



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN



## FALLA DE ORIGEN

CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS  
MONOCLONALES QUE RECONOCEN ANTIGENOS  
DEL ESTADIO ADULTO DE Taenia solium

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MAYRA YOLANDA CRUZ RIVERA

ASESORES: M. en IBB. JAVIER AMBROSIO HERNANDEZ  
BIOL. YOLANDA MEDINA FLORES



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



Programa de  
Exámenes Profesionales

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de Tesis: Caracterización de Anticuerpos Monoclonales que reconocen antígenos del estadio adulto de Taenia solium

que presenta la pasante: Mayra Yolanda Cruz Rivera  
con número de cuenta: 9057015-7 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 22 de Agosto de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Pablo Martínez Labat

VOCAL Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz

SECRETARIO M. en I.B.B. Javier R. Ambrosio Hernández

1er. SUPLENTE M.V.Z. Ansel G. Martínez Sosa

2do. SUPLENTE M. en C. Susana E. Mendoza Elvira

Esta tesis fue realizada bajo la dirección y asesoría del M.en I.B.B, Javier Ambrosio Hernández y de la Biol. Yolanda Medina en el Laboratorio de la Dra. Ana Flisser. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante el desarrollo del presente trabajo, la tesista fue becada, bajo el proyecto No. IN209994. DGAPA. UNAM. Dependencia a la cual agradezco el apoyo brindado.

## DEDICATORIA

A mis padres **Yolanda y Fernando** con admiración y respeto, por creer en mí, brindarme siempre una sonrisa, su apoyo y su cariño.

A mis hermanos **Fernando, Julio, Ricardo y Gerardo**, porque a su lado, mi vida siempre ha estado llena de sorpresas, muchas alegrías y uno que otro "cariñito".

A **Gilberto** por ser alguien tan importante en mi vida y compartir este logro junto a mí.

A mi tío **Jorge** por ser siempre un ejemplo de superación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Flisser por brindarme la oportunidad de formar parte de su Laboratorio.

A la Biol. Yolanda Medina y al M.en I.B.B Javier Ambrosio por depositar este proyecto en mis manos.

Al M.en C. Agustín Plancarte y a la M.en C. Guillermina Ávila por el apoyo y sugerencias brindadas durante el proyecto.

A todos mis amigos y compañeros de Laboratorio "gracias por soportarme".

Al Laboratorio de Inmunoparasitología del INDRE, por el apoyo proporcionado bajo los proyectos: PNUD INDRE MEX-93-007-01 y OPS (Desarrollo y Tecnología Moderna para el Diagnóstico de Teniasis y Cisticercosis por *T. solium*). Así como al PUIS bajo el proyecto establecido entre la UNAM y el INDRE "Desarrollo Tecnológico para el Diagnóstico de la Teniasis humana y de la Cisticercosis humana y porcina".

Agradezco la revisión de esta tesis a mis sinodales:

- \* M.V.Z Pablo Martínez Labat
- \* Q.B.P Judith Martínez Zamitiz
- \* M. en I.B.B Javier Ambrosio Hernández
- \* M.V.Z Angel G. Martínez Sosa
- \* M en C. Susana E. Mendoza Elvira

así como a:

- \* M en I.B.B Dolores Correa Beltrán
- \* Biol. Yolanda Medina Flores

# INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	II
GLOSARIO.....	III
RESUMEN.....	IV
<b>I INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades.....	1
1.2 Morfología.....	2
1.3 Ciclo de Vida.....	4
1.4 Aspectos Clínicos.....	7
1.5 Epidemiología.....	8
1.6 Diagnóstico.....	9
1.7 Anticuerpos Monoclonales.....	10
1.8 Caracterización.....	13
<b>II HIPOTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>III OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>IV METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Modelo experimental de teniasis.</i>	
4.1.1. Preparación de los animales.....	17
4.1.2. Infección e inmunosupresión.....	17
4.2 <i>Preparación de material antigénico.</i>	
4.2.1. Extracto crudo de adultos de <i>T. solium</i> .....	18
4.2.2. Productos de liberación de tenias cultivadas <i>in vitro</i> .....	19
4.2.3. Extracto crudo de metacístodos de <i>T. solium</i> .....	19
4.2.4. Productos secretados en cultivo <i>in vitro</i> de cisticercos de <i>T. solium</i> .....	20
4.3 <i>Preparación de anticuerpos monoclonales.</i>	
4.3.1. Anticuerpos monoclonales en contra de extractos crudos de tenias adultas recuperadas de hámsteres.....	21
4.3.2. Anticuerpos monoclonales contra productos secretados en cultivo <i>in vitro</i> de cisticercos de <i>T. solium</i> .....	23

