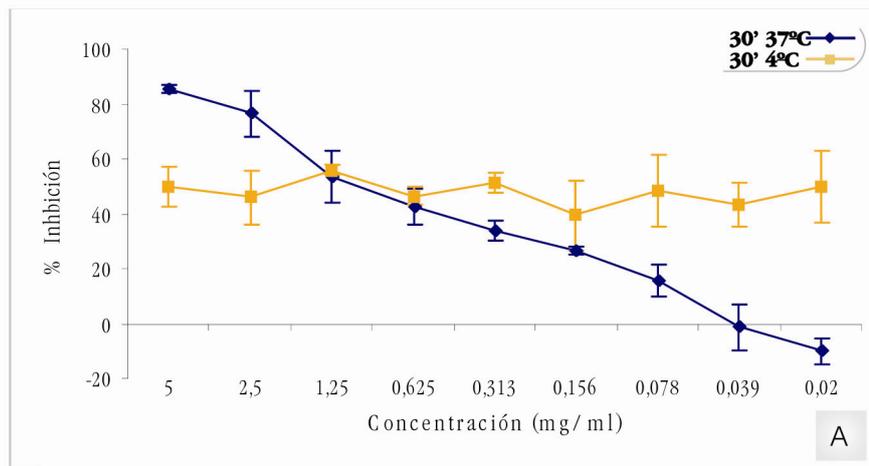
Para ello, en primer lugar, se realizó un ensayo para determinar si dichos productos larvarios producían o no una inhibición de la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía alternativa.

Tanto el extracto total como los productos de ES, produjeron una inhibición dosis-dependiente de la lisis producida tras la activación del sistema del complemento por esta vía (Figura 1). Se determinó la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de los productos larvarios, concentración necesaria para producir el 50% de inhibición de la lisis, utilizando el programa informático descrito por Tallarida y Murray (1987), mostrando unos valores de 0,74 mg/ml para el extracto total, y de 0,069 mg/ml para los productos de ES (Tabla 1).



▲
▲ **Figura 1.** % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía alternativa en condiciones estándar de preincubación (30' 37°C).
▲
▲

Posteriormente, con el fin de comprobar si esta inhibición se producía mediante un proceso enzimático o bien por deplección o consumo de los factores del complemento, se realizaron nuevos ensayos donde se modificaron las condiciones estándar tanto de tiempo como de temperatura de preincubación.



▲▲▲ **Figura 2.** % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía alternativa a diferentes temperaturas de preincubación (37°C y 4°C)

Al realizar el ensayo a 4°C comprobamos que se producía una disminución en el porcentaje de inhibición, aunque no total, por lo que la actividad de los productos larvarios parece depender, en parte, de procesos enzimáticos (Figura 2).

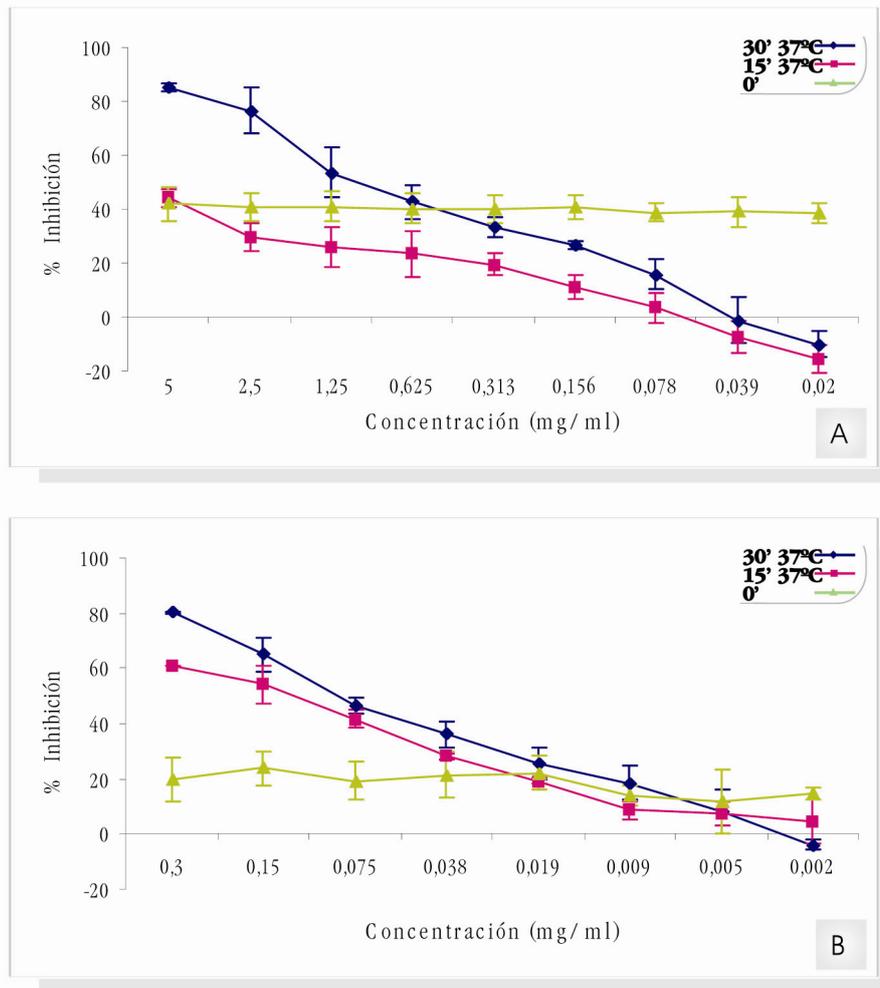


Figura 3. % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de A. simplex sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía alternativa a diferentes tiempos de preincubación (30', 15' y 0').

Al disminuir los tiempos de preincubación comprobamos que el efecto sobre la actividad del sistema del complemento por la vía alternativa es debido, también, a la deplección de uno o varios factores, ya que se producía una disminución en el porcentaje de inhibición que, sin embargo, tampoco fue completa (Figura 3).

Los valores de IC₅₀ mostraron que, a condiciones estándar de preincubación (30' 37°C), la actividad que presentan los productos larvarios es la más elevada (Tabla 1). Asimismo, se pudo observar que, el efecto inhibitorio de los productos de ES, era alrededor de 10 veces superior al obtenido con el extracto total.

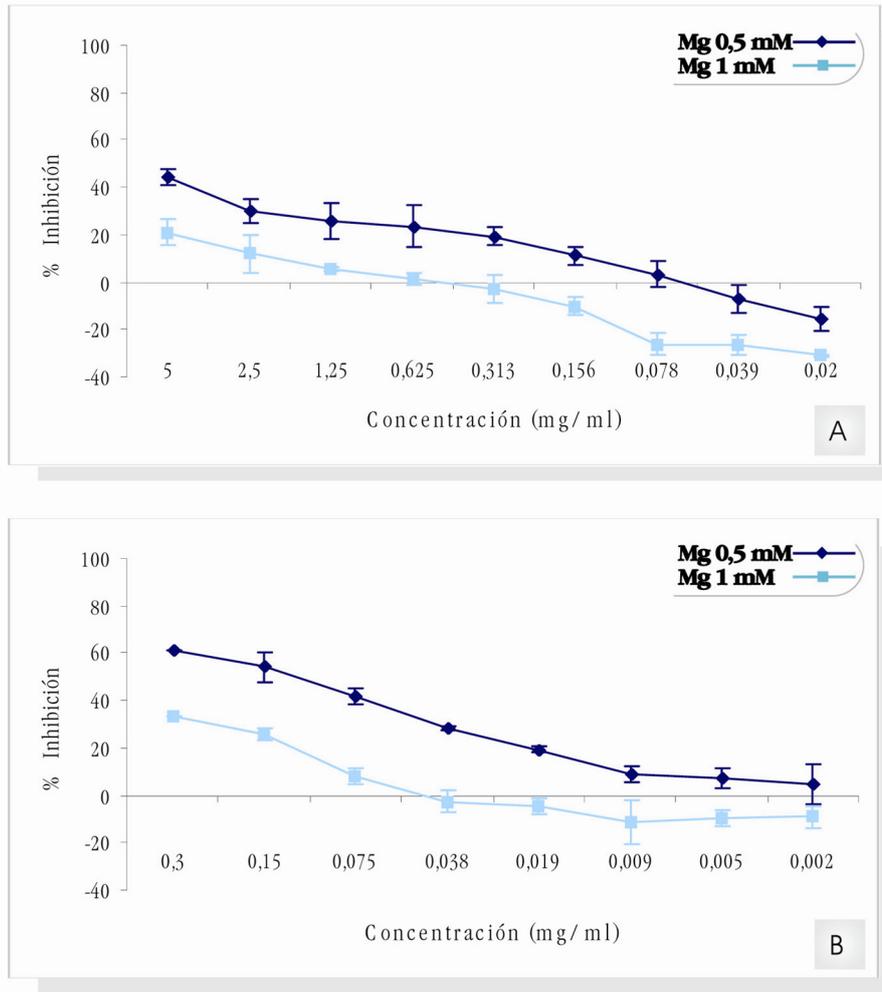


Figura 5. % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía alternativa en presencia de concentraciones crecientes de magnesio. 15' 37°C de preincubación.

Tanto en los ensayos de 30' como en los de 15' de preincubación a 37°C, observamos una disminución en el porcentaje de inhibición de ambos productos larvarios al realizar las pruebas con una concentración doble de magnesio (Figura 4 y 5), con respecto a la concentración normal de este catión, con lo cual se confirma el efecto mediado por quelación del catión magnesio (Tabla 2).

Tabla 2. Actividad de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la vía alternativa. Comparación de la IC₅₀ sobre la actividad hemolítica a diferentes concentraciones de magnesio.

	30' 37°C	
	IC ₅₀ (mg/ml)	
	0,5 mM	1 mM
Extracto total	0,74±0,22	> 5
Productos de ES	0,069±0,015	> 0,3



En estas pruebas, durante la preincubación, los productos larvarios estaban actuando sobre algún o algunos de los componentes del sistema del complemento. Tras dicha preincubación, se añadió el suero C3 deficiente, no observando recuperación en la actividad lítica del complemento (Figura 6), lo que demuestra que las sustancias ensayadas deben actuar sobre el componente C3, ya que si actuaran sobre otros, al añadir suero depleccionado en C3, pero con el resto de los componentes intactos, se observaría una recuperación en la actividad lítica del complemento.