<b>4.4</b>	<b>Ensayos inmunoquímicos de los ACM 4B3 y 8D.</b>	
4.4.1.	Determinación de clase y subclase.....	25
4.4.2.	Determinación de la especificidad de los ACM hacia diferentes antígenos parasitarios.....	26
4.4.3	Determinación del reconocimiento de los ACM hacia diferentes fracciones antigénicas.....	27
4.4.4.	Determinación del reconocimiento de 4B3 a antígenos liberados en las heces de hámsteres infectados experimentalmente.....	28
<b>4.5</b>	<b>Ensayos inmunohistoquímicos para el reconocimiento de 4B3 y 8D.</b>	
4.5.1.	Determinación del reconocimiento a tejidos de cisticercos de <i>T. solium</i> .....	29
4.5.2.	Determinación del reconocimiento a tejidos de adultos de <i>T. solium</i> recuperadas de hámster.....	30
<b>V</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Selección de los ACM que reconocen antígenos de extractos crudos de adultos de <i>T. solium</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>5.2</b>	<b>Ensayos inmunoquímicos</b>	
5.2.1.	Determinación de clase y subclase.....	31
5.2.2.	Determinación de especificidad hacia diferentes antígenos parasitarios.....	31
5.2.3.	Determinación del reconocimiento hacia diferentes fracciones antigénicas.....	35
5.2.4.	Determinación del reconocimiento de 4B3 a antígenos liberados en las heces de hámsteres infectados experimentalmente.....	37
<b>5.3</b>	<b>Ensayos inmunohistoquímicos.</b>	
5.3.1.	Determinación del reconocimiento a tejidos de cisticercos de <i>T. solium</i> .....	37
5.3.2.	Determinación del reconocimiento a tejidos de adultos de <i>T. solium</i> recuperadas de hámsteres infectados.....	41

<b>VI</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>VII</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>VIII</b>	<b>APENDICE.....</b>	<b>58</b>
	8.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	58
	8.2 Tinción con Azul de Coomasie.....	59
	8.3 Tinción con Nitrato de Plata.....	60
	8.4 Tinción con Rojo de Ponceu S.....	62
	8.5 Inducción de líquido de ascitis.....	63
<b>IX</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>64</b>



## INDICE DE FIGURAS

II

1.	Fase adulta de <i>Taenia solium</i> .....	3
2.	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .....	6
3.	Producción de Anticuerpos monoclonales.....	12
4.	Selección de AcM que reconocen a extractos crudos de adultos de <i>T. solium</i> .....	32
5.	Determinación de Clase y Subclase de los AcM 4B3 y 8D.....	33
6.	Determinación de Especificidad de los AcM 4B3 y 8D frente a diferentes antígenos parasitarios.....	34
7.	Análisis por IET del reconocimiento del AcM 4B3..	36
8.	Análisis por IET del reconocimiento del AcM 8D...	38
9.	Inmunoensayo en punto del reconocimiento del AcM 4B3 a coproantígenos.....	39
10.	Mosaico del reconocimiento de 4B3 a un corte de cisticerco (10X).....	40
11.	Reconocimiento del AcM 4B3 en cisticerco(60X)....	42
12.	Reconocimiento del AcM 8D en cisticerco (60X)....	43
13.	Reconocimiento del AcM 4B3 en tenia adulta (escólex) 10X.....	44
14.	Reconocimiento del AcM 4B3 en tenia adulta (ventosas y cuello) 10X y 60 X.....	46
15.	Reconocimiento del AcM 4B3 en tenia adulta (proglótidos) 10X y 60 X.....	47