2. EFECTO DE LOS PRODUCTOS LARVARIOS DE *Anisakis simplex* SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO POR LA VÍA CLÁSICA

Para cuantificar el efecto de los productos obtenidos a partir de *A. simplex* (extracto total y ES), sobre la actividad hemolítica del sistema del complemento por la vía clásica, se siguió el mismo procedimiento que en el caso de la vía alternativa.

Al igual que en el caso anterior, lo primero que se realizó fue un ensayo para determinar en qué medida se producía la inhibición de la lisis mediada por el sistema del complemento por la vía clásica, utilizando el extracto total y los productos de ES (Figura 7).

En primer lugar, se observó que, partiendo de las mismas concentraciones de productos larvarios, el descenso de la inhibición sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento, se producía a concentraciones inferiores, como así refleja la IC_{50} correspondiente (Tabla 4).

	30° 37°C		IC ₅₀ (mg/ml)	
			Vía alternativa	Vía clásica
Extracto total		0,74±0,22	0,024±0,004	
Productos de ES		0,069±0,015	0,005±0,0005	

Tabla 4. Actividad de los productos larvarios de *A. simplex* sobre el sistema del complemento. Comparación de la IC_{50} en la vía clásica y alternativa de activación. ▶▶▶▶▶▶▶▶

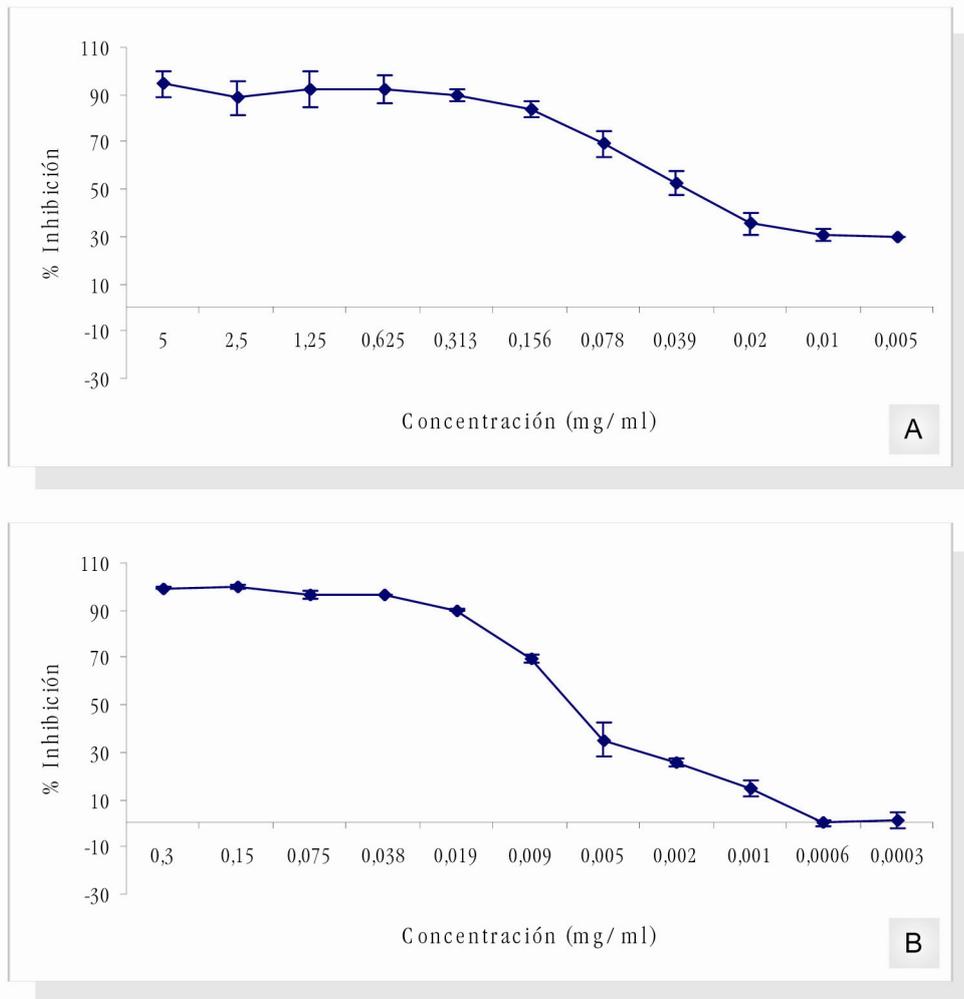


Figura 7. % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía clásica en condiciones estándar de preincubación (30' 37°C).

Con el objeto de determinar si este efecto se debía a procesos enzimáticos o a la deplección de factores del complemento, se llevaron a cabo los ensayos donde se modificaron tanto las condiciones estándar de tiempo como de temperatura de preincubación.

Cuando la preincubación se realizó a 4°C (Figura 8), se observó una disminución en los porcentajes de inhibición de la hemólisis respecto a los ensayos donde la preincubación se desarrolló en condiciones estándar (Tabla 5), lo que indica que los productos larvarios de *A. simplex* parecen actuar mediante procesos enzimáticos, no siendo éstos el único mecanismo, ya que si no la disminución sería total.

Tabla 5. Actividad de los productos larvarios de *A. simplex* sobre la vía clásica. Comparación de la IC₅₀ sobre la actividad hemolítica a diferentes condiciones de preincubación.

Vía clásica	IC ₅₀ (mg/ml)			
	30' 37°C	15' 37°C	0' 37°C	30' 4°C
Extracto total	0,024±0,004	0,35±0,13	0,87±0,32	0,77±0,36
Productos de ES	0,005±0,0005	0,022±0,008	> 0,3	> 0,3

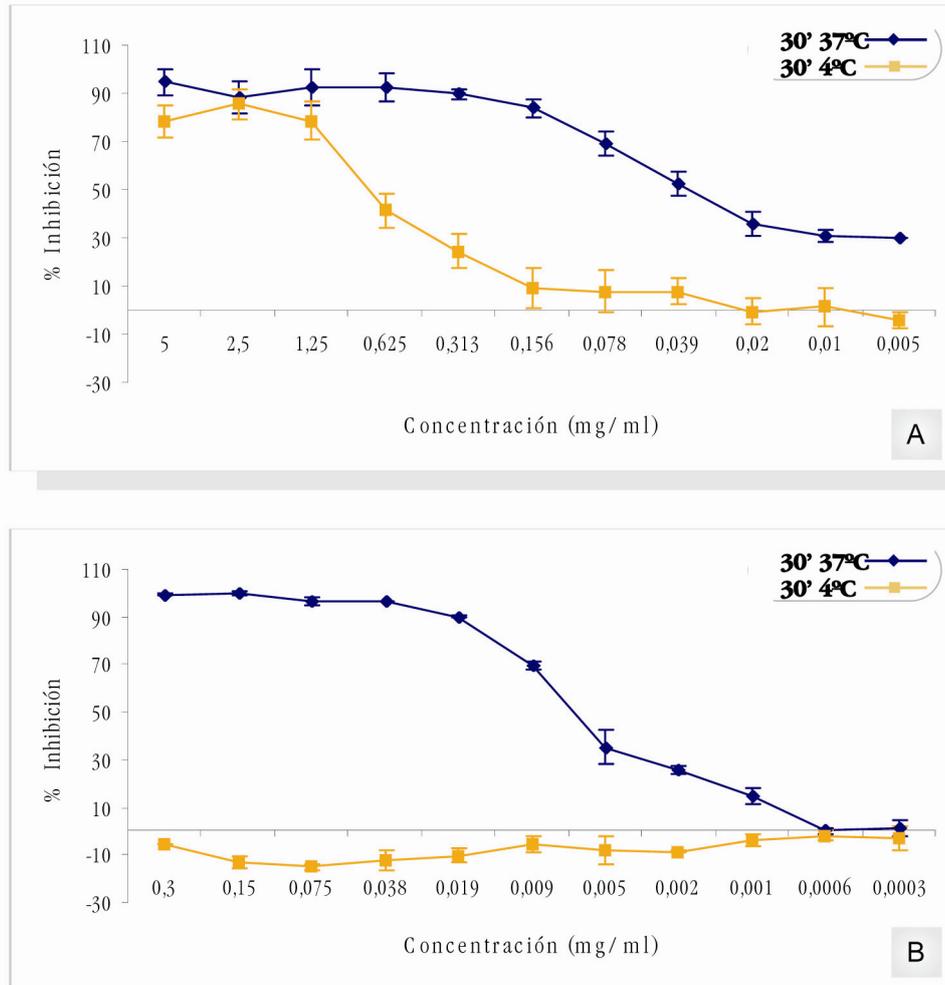


Figura 8. % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía clásica a diferentes temperaturas de preincubación. (37°C y 4°C).

Al disminuir el tiempo de preincubación a 15 y 0 minutos –manteniendo la temperatura a 37°C- (Figura 9) se observó un descenso en los porcentajes de inhibición de la hemólisis (mayor a 0 que a 15 minutos) respecto a los ensayos donde la preincubación se desarrolló en condiciones estándar (Tabla 5). Esto indica que, la deplección o consumo de factores del sistema del complemento, también es un mecanismo de acción del extracto total y de los productos de ES de *A. simplex* sobre la vía clásica.

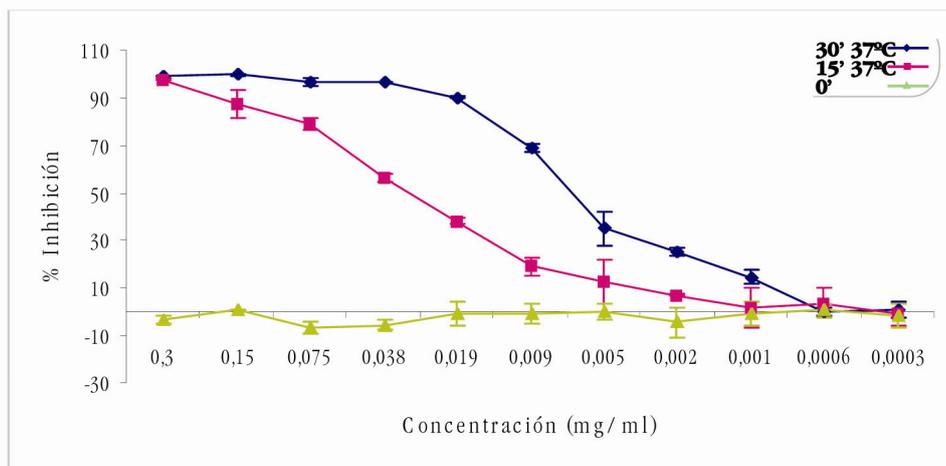
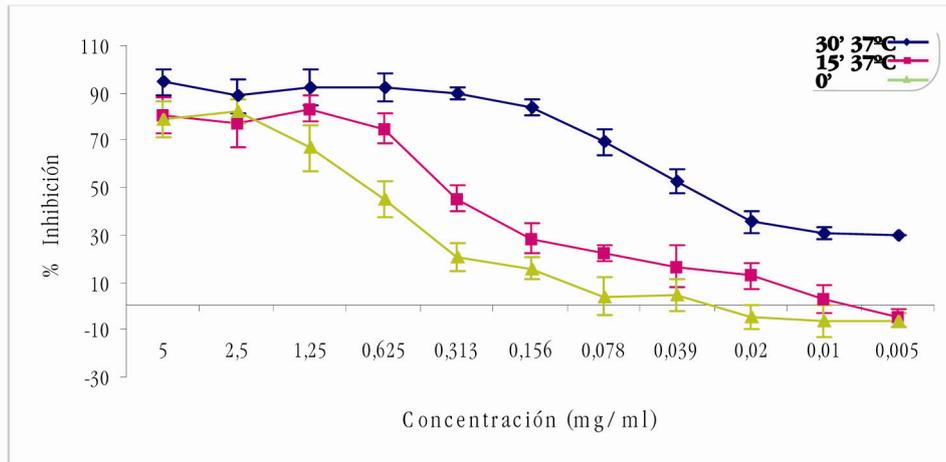


Figura 9. % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía clásica a diferentes tiempos de preincubación (30', 15' y 0').

Posteriormente, para verificar un posible efecto quelante de cationes calcio o magnesio, imprescindibles para la activación del sistema del complemento por esta vía, se estudió la influencia de concentraciones crecientes de ambos cationes sobre el efecto inhibitor, tanto del extracto total como de los productos de ES.



Finalmente, para estudiar la interferencia de los productos larvarios de *A. simplex* con el componente C3 del complemento en la vía clásica, se utilizó suero depleccionado específicamente (C3 deficiente) y se llevaron a cabo los ensayos.

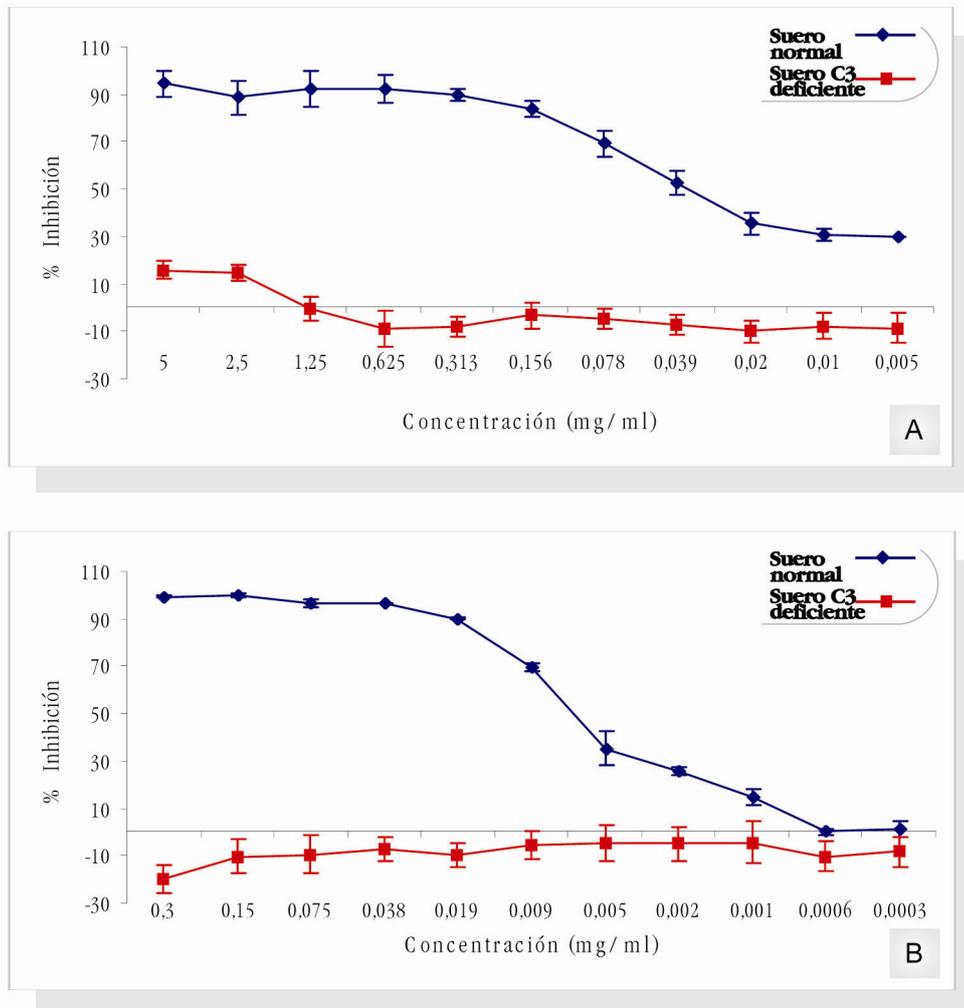


Figura 12. % de inhibición producido por el extracto total (A) y los productos de ES (B) de *A. simplex* sobre la lisis mediada por la activación del sistema del complemento por la vía clásica. Comparación entre suero completo y suero C3 deficiente. Condiciones estándar de preincubación (30' 37°C).

A diferencia de la vía alternativa, donde no apreciábamos variación alguna entre las curvas de inhibición de la lisis obtenidas con suero completo y con suero C3 deficiente, en la vía clásica, observamos una elevada disminución en el porcentaje de inhibición causado por ambos productos larvarios (total y ES) al realizar los ensayos con suero depleccionado en C3 (Figura 12). Esto indica que, dichos productos de *A. simplex*, además de actuar sobre el componente C3 (como ya se vio en la vía alternativa), poseen actividad sobre otro u otros de



los componentes del complemento previos al C3 de la vía clásica. Así, es posible explicar la recuperación de la actividad lítica del complemento en este ensayo.

En las fases tempranas de la cascada del complemento, las vías alternativa y clásica no comparten componentes, sino que es a partir de la molécula C3, donde ambas vías de activación del complemento confluyen. De este modo, en la vía clásica, al añadir el suero C3 deficiente (pero con el resto de componentes intactos), observamos una recuperación de la actividad lítica del complemento, ya que el resto de componentes han sido añadidos (C1, C2 y C4), y es uno o varios de los mismos los que permiten la recuperación.

Por el contrario, en la vía alternativa, al estudiar el efecto sobre el componente C3 mediante el empleo de suero depleccionado específicamente, no se produjo recuperación de la actividad del complemento, debido a que en su fase temprana carece de los componentes que permiten la activación del complemento por la vía clásica.

V. DISCUSIÓN

El conocimiento del sistema del complemento, como mediador de la respuesta inflamatoria aguda, ha conducido a la búsqueda de mecanismos de control de su activación o de inhibición de sus componentes, que permitan reducir el daño producido sobre los tejidos en enfermedades inflamatorias. El sistema del complemento interviene en los procesos inflamatorios a través de diversas proteínas, principalmente las anafilotoxinas C3a y C5a. Además, la activación del complemento está relacionada con la activación de otros mediadores como los sistemas de las quininas y la coagulación (Frank y Fries, 1991). Los péptidos C3a y C5a han sido las proteínas del complemento más intensamente estudiadas. Estas moléculas son capaces de producir los efectos que contribuyen al proceso inflamatorio o alérgico, como son la degranulación de basófilos, y consiguiente liberación de histamina y otras sustancias vasoactivas, el aumento de la permeabilidad vascular y formación de edema (Williams y Jose, 1981), la estimulación de la quimiotaxis de leucocitos (Ward y col., 1979), la liberación de enzimas lisosomales (Becker y col., 1974), la agregación plaquetaria (Becker y col., 1978) y la generación de prostaglandinas a partir de macrófagos (Hadding y col., 1982; Hartung y col., 1983). Además, C5a estimula la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 a partir de los macrófagos, la liberación de PAF (del inglés *platelet-activating factor*) y el metabolismo oxidativo de los neutrófilos y del ácido araquidónico (Maly y col., 1983; Schindler y col., 1990; Frank y Fries, 1991). Sin embargo, la participación del sistema del



complemento no se debe exclusivamente a las anafilotoxinas; así, otros productos derivados de su activación, como el complejo C5b-9, en pequeñas cantidades, son capaces de estimular, del mismo modo, el metabolismo del ácido araquidónico y liberar prostaglandina PGE₂, leucotrieno LTB₄ y tromboxanos, mediadores secundarios, que contribuyen a la inflamación inducida por la activación del complemento en los tejidos dañados (Frank y Fries, 1991).

Una inapropiada o excesiva activación del sistema del complemento puede conducir a la destrucción del tejido inflamado. Puesto que el sistema del complemento es uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria (Dias da Silva y Lepow, 1967; Goldstein, 1988), se asume que la inhibición de la actividad del complemento inhibiría modelos inflamatorios en los cuales el complemento participa. Por lo tanto, la modulación de la activación del complemento, por inhibidores del mismo, permite contrarrestar el progreso de ciertas enfermedades infecciosas, pudiendo tener un valor terapéutico en el control de la inflamación, así como jugar un papel importante en áreas como los trasplantes. De este modo, han surgido varios estudios sobre la utilización de una proteína no tóxica aislada del veneno de cobra, denominada CVF (del inglés *cobra venom factor*), que es capaz de formar un complejo estable con las C3 y C5 convertasas (Fritzinger y col., 1994), produciendo un consumo incontrolado de complemento. Pero, a pesar de su efecto protector en daños pulmonares, neuritis alérgica y vasculitis, su elevada inmunogenicidad ha excluido su aplicación terapéutica. Actualmente, el CVF se emplea en la evaluación de la eficacia de otras moléculas inhibitoras.

Anisakis simplex es un nematodo que infecta accidentalmente al hombre cuando éste consume pescado parasitado por L3, crudo o poco cocinado, produciendo enfermedad por dos mecanismos: a) debido a la hipersensibilidad inmediata mediada por IgE, y b) mediante el efecto local del parásito sobre la pared del tubo digestivo. En cuanto al primer mecanismo, el parásito posee varios antígenos capaces de inducir la síntesis de IgE y ocasionar diversos cuadros alérgicos, cuya gravedad varía desde una simple urticaria hasta un angioedema e incluso un shock anafiláctico. La afección del tubo digestivo se produce cuando el parásito se fija a la mucosa, dando lugar a fenómenos irritativos locales. Estudios con microscopía electrónica han demostrado que el parásito produce agujeros y túneles en la mucosa y submucosa gástrica (Sakanari y McKerrow, 1990). Las larvas pueden enclavarse y producir inflamación o, en los casos más graves, llegar a perforar el estómago y el intestino o migrar a otros órganos y tejidos. La existencia de serín proteasas e hialuronidasas en el parásito, capaces de degradar macromoléculas, favorecerían su capacidad invasiva en las formas gastrointestinales y gastroalérgicas, mientras que antígenos de excreción-secreción (ES), tales



como el inhibidor de serín proteasas, permitirían al nematodo la inhibición de ciertos sistemas enzimáticos presentes en el huésped facilitando su entrada. Asimismo, Sakanari y McKerrow (1990) afirmaron que los productos de ES de las larvas degradan, *in vivo*, macromoléculas similares a las que se encuentran normalmente en la mucosa y submucosa del estómago e intestino. De este modo, después de que la larva invade los tejidos del hospedador, continúa liberando los productos de ES alrededor de los tejidos, causando infiltración de eosinófilos. Estos autores describieron la existencia de una aminopeptidasa y una tripsina-like proteasa que son capaces de atacar macromoléculas y facilitar la penetración.

El denominador común de estas patologías causadas por *A. simplex* son los fenómenos inflamatorios locales. El parásito penetra en la mucosa y desencadena una reacción inflamatoria de tipo predominantemente alérgico, hasta que es extirpado o bien muere destruido por las defensas del huésped. La respuesta inicial del huésped se observa en las primeras 24 horas tras la infección, con la formación de edema, erosiones, ulceraciones e infiltrados hemorrágicos de la mucosa y submucosa. A partir de entonces, tanto el parásito como sus restos, son rodeados de un importante infiltrado eosinofílico, al que con frecuencia se añade un componente variable de linfocitos, células plasmáticas y neutrófilos polimorfonucleares. Este infiltrado eosinofílico se describe en todos los estudios, es constante e invariable, en las diferentes localizaciones del parásito, y es debido a la producción de potentes factores quimiotácticos para eosinófilos (Tanaka y Torisu, 1978). El hospedador adquiere la capacidad para destruir las larvas mediante el desarrollo de una respuesta inmunitaria tanto humoral como celular (del Pozo y col., 1999).

La inflamación se acompaña de un notable edema y afecta predominantemente a la mucosa y submucosa, aunque, en ocasiones, es transmural. Característicamente, la pared del tramo afectado se halla muy engrosada e incluso, a veces, adquiere un aspecto pseudotumoral. En los casos avanzados, existe un grado variable de necrosis, que se manifiesta en forma de ulceración mucosa, y que puede ocasionar incluso la perforación de la víscera (Louredo y col., 1997).

Por otra parte, evidencias clínicas y experimentales implican al complemento en la patogénesis de numerosas enfermedades. La urticaria es una reacción cutánea que cursa con intenso prurito o sensación de quemazón, y que se acompaña de la aparición de lesiones habonosas en la superficie cutánea y, en ocasiones, también en mucosas. Se trata de una dermatosis de alta prevalencia, ya que se calcula que llega a afectar a un 15-25% de la población en algún momento de la vida. El edema que se origina es secundario a la vasodilatación y al aumento de la permeabilidad de los capilares y vénulas, por la acción de la



histamina y otros péptidos vasoactivos contenidos en los gránulos de los mastocitos y liberados al medio extracelular. Entre los posibles mecanismos implicados en la activación de los mastocitos cutáneos nos encontramos la alteración del sistema del complemento. El déficit de la proteína reguladora C1INH es el responsable de un tipo de urticaria denominada edema angioneurótico hereditario (EAH), cuyas manifestaciones clínicas comprenden la acumulación aguda e intermitente de líquido en piel y mucosas. La proteína C1INH es capaz de inhibir elementos relacionados con los sistemas de las quininas, la plasmina y la coagulación. De este modo, los mediadores de la formación del edema comprenden un fragmento proteolítico que se produce en la activación de C2, denominado quinina de C2, y la bradiquinina. Debido a la falta de regulación por parte de C1INH, tanto la calicreína como el factor XII de la coagulación activados, pueden favorecer la formación de bradiquinina, que es capaz de contraer las células del endotelio vascular, permitiendo la extravasación de plasma y, así, originar el edema tisular. Existen dos formas genéticas de EAH, la forma tipo I, caracterizada por niveles disminuidos pero funcionales de C1INH, y la forma tipo II que presenta una síntesis normal de proteínas disfuncionales (Davis, 1988). Esta última no puede diagnosticarse, solamente, mediante la determinación cualitativa de la concentración de C1INH, sino que se debe determinar, simultáneamente, la concentración de C4, ya que se encuentra siempre reducida en pacientes con EAH. Durante las crisis, se observan concentraciones elevadas de C1 activado y concentraciones reducidas de C2 y C4. Esta enfermedad se corrige completamente reemplazando el C1INH. Además, este déficit se puede adquirir en fases avanzadas de la vida. En algunos casos, se ha detectado la presencia de autoanticuerpos frente a C1INH, mientras que, en otros, existe una proliferación monoclonal de células B, como ocurre en la leucemia linfocítica crónica (Agostoni y Cicardi, 1992). Estos pacientes sintetizan antiidiotipos frente a las inmunoglobulinas producidas en exceso; las interacciones idiotipo-antiidiotipo provocan, por razones aún desconocidas, consumo de C1, C4, C2 y del C1INH, sin que se llegue a formar una C3 convertasa activa.

Por otro lado, tanto la urticaria como el angioedema, pueden constituir uno de los síntomas de la anisakidosis. Así, Kasuya y col. en 1990, observaron que las larvas de *Anisakis* eran los agentes etiológicos reales en algunos pacientes con urticaria, pero sin dolor abdominal ni otra indicación clínica de anisakidosis. Asimismo, se están llevando a cabo estudios que ponen de manifiesto la asociación entre urticaria crónica e infecciones parasitarias. De este modo, diversos autores sugieren que dichas infecciones deberían ser consideradas como una causa importante de urticaria crónica, por lo que los métodos serológicos deberían encaminarse a la detección de parásitos, tales como, *Toxocara*, *Fasciola*, *Echinococcus* o *Anisakis* en casos de



urticaria (Humbert y col., 2000; Demirci y col., 2003; Cannistraci y col., 2003; López-Saez y col., 2003).

En este trabajo, nos hemos planteado el estudio de la posible actividad de los productos larvarios de *A. simplex* sobre el sistema del complemento, como posible mecanismo de acción para evadir la primera línea de defensa del hospedador, en su intento por fijarse a la mucosa e impedir la atracción de células, mediada por el complemento, como eosinófilos (que se fijan a su cutícula) o macrófagos, que favorecen su destrucción.

El estudio de la actividad sobre el sistema del complemento de los productos larvarios de *A. simplex*, se realizó a través de ensayos hemolíticos que nos permitieran establecer la actividad funcional del mismo. Aunque se han descrito numerosas modificaciones, estos ensayos se basan en el protocolo descrito por Mayer en 1961. En nuestro caso, se siguió la técnica descrita por Klerx y col. (1983), mediante la cual varias diluciones de las muestras a estudio se incubaron, bajo determinadas condiciones, con suero humano como fuente de complemento y glóbulos rojos de carnero sensibilizados con hemolisina, para la vía clásica, o glóbulos rojos de conejo, para la vía alternativa. Los resultados se han expresado como porcentajes de inhibición de la hemólisis.

Tanto el extracto total como los productos de ES de *A. simplex* mostraron un efecto inhibitorio de la hemólisis dosis-dependiente, producida por la activación del sistema del complemento por ambas vías. Los productos de ES manifestaron, tanto en la vía alternativa como en la vía clásica, una actividad mayor a la obtenida por el extracto total (con valores de IC_{50} de 0,069 y 0,005 mg/ml frente a 0,74 y 0,024 mg/ml). Por otro lado, las concentraciones necesarias para obtener un efecto inhibitorio máximo de la lisis sobre la vía clásica fueron menores a las requeridas para la vía alternativa. De este modo, concentraciones superiores a 0,313 mg/ml, en el caso del extracto total, y a 0,019 mg/ml, para los productos de ES larvarios, no produjeron un aumento en el porcentaje de inhibición de la lisis. Sin embargo, para obtener un efecto inhibitorio de la hemólisis de la misma magnitud en la vía alternativa, las concentraciones requeridas fueron de 5 y 0,3 mg/ml, de extracto total y productos de ES, respectivamente. Esto indica que los productos larvarios de *A. simplex* presentan una mayor actividad moduladora sobre la vía clásica del complemento que sobre la vía alternativa.

Los resultados obtenidos por Jeong y col. (2004), al ensayar la actividad anticomplementaria de biopolímeros extraídos de los aparatos fructíferos del hongo *Coriolus versicolor* (Polyporaceae), coinciden con los nuestros, ya que la actividad anticomplementaria sobre la vía clásica del extracto CV-S2 era mucho mayor que el obtenido sobre la vía alternativa. Estos autores señalaron que dicha actividad se debía principalmente a los



carbohidratos presentes en los biopolímeros, lo cual coincidía con los resultados obtenidos por Yamada y col. (1985) al estudiar la actividad anticomplementaria de los polisacáridos de la umbelífera *Angelica acutiloba*. De igual forma, Irigoien y col. en 1996, señalaban que la activación del complemento producida por distintos extractos de *Echinococcus granulosus* (obtenidos tanto del líquido como de la membrana del quiste hidatídico y de los protoescólex), estaba asociada a componentes carbohidratados y propusieron dicha activación como un mecanismo de evasión, ya que ello supondría un consumo del complemento alrededor del parásito. Asimismo, *Schistosoma mansoni* es capaz de provocar la activación de la vía alternativa, produciendo un consumo del complemento (Marikovski y col., 1986). Y los metacestodos de *Taenia solium*, por su parte, a través de polisacáridos sulfatados, también son capaces de activar el complemento lejos de su superficie (White y col., 1997).

Por otro lado, Cimanga y col. (1995) observaron que los extractos metanólicos de las hojas de *Morinda morindoides* (Rubiaceae) mostraban una inhibición dosis-dependiente sobre la vía clásica, no así sobre la vía alternativa, donde el efecto inhibitorio no era dependiente de la dosis y era menor. Por el contrario, la proteína inhibitoria de la vía alternativa (ACPIP) aislada en la hemolinfa de la larva del gusano de seda *Bombix mori*, se encontró que inhibía selectivamente dicha ruta, sin tener efecto sobre la vía clásica (Sekijima y col., 2001). Por su parte, Deng y col. (2003) demostraron que la paramiosina de *S. mansoni* presentaba una actividad anticomplementaria sobre ambas vías, con una inhibición significativa dosis-dependiente. Asimismo se han citado casos en los que un mismo compuesto es capaz de inhibir la vía clásica y activar la alternativa de forma dosis-dependiente, como ocurre con el ácido rosmarínico de *M. morindoides* (Cimanga y col., 1995).

Al investigar el mecanismo de acción de los productos larvarios de *A. simplex*, se planteó la posibilidad de que las sustancias implicadas actuaran mediante un proceso de inhibición enzimática. Con dicho fin, realizamos nuevos ensayos disminuyendo la temperatura de preincubación de 37°C a 4°C. En el caso de la vía clásica, se observó un descenso notable en los porcentajes de inhibición de la lisis al disminuir la temperatura. Esto sugiere que los procesos enzimáticos constituyen un modo de actuación de los productos de las larvas de *A. simplex*. Sin embargo, el extracto total, a las concentraciones de 5, 2,5 y 1,25 mg/ml, no mostró dicho descenso, lo que parece indicar que deben estar involucrados otros mecanismos, o que el sistema se encuentra saturado a dichas concentraciones. En el caso de la vía alternativa, el efecto inhibitorio de la lisis, tanto del extracto total como de los productos de ES, no fue dosis-dependiente, lo que podría indicar, bien que existen mecanismos no enzimáticos cuya acción se enmascara en presencia de dichas actividades enzimáticas, porque éstas los



degradan, o bien que existen mecanismos enzimáticos alternativos que actúan a 4°C. Para poder dilucidar la causa de estos fenómenos, deberían llevarse a cabo estudios más detallados. A pesar de ello, debe existir una actividad residual enzimática, ya que, tanto a 5 y 2,5 mg/ml de extracto total como a 0,3, 0,15 y 0,075 mg/ml de productos de ES, se observó un descenso de los porcentajes de inhibición de la lisis respecto a los obtenidos a 37°C. Sin embargo, la actividad alcanzada a 4°C no superó, a ninguna de las concentraciones ensayadas, la obtenida a 37°C, ya que el porcentaje de inhibición de la lisis nunca fue mayor del 50%.

Kapil y Moza (1992) indicaron que el efecto inhibitorio del ácido bosvético sobre el complemento, que permanecía constante a concentraciones elevadas del mismo, era una característica de inhibición enzimática, sugiriendo que dicho efecto inhibitorio era debido a la inhibición de la C3 convertasa de la vía clásica.

Asimismo, para profundizar en el mecanismo de acción, se variaron los tiempos de preincubación de 30 a 15 y 0 minutos, manteniendo constante la temperatura (37°C). Los ensayos realizados sobre la vía clásica mostraron un descenso evidente en los porcentajes de inhibición de la lisis al acortar dicho tiempo de preincubación, por lo que el consumo de factores del complemento parece ser un mecanismo de actuación de los productos larvarios de *A. simplex*. En el caso de la vía alternativa, se pudo observar un descenso proporcional en los porcentajes de inhibición de la lisis cuando el tiempo se disminuyó a 15 minutos, con respecto a los alcanzados a 30 minutos, debido, probablemente, a proteasas presentes en los productos larvarios de *A. simplex*, las cuales degradan moléculas propias. Sin embargo, a pesar de que este hecho se observó cuando se anulaba el tiempo de preincubación a las concentraciones más altas, las curvas de inhibición de la lisis no mostraron una relación dosis-dependiente a 0 minutos, al igual que ocurría a 4°C. Esto sugiere que, debido a que no existe degradación de proteínas del parásito, dado que no ha habido preincubación, los mecanismos enzimáticos podrían estar actuando sobre productos intermedios del sistema del complemento. En cualquier caso, los productos de ES mostraron una actividad enzimática y depleccionante de factores del complemento mayor que el extracto total, lo cual coincide con el hecho de que, dichos productos de ES, presentan una mayor actividad sobre el sistema del complemento que el extracto total.

Hay que tener en cuenta que, en este caso, nos referimos a inhibición de la lisis mediada por el sistema del complemento y no a inhibición de dicho sistema, debido a que los ensayos realizados variando el tiempo de preincubación, no nos permiten conocer si los productos larvarios están destruyendo factores del complemento, o bien están produciendo una activación de los mismos, que tendría como consecuencia un agotamiento de dichos factores



previo al contacto con los eritrocitos, lo que se traduciría en una inhibición de la hemólisis. El CVF, una proteína activadora del sistema del complemento, actúa de igual forma que C3b, formando un complejo con el factor B (CVFB), que posteriormente se une al factor D, promoviendo la escisión del factor B y originando la convertasa CVFBb (Vogel y Müller-Eberhard, 1982). Esta convertasa activa C3 y C5, de forma análoga a C3bBb y, a pesar de que sus estructuras presentan una gran similitud, la convertasa CVFBb es más estable y más resistente a la inactivación por los factores H e I, por lo que puede hidrolizar a los componentes C3 y C5 durante más tiempo. Todo ello provoca un consumo incontrolado del sistema del complemento, que se traduce en la inactivación del mismo. De la misma forma podrían estar actuando los productos larvarios de *A. simplex* durante la preincubación, de modo que, al añadir los eritrocitos, tanto de conejo como de carnero, no observamos hemólisis debido a que los componentes del sistema han sido consumidos previamente.

En contraposición con nuestros resultados, Pinto y Nascimento (1997) no encontraron variaciones significativas al disminuir el tiempo y la temperatura de preincubación al estudiar la actividad anticomplementaria de diversas hidroxi- y metoxixantonas por la vía clásica. Debido a que estos compuestos no mostraron actividad sobre la vía alternativa, pero sí sobre la vía clásica, estos autores sugieren que esta inhibición selectiva podría deberse a la deplección de iones calcio, los cuales son imprescindibles para la activación del complemento por esta última vía, ya que quedan descartados los fenómenos enzimáticos y la deplección de factores del complemento. A la misma conclusión llegaron también Nascimento y col. (1997; 1998), al estudiar distintos flavonoides obtenidos a partir de la corteza de *Artocarpus elasticus* (Moraceae) y compuestos diterpénicos de la corteza de *Endospermum diadenum* (Euphorbiaceae).

Cimanga y col. en 1999, encontraron variaciones significativas, en las IC₅₀, al disminuir el tiempo de preincubación cuando estudiaban la actividad anticomplementaria de extractos obtenidos de la euforbiacea *Bridelia ferruginea*, que contenían flavonoides. Los valores de IC₅₀ descendían de 29,4 mM a 0 minutos, hasta 26,3 mM a 15 minutos y 10,8 mM a 30 minutos. Este aumento en la inhibición de la actividad hemolítica producida por el sistema del complemento, se debía al consumo de proteínas del sistema, durante la preincubación, que produce el extracto vegetal de *B. ferruginea*.

Posteriormente, y debido a la necesidad de pequeñas cantidades de magnesio que requiere la activación del complemento por la vía alternativa, estudiamos el efecto que se producía al aumentar las concentraciones normales de dicho catión de 0,5 mM a 1 mM, para así determinar si su quelación constituía un posible mecanismo de acción. De este modo,



observamos que, al realizar los ensayos con una concentración doble de magnesio, se producía una disminución en el porcentaje de inhibición de la lisis, a todas las concentraciones de los productos larvarios de *A. simplex* ensayadas, tanto a 30 como a 15 minutos de tiempo de preincubación, confirmando el efecto quelante de este catión por parte de los productos larvarios de *A. simplex*. Este hecho se vio confirmado cuando se realizó el estudio a 0 minutos, ya que no existía diferencia en los porcentajes de inhibición, debido a que no hubo tiempo para que se produjera la quelación de los iones magnesio. Y, cuando disminuimos la temperatura a 4°C, tampoco se observó variación alguna debido a que, como ya hemos mencionado, a dicha temperatura deben intervenir otros mecanismos.

Los resultados obtenidos al aumentar las concentraciones de magnesio a 2 mM y 4 mM revelaron valores negativos de porcentajes de inhibición de la lisis, de magnitud muy superior a las alcanzadas en el resto de condiciones (valores no mostrados). Esto podría indicar que las altas concentraciones de magnesio potencian la lisis, sin embargo, serán necesarios otro tipo de estudios basados en porcentajes de activación para dilucidar la causa de dichos resultados.

En el caso de la vía clásica, se estudió la influencia de concentraciones crecientes de calcio y de magnesio sobre el efecto inhibitor de los productos larvarios de *A. simplex*, para, de este modo, verificar un posible efecto quelante de dichos cationes, imprescindibles para la activación del complemento por esta vía. Por lo tanto, se llevaron a cabo los ensayos aumentando las concentraciones de magnesio de 0,5 mM a 1 mM, 2 mM y 4 mM, y las de calcio de 0,15 mM a 0,3 mM, 0,6 mM y 1,2 mM, no observándose variaciones significativas en los porcentajes de inhibición de la lisis en ninguno de los casos. Por lo tanto, la quelación de estos iones (calcio y magnesio) queda excluida como posible causa responsable de la actividad anticomplementaria de los productos larvarios de *A. simplex* en la vía clásica.

Tampoco observaron variación alguna en los porcentajes de inhibición Kroes y col. (1997), al estudiar la actividad anticomplementaria del ácido β -glicirretínico obtenido a partir de la raíz de *Glycyrrhiza glabra* (regaliz), ya que, aumentando hasta ocho veces la concentración de dichos cationes, no se producía ninguna variación significativa en la IC₅₀ con respecto a las concentraciones normales. Asimismo, Halkes y col. (1997) no encontraron variación alguna en las IC₅₀ al incrementar las concentraciones de calcio y magnesio cuando estudiaban la actividad anticomplementaria de la fracción FU-3 del extracto etilacético obtenido a partir de las flores de la rosácea *Filipendula ulmaria*.

A pesar de que Nascimento y col. (1998), en su estudio de la actividad anticomplementaria de *E. diadenum*, observaron una disminución en la actividad inhibitoria al aumentar las concentraciones de calcio, estos autores afirmaron que, en los casos en que la quelación de



calcio es el principal mecanismo de acción, la disminución de la actividad con concentraciones crecientes de este catión debe ser mucho más sustancial que la encontrada por ellos.

Finalmente, procedimos a investigar una posible interacción con el componente C3, que participa en ambas vías de activación del complemento, y que constituye un elemento fundamental del sistema. Para ello, empleamos suero deficiente en dicho componente, y siguiendo el protocolo propuesto por Halkes y col. en 1997, sometimos a los productos larvarios de *A. simplex* a un ensayo hemolítico, tanto por la vía clásica como por la alternativa, en condiciones estándar de preincubación.

En el caso de la vía alternativa, el suero C3 deficiente no mostró diferencia significativa con respecto al suero normal. Debido a que, durante la preincubación, los productos están actuando sobre algún o algunos de los componentes del sistema del complemento, al añadir el suero deficiente en C3, pero con el resto de componentes intactos, y no observar recuperación en la actividad lítica del complemento, se puede concluir que los extractos actúan sobre dicho componente, ya que si actuaran sobre otro u otros se apreciaría una recuperación.

Por otro lado, y a diferencia de la vía alternativa, las curvas de inhibición obtenidas con suero C3 deficiente en la vía clásica, mostraron una notable disminución en los porcentajes de inhibición de la lisis. Esto parece indicar que los productos larvarios de *A. simplex*, además de actuar sobre el componente C3, como se observó en la vía alternativa, poseen actividad sobre otro u otros componentes del sistema del complemento anteriores a la formación de la C3 convertasa, ya que en este punto ambas vías convergen. De este modo, se puede explicar la recuperación de la actividad del complemento en este ensayo, ya que, al añadir el suero C3 deficiente (pero con el resto de componentes intactos), se observó una recuperación de la actividad lítica. Los péptidos C1, C2 y C4 no participan en la vía alternativa, sino que son exclusivos de la vía clásica, por ello, la diferencia observada entre ambas vías, al realizar los ensayos con suero C3 deficiente, tiene que ser debida a la interacción con uno o varios de estos péptidos, que permiten el restablecimiento de la actividad en la vía clásica, pero no en la vía alternativa. El hecho de que los productos larvarios muestren una inhibición de la lisis máxima, sostenida a lo largo de las primeras concentraciones en la vía clásica, indica que dichos extractos poseen mayor actividad sobre esta vía, lo que sugiere que deben actuar sobre algún o algunos de los componentes específicos de la vía clásica. Esto coincide con la diferencia observada al realizar los ensayos con suero C3 deficiente, ya que C1, C2 y C4, al sufrir la acción de los productos larvarios en mayor medida y ser añadidos con el suero deficiente, reestablecen la actividad del complemento.



El hecho de que los productos larvarios de *A. simplex* ejerzan una inhibición de la hemólisis producida por la activación del sistema del complemento puede estar relacionado con sus propiedades anticoagulantes como en el caso de la heparina, que además de sus efectos anticoagulantes, presenta potentes efectos sobre el sistema del complemento (Moen y col., 1997). Según Perteguer y col. (1996), los productos de ES de las larvas de *A. simplex* prolongan el tiempo de coagulación sanguínea *in vitro*. Además, se ha visto que, tanto la agregación plaquetaria como la secreción de plaquetas inducida por el zimosán, es eliminada cuando se utiliza plasma deficiente en C3 como fuente de complemento (Breckenridge y col., 1977). Del mismo modo, la agregación plaquetaria mediada por trombina es potenciada en presencia de C3 (Polley y Nachman, 1979). Por ello, el hecho de que los productos larvarios de *A. simplex* produzcan una inhibición de la hemólisis en la vía alternativa del complemento, podría estar relacionada con un consumo del componente C3 del complemento, lo que produciría una alteración en la agregación plaquetaria, traducándose en una alteración de los procesos de la coagulación sanguínea.

Dado que las larvas de *A. simplex* poseen proteasas que degradan el colágeno (Sakanari y McKerrow, 1990), se podría pensar que, estas mismas sustancias anticoagulantes, actuarían mediante actividad colagenasa, traducándose en la pérdida de la actividad hemolítica por la degradación de la triple hélice similar al colágeno del componente C1q del sistema del complemento. Es previsible que la liberación de sustancias inhibitoras de ambos sistemas de amplificación pueda prevenir o retrasar la aparición de los procesos inflamatorios en los tejidos que rodean a las larvas. A este respecto, Patthy en 1990, ya señalaba que las cascadas del complemento y de la coagulación descienden de un sistema ancestral de defensa, cuyo papel dual consistiría en inmovilizar y destruir las bacterias invasoras y prevenir la pérdida de fluidos corporales.

Cimanga y col. (1999) demostraron que los extractos acetónicos de *B. ferruginea* inhiben el componente C1, lo que coincide con el hecho de que, estos extractos, muestren inhibición sobre la vía clásica. En el caso del ácido β -glicirretínico el efecto inhibitorio es más acusado sobre el componente C2, mientras que, este compuesto, no presenta actividad sobre C1 y C4 y sólo es posible observar una inhibición sobre estos componentes a altas concentraciones (400 mM) (Kroes y col., 1997).

Inal y Sim (2000) evidenciaron que el dominio extracelular Sh-TOR-ed1 de la proteína Sh-TOR de *S. mansoni* interaccionaba con el componente C2 de la vía clásica, al evaluar su efecto sobre la lisis de eritrocitos de carnero. Este péptido producía una inhibición de la lisis



dosis-dependiente. Estos resultados muestran que la proteína Sh-TOR se une específicamente a C2, inhibiendo la vía clásica de activación del complemento.

Diversos estudios llevados a cabo con anterioridad, indican la existencia de una gran comunidad antigénica dentro de los helmintos, ya que comparten numerosas actividades enzimáticas, muchas de las cuales interactúan directamente con el sistema del complemento. Un ejemplo lo constituyen las serín proteasas, una de las más importantes familias de enzimas, distribuidas ampliamente en los nematodos parásitos humanos. Estas proteasas están implicadas en la patogénesis de muchas enfermedades parasitarias por nematodos, entre las cuales se encuentra la anisakidosis (Sakanari y col., 1989). En 1988, Kennedy y col., ya señalaban la relación antigénica entre los antígenos somáticos y secretados de la L3 de *A. simplex*, con *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides* y *Toxocara canis*.

La paramiosina, una proteína estructural del músculo de los invertebrados (Elfvín y col., 1976), es capaz de unirse al componente C1 e inhibir el comienzo de la vía clásica, y se ha encontrado en varios helmintos, como *T. solium*, *S. mansoni* (Laclette y col., 1992), *Opisthorchis felinus* (Shustov y col., 2002), *E. granulosus* (Muhlschlegel y col., 1993), y Pérez-Pérez y col., (2000) han clonado la paramiosina procedente de *A. simplex*, describiendo su estructura primaria y apuntando la posibilidad de considerar esta molécula como un alérgeno debido a su capacidad de unión a la IgE. Esta paramiosina también se ha observado que está presente en la cutícula y sobre la superficie de estos helmintos.

Deng y col. (2003) desarrollaron pruebas similares a las presentadas en este trabajo, utilizando distintas cantidades de paramiosina recombinante de *S. mansoni*. Estos autores observaron, además de una inhibición de la hemólisis por la vía alternativa dosis-dependiente, una inhibición de la activación del complemento por unión de esta molécula al menos a tres componentes del sistema: C1q, C8 y C9. Al unirse al primero de ellos, la paramiosina fue capaz de bloquear el inicio de la vía clásica, mientras que, a través de su unión a C8 y C9 provocó la inhibición de la formación del MAC. Por otra parte, la capacidad de la paramiosina para unirse a las regiones Fc de la IgG, puede servir a este parásito como táctica de enmascaramiento al bloquear la unión de anticuerpos del hospedador (Loukas y col., 2001).

Basándonos en todos los resultados y datos expuestos anteriormente, podemos afirmar que, la actividad anticomplementaria de *A. simplex*, constituye, probablemente, un importante mecanismo de evasión de la respuesta inmune, que le permite enclavarse y penetrar en la mucosa, favoreciendo la infección.



VI. CONCLUSIONES

- ❶ Los productos larvarios de *Anisakis simplex* presentan actividad moduladora del sistema del complemento, tanto por la vía alternativa como por la clásica, siendo su eficacia, en este último caso, mucho mayor que para la vía alternativa.
- ❷ Los productos de excreción-secreción (ES) de *A. simplex* muestran mayor actividad moduladora del sistema del complemento que el extracto total larvario.
- ❸ Tanto la actividad enzimática como la deplección o consumo de factores del complemento, constituyen un modo de acción de los productos larvarios de *A. simplex*, si bien, estos mecanismos, no suponen el único modo de actuación de estos productos sobre el sistema del complemento.
- ❹ La actividad inhibitoria sobre la hemólisis producida por los productos larvarios de *A. simplex* en la vía alternativa del complemento se debe, en parte, a la quelación de los iones magnesio.
- ❺ La actividad inhibitoria de los productos larvarios de *A. simplex* en la vía clásica, no es debida ni a la quelación de iones calcio ni de iones magnesio.
- ❻ Los productos larvarios de *A. simplex* actúan sobre el componente C3 del sistema del complemento, si bien, su actuación sobre otros componentes exclusivos de la vía clásica, es mayor.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AGOSTONI, A. Y CICARDI, M. (1992). Hereditary and acquired C1-inhibitor deficiency: biological and clinical characteristics in 235 patients. *Medicine (Baltimore)* 71: 206-215.
- ANDREWS, N.W.; ABRAMS, C.K.; SLATIN, S.L. Y GRIFFITHS, G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 61: 1277-1287.
- BECKER, E.L.; SHOWELL, H.J.; HENSON, P.M. Y HSU, L.S. (1974). The ability of chemotactic factors to induce lysosomal enzyme release. I. The characteristics of the release, the importance of surfaces and the relation of enzyme release to chemotactic responsiveness. *J. Immunol.* 112: 2047-2054.
- BECKER, S.; MEUER, S.; HADDING, U. Y BITTER-SUERMAN, D. (1978). Platelet activation: a new biological activity of guinea-pig C3a anaphylatoxin. *Scand. J. Immunol.* 7: 173-180.



BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

BRECKENRIDGE, R.T.; ROSENFELD, S.I.; GRAFF, K.S. Y LEDDY, J.P. (1977). Hereditary C5 deficiency in man. III. Studies of hemostasis and platelet responses to zymosan. *J. Immunol.* 118: 12-16.

CANNISTRACI, C.; PAROLA, I.L.; RIGANO, R.; BASSETTI, F.; ORTONA, E.; SANTUCCI, B.; PICARDO, M. Y SIRACUSANO, S. (2003). Acute generalized exanthematous pustulosis in cystic echinococcosis: immunological characterization. *Br. J. Dermatol.* 148: 1245-1249.

CHAUDHURI, G. Y CHANG, K.P. (1988). Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 27: 43-52.

CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; LASURE, A.; VAN POEL, B.; PIETERS, L.; VANDEN BERGHE, D.; VLIETINCK, A.; KAMBU, K. Y TONA, L. (1995). In vitro anticomplementary activity of constituents from *Morinda morindoides*. *J. Nat. Prod.* 58: 372-378.

CIMANGA, K.; DE BRUYNE, T.; APERS, S.; PIETERS, L.; TOTTÉ, J.; KAMBU, K.; TONA, L.; BAKANA, P.; QUARLES VAN UFFORD, L.; BEUKELMAN, C.; LABADIE, R. Y VLIETINCK, A.J. (1999). Complement-inhibiting constituents of *Bridelia ferruginea* stem bark. *Planta Med.* 65: 213-217.

COOPER, N.R. (1991). Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol. Today* 12: 327-331.

DA SILVA, R.P.; HALL, B.F.; JOINER, K.A. Y SACKS, D.L. (1989). CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* 143: 617-622.

DAVIS, A.E. 3RD (1988). C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 595-628.

DEARDORFF, T.L.; KLIKS, M.M.; ROSENFELD, M.E.; RYCHLINSKI, R.A. Y DESOWITZ, R.S. (1982). Larval ascaridoid nematodes from fishes near the Hawaiian Islands, with comments on pathogenicity experiments. *Pacific Sci.* 36: 187-201.

DEMIRCI, M.; YILDIRIM, M.; ARIDOGAN, B.C.; BAYSAL, V. Y KORKMAZ, M. (2003). Tissue parasites in patients with chronic urticaria. *J. Dermatol.* 30: 777-781.

DENG, J.; GOLD, D.; LOVERDE, P.T. Y FISHELSON, Z. (2003). Inhibition of the complement membrane attack complex by *Schistosoma mansoni* paramyosin. *Infect. Immun.* 71: 6402-6410.



DIAS DA SILVA, W. Y LEPOW, I.H. (1967). Complement as a mediator of inflammation. II. Biological properties of anaphylatoxin prepared with purified components of human complement. *J. Exp. Med.* 125: 921-946.

DUFFUS, W.P.H. Y FRANKS, D. (1980). In vitro effect of immune serum and bovine granulocytes on juvenile *Fasciola hepatica*. *Clin. Exp. Immunol.* 41: 430-440.

ELFVIN, M.; LEVINE, R.J. Y DEWEY, M.M. (1976). Paramyosin in invertebrate muscles. I. Identification and localization. *J. Cell. Biol.* 71: 261-272.

FERRANTE, A. Y ALLISON, A.C. (1983). Alternative pathway activation of complement by African trypanosomes lacking a glycoprotein coat. *Parasite Immunol.* 5: 491-498.

FISHELSON, Z. (1994). Complement-related proteins in pathogenic organisms. *Springer Semin. Immunopathol.* 15: 345-368.

FRANK, M.M. Y FRIES, L.F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol. Today* 12: 322-326.

FRITZINGER, D.C.; BREDEHORST, R. Y VOGEL, C.W. (1994). Molecular cloning and derived primary structure of cobra venom factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12775-12779.

GOLDSTEIN, I.M. (1988). Inflammation: Basic principles and clinical correlates. En *Inflammation*. (Gallin, J.I., Goldstein, I.M., Synderman, R., Eds.), pp. 55-74. Raven Press, New York.

HADDING, U.; HARTUNG, H.P.; RASOKAT, H. Y GEMSA, D. (1982). Peritoneal macrophages release prostaglandin E and thromboxane B2 in response to C3b. *Adv. Exp. Med. Biol.* 155: 531-534.

HALKES, S.B.A.; BEUKELMAN, C.J.; KROES, B.H.; VAN DEN BERG, A.J.J.; VAN DIJK, H. Y LABADIE, R.P. (1997). A strong complement inhibitor from flowers of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 2: 79-82.

HARTUNG, H.P.; BITTER-SUERMAN, D. Y HADDING, U. (1983). Induction of thromboxane release from macrophages by anaphylatoxic peptide C3a of complement and synthetic hexapeptide C3a 72-77. *J. Immunol.* 130: 1345-1349.

HERMOSO, T.; FISHELSON, Z.; BECKER, S.I.; HIRSCHBERG, K. Y JAFFE, C.L. (1991). Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *EMBO J.* 10: 4061-4067.

HUMBERT, P.; NIEZBORALA, M.; SALEMBIER, R.; AUBIN, F.; PIARROUX, R.; BUCHET, S. Y BARALE, T. (2000). Skin manifestations associated with toxocariasis: a case-control study. *Dermatology* 201: 230-234.



IIDA, K.; WHITLOW, M.B. Y NUSSENZWEIG, V. (1989). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* escape destruction by the terminal complement components. *J. Exp. Med.* 169: 881-891.

INAL, J.M. Y SIM, R.B. (2000). A *Schistosoma* protein, Sh-TOR, is a novel inhibitor of complement which binds human C2. *FEBS Lett.* 470: 131-134.

IRIGOIN, F.; WURZNER, R.; SIM, R.B. Y FERREIRA, A.M. (1996). Comparison of complement activation in vitro by different *Echinococcus granulosus* extracts. *Parasite Immunol.* 18: 371-375.

ISHIKURA, H.; KIKUCHI, K.; NAGASAWA, K.; OOIWA, T.; TAKAMIYA, H.; SATO, N. Y SUGANE, K. (1993). Anisakidae and anisakidosis. *Prog. Clin. Parasitol.* 3: 43-102.

JEONG, S.C.; YANG, B.K.; RA, K.S.; WILSON, M.A.; CHO, Y.; GU, Y.A. Y SONG, C.H. (2004). Characteristics of anti-complementary biopolymer extracted from *Coriolus versicolor*. *Carbohydrate Polymers* 55: 255-263.

JOINER, K.A. (1988). Complement evasion by bacteria and parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 42: 201-230.

JOKIRANTA, T.S.; JOKIPII, L. Y MERI, S. (1995). Complement resistance of parasites. *Scand. J. Immunol.* 42: 9-20.

KAPIL, A. Y MOZA, N. (1992). Anticomplementary activity of boswellic acids -an inhibitor of C3-convertase of the classical complement pathway. *Int. J. Immunopharmacol.* 14: 1139-1143.

KASUYA, S.; HAMANO, H. Y IZUMI, S. (1990). Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet.* 335: 665.

KENNEDY, M.W.; TIERNEY, J.; YE, P.; MCMONAGLE, F.A.; MCINTOSH, A.; MCLAUGHLIN, D. Y SMITH, J.W. (1988). The secreted and somatic antigens of the third stage larva of *Anisakis simplex*, and antigenic relationship with *Ascaris suum*, *Ascaris lumbricoides*, and *Toxocara canis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31: 35-46.

KIPNIS, T.L.; DAVID, J.R.; ALPER, C.A.; SHER, A. Y DA SILVA, W.D. (1981). Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 602-605.

KLERX, J.P.; BEUKELMAN, C.J.; VAN DIJK, H. Y WILLERS, J.M. (1983). Microassay for colorimetric estimation of complement activity in guinea pig, human and mouse serum. *J. Immunol. Methods* 63: 215-220.

KOTWAL, G.J. (1996). The great escape: immune evasion by pathogens. *Immunologist* 4: 157-164.



KROES, B.H.; BEUKELMAN, C.J.; VAN DEN BERG, A.J.J.; WOLBINK, G.J.; VAN DIJK, H. Y LABADIE, R.P. (1997). Inhibition of human complement by β -glycyrrhetic acid. *Immunology* 90: 115-120.

LACLETTE, J.P.; SHOEMAKER, C.B.; RICHTER, D.; ARCOS, L.; PANTE, N.; COHEN, C.; BING, D. Y NICHOLSON-WELLER, A. (1992). Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148: 124-128.

LÓPEZ-SAEZ, M.P.; ZUBELDIA, J.M.; CALOTO, M.; OLALDE, S.; PELTA, R.; RUBIO, M. Y BAEZA, M.L. (2003). Is *Anisakis simplex* responsible for chronic urticaria? *Allergy Asthma Proc.* 24: 339-345.

LOUKAS, A.; JONES, M.K.; KING, L.T.; BRINDLEY, P.J. Y MCMANUS, D.P. (2001). Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. *Infect. Immun.* 69: 3646-3651.

LOUREDO, A.; ACEDO, F.; ARRIBAS, V.; SANZ, E.; BERNARDO, L. Y GOYANES, A. (1997). Anisakidosis del colon como causa de abdomen agudo. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 89: 403-406.

MALHOTRA, R.; WILLIS, A.C.; JENSENIUS, J.C.; JACKSON, J. Y SIM, R.B. (1993). Structure and homology of human C1q receptor (collectin receptor). *Immunology* 78, 341-348.

MALY, F.E.; KAPP, A. Y ROTHER, U. (1983). C5a-induced chemiluminescence of human granulocytes and its amplification by a serum factor. *Immunobiology* 164: 90-97.

MARIKOVSKY, M.; LEVI-SCHAFFER, F.; ARNON, R. Y FISHELSON, Z. (1986). *Shistosoma mansoni*: killing of transformed schistosomula by the alternative pathway of human complement. *Exp. Parasitol.* 61: 86-94.

MARIKOVSKY, M.; PARIZADE, M.; ARNON, R. Y FISHELSON, Z. (1990). Complement regulation on the surface of cultured schistosomula and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 20: 221-227.

MAYER, M.M. (1961). Complement and complement fixation. En *Experimental immunochemistry*. (Kabat, E.A., Mayer, M.M. Illinois; Charles C., Eds.), pp. 133-240. Thomas Publisher, Springfield.

MCLAREN, D.J. (1984). Disguise as an evasive stratagem of parasitic organisms. *Parasitology* 88: 597-611.

MCLAREN, D.J. Y HOCKLEY, D.J. (1977). Blood flukes have a double outer membrane. *Nature* 269: 147-149.

MOEN, O.; HOGASEN, K.; FOSSE, E.; DREGELID, E.; BROCKMEIER, V.; VENGE, P.; HARBOE, M. Y MOLLNES, T.E. (1997). Attenuation of changes in leukocyte surface markers and complement activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Annu. Thorac. Surg.* 63: 105-111.



MUHLSCHEGEL, F.; SYGULLA, L.; FROSC, P.; MASSETTI, P. Y FROSC, M. (1993). Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol. Res.* 79: 660-666.

NASCIMENTO, M.S.J.; CIDADE, H.; PINTO, M.M. Y KIJJOA, A. (1997). Anticomplementary activity of prenylated flavones from *Artocarpus elasticus*. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 2: 135-137.

NASCIMENTO, M.S.J.; PINTO, M.M.; VIEIRA, L.M.; KIJJOA, A.; SILVA, A.M.S.; KROES, B.H. Y LABADIE, R.P. (1998). Anticomplementary activity of dolabranes from *Endospermum diadenum*. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 8: 93-96.

NUNES, A.C.; ALMEIDA-CAMPOS, F.R.; HORTA, M.F. Y RAMALHO-PINTO, F.J. (1997). *Leishmania amazonensis* promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology* 115: 601-609.

OSHIMA, T. Y KLIKS, M. (1987). Effects of marine mammal parasites on human health. *Int. J. Parasitol.* 17: 415-421.

PATTHY, L. (1990). Evolution of blood coagulation and fibrinolysis. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1: 153-166.

PÉREZ-PÉREZ, J.; FERNÁNDEZ-CALDAS, E.; MARAÑÓN, F.; SASTRE, J.; BERNAL, M.L.; RODRÍGUEZ, J. Y BEDATE, C.A. (2000). Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123: 120-129.

PERTEGUER, M.J.; RAPOSO, R. Y CUÉLLAR, C. (1996). In vitro study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extract from *Anisakis simplex* on blood coagulation. *Int. J. Parasitol.* 26: 105-108.

PETITHORY, J.C. Y MARTY, B. (1988). L'anisakiase en France. *Lett. Infectiol.* 3: 96-99.

PINTO, M. Y NASCIMENTO, M.S.J. (1997). Anticomplementary activity of hydroxy- and methoxyxanthenes. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 2: 125-127.

POLLEY, M.J. Y NACHMAN, R.L. (1979). Human complement in thrombin-mediated platelet function: uptake of the C5b-9 complex. *J. Exp. Med.* 150: 633-645.

DEL POZO, V.; ARRIETA, I.; TUÑÓN, T.; CORTEGANO, I.; GÓMEZ, B.; CÁRDABA, B.; GALLARDO, S.; ROJO, M.; RENEDO, G.; PALOMINO, P.; TABAR, A.I. Y LAHOZ, C. (1999). Immunopathogenesis of human gastrointestinal infection by *Anisakis simplex*. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104: 637-643.

PUNTES, S.M.; SACKS, D.L.; DA SILVA, R.P. Y JOINER, K.A. (1988). Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 167: 887-902.



PUNTES, S.M.; DWYER, D.M.; BATES, P.A. Y JOINER, K.A. (1989). Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* 143: 3743-3749.

PUNTES, S.M.; DA SILVA, R.P.; SACKS, D.L.; HAMMER, C.H. Y JOINER, K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* 145: 4311-4316.

REED, S.L.; KEENE, W.E.; MCKERROW, J.H. Y GIGLI, I. (1989). Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 143: 189-195.

REED, S.L.; EMBER, J.A.; HERDMAN, D.S.; DISCIPIO, R.G.; HUGLI, T.E. Y GIGLI, I. (1995). The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155: 266-274.

RIMOLDI, M.T.; TENNER, A.J.; BOBAK, D.A. Y JOINER, K.A. (1989). Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J. Clin. Invest.* 84: 1982-1989.

RUSSELL, D.G. Y TALAMAS-ROHANA, P. (1989). *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol. Today* 10: 328-333.

SAKANARI, J.A. Y MCKERROW, J.H. (1989). Anisakiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 278-284.

SAKANARI, J.A. Y MCKERROW, J.H. (1990). Identification of the secreted neutral proteases from *Anisakis simplex*. *J. Parasitol.* 76: 625-630.

SAKANARI, J.A.; STAUNTON, C.E.; EAKIN, A.E.; CRAIK, C.S. Y MCKERROW, J.H. (1989). Serine proteases from nematode and protozoan parasites: isolation of sequence homologs using generic molecular probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4863-4867.

SCHINDLER, R.; GELFAND, J.A. Y DINARELLO, C.A. (1990). Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor: translational signal provided by lipopolysaccharide or IL-1 itself. *Blood* 76: 1631-1638.

SEKIJIMA, Y.; FUJIKURA, Y.; HIYAMA, T.; MAENAKA, T. Y UDA, A. (2001). Isolation and characterization of a human alternative complement pathway-inhibiting protein from larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* 25: 89-100.

SHUSTOV, A.V.; KOTELKIN, A.T.; SOROKIN, A.V.; TERNOVOI, V.A. Y LOKTEV, V.B. (2002). The *Opisthorchis felinus* paramyosin: cDNA sequence and characterization of its recombinant fragment. *Parasitol. Res.* 88: 724-730.

SMITH, J.W. Y WOOTTEN, R. (1978). *Anisakis* and anisakiasis. *Adv. Parasitol.* 16: 93-163.



SUZUKI, T.; SHIRAKI, T.; SEKINO, M.; OTSURU, M. Y ISHIKURA, H. (1970). Studies on the immunological diagnosis of anisakiasis. III. Intradermal test with purified antigen. *Jpn. J. Parasitol.* 19: 1-9.

SUZUKI, T.; ISHIDA, K.; ISHIGAOKA, S.; DOI, K.; OTSURU, M.; SATO, Y.; ASAISHI, K. Y NISHINO, T. (1975). Studies on the immunological diagnosis of anisakiasis. V. Intradermal and indirect hemagglutination tests, and histopathological examination of biopsied mucous membranes on gastric anisakiasis. *Jpn. J. Parasitol.* 24: 184-191.

TALLARIDA, R.J. Y MURRAY, R.B. (1987). Manual of pharmacological calculations with computer programs. 2nd Ed., Springer Verlag, New York.

TANAKA, J. Y TORISU, M. (1978). *Anisakis* and eosinophil. I. Detection of a soluble factor selectively chemotactic for eosinophils in the extract from *Anisakis* larvae. *J. Immunol.* 120: 745-749.

TONEY, D.M. Y MARCIANO-CABRAL, F. (1994). Membrane vesiculation of *Naegleria fowleri* amoebae as a mechanism for resisting complement damage. *J. Immunol.* 152: 2952-2959.

VOGEL, C.W. Y MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1982). The cobra venom factor-dependent C3 convertase of human complement. A kinetic and thermodynamic analysis of a protease acting on its natural high molecular weight substrate. *J. Biol. Chem.* 257: 8292-8299.

WARD, P.A., HUGLI, T.E., CHENOWETH, D.E. (1979). Complement and chemotaxis. En Handbook of inflammation, vol. 1. (Weissmann, G., Ed.), pp. 153-178. Elsevier-North-Holland, Amsterdam.

WHITE, A.C. JR.; ROBINSON, P. Y KUHN, R. (1992). Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Agents Dis.* 1: 185-193.

WHITE, A.C. JR.; TATO, P. Y MOLINARI, J.L. (1997). *Taenia solium* cysticercosis: host parasite interactions and the immune response. *Chem. Immunol.* 66: 209-230.

WILLIAMS, T.J. Y JOSE, P.J. (1981). Mediation of increased vascular permeability after complement activation. Histamine-independent action of rabbit C5a. *J. Exp. Med.* 153: 136-153.

YAMADA, H.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.C. Y OTSUKA, Y. (1985). Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*. Characterization of an anti-complementary arabinogalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. *Mol. Immunol.* 22: 295-304.

YAMAKAMI, K.; HAMAJIMA, F.; AKAO, S. Y TADAKUMA, T. (1995). Purification and characterization of acid cysteine protease from metacercariae of the mammalian trematode parasite *Paragonimus westermani*. *Eur. J. Biochem.* 233: 490-497.