## GLOSARIO

<b>4B3</b>	AcM en contra de extracto crudo de adultos de <i>T. solium</i> recuperados de hámster.
<b>8D</b>	AcM en contra de productos de liberación de cisticercos de <i>T. solium</i> .
<b>A.suum</b>	Extracto crudo de <i>Ascaris suum</i> .
<b>Ac</b>	Anticuerpo
<b>ACF</b>	Adyuvante completo de Freund
<b>AIF</b>	Adyuvante incompleto de Freund
<b>AcM</b>	Anticuerpo monoclonal
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>Ag8</b>	Mieloma X63/Ag8.653 utilizado en la producción de los AcM 4B3 y 8D.
<b>AgB</b>	Antígeno B
<b>BSA</b>	Albúmina Sérica Bovina
<b>C</b>	Extracto crudo de cisticercos de <i>T. solium</i>
<b>C.tae.</b>	Extracto crudo de cisticercos de <i>Taenia taeniaeformis</i>
<b>CE</b>	Canal espiral
<b>DAB</b>	Diamino Benzidina
<b>D.O</b>	Densidad Óptica
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoenzimático, del inglés "Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
<b>F.hep</b>	Extracto crudo de <i>Fasciola hepática</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>HAT</b>	Hipoxantina, Aminopterina, Timidina
<b>IET</b>	Inmunoelectrotransferencia
<b>IFA</b>	Inmunofluorescencia
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>kDa</b>	kilo Daltones
<b>L.mex</b>	Antígeno de <i>Leishmania mexicana</i>
<b>M.hir</b>	Extracto crudo de <i>Macracanthorhynchus hirudinaceus</i>
<b>NC</b>	Nitrocelulosa
<b>OPD</b>	Orto-Fenilendiamina
<b>PAGE-SDS</b>	Electroforesis en geles de poli(acrilamida), en presencia de dodecil sulfato de sodio
<b>P.M</b>	Peso molecular
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PLC</b>	Productos de liberación de cisticercos de <i>T. solium</i>
<b>PLTha</b>	Productos de liberación de adultos de <i>T. solium</i> recuperados de hámster

**PMCB** Sal sódica de p-hidroximercuribenzoato  
**PMSF** Fenil metilsulfonilfluoruro  
**RIA** Radio Inmuno Ensayo  
**SFB** Suero fetal Bovino  
**SSAF** Solución salina amortiguada con fosfatos  
**Tha** Extracto crudo de adultos de *T.solium* de hámster  
**Thu** Extracto crudo de adultos de *T.solium* de humano  
**TLCK** N-a-p-tosil-L-lisina clorometil cetona  
**TPCK** N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona  
**T.sag** Extracto crudo de *Taenia saginata*  
**T.solium** *Taenia solium*  
**T.spir** Extracto crudo de *Trichinella spiralis*  
**T.tae** Extracto crudo de adultos de *Taenia taeniaeformis*

El estudio de la fase adulta de *T. solium*, utilizando tecnología de vanguardia, podría tener repercusión en el diagnóstico y posiblemente en el control de ésta parasitosis. El mayor impacto conseguido con el estudio de la teniosis, podría reflejarse en la cisticercosis que es la forma parasitaria de *T. solium* más dañina para el ser humano. Una de las tecnologías de vanguardia podría ser el empleo de anticuerpos monoclonales (AcM). En el presente trabajo de tesis se realizó la caracterización de dos AcM preparados en contra de antígenos de diferentes estadios parasitarios de *T. solium*. Se inmunizaron ratones de la cepa Balb/c con extractos crudos de tenias recuperadas del intestino de hámsteres inmunosuprimidos e infectados experimentalmente (0.2µg) y con productos liberados por cisticercos mantenidos en cultivo *in vitro* durante 24 hrs (80 µg). La preparación de los AcM se hizo por la fusión de células de bazo de los ratones inmunizados con el mieloma murino X63/Ag8.653, en presencia de polietilenglicol. La caracterización de la clase y subclase de anticuerpos, obtenidos mostró que eran IgG1. La especificidad de estos anticuerpos analizada por ELISA, en contra de diferentes antígenos homólogos y heterólogos, mostró que 4B3 reconoció principalmente a los taenidos y 8D resultó ser específico de especie. El análisis del reconocimiento de los AcM a fracciones antigénicas obtenidas posterior a electroforesis en geles de acrilamida e inmunoelectrotransferencia, a membrana de NC, mostró que en el caso del AcM contra tenia adulta (4B3) había mayor reacción hacia una fracción mayor a 206 kDa en todos los antígenos

analizados, así como a otra de aproximadamente 105 kDa. En el caso del AcM preparado contra productos liberados por cisticercos (8D) hubo reconocimiento hacia dos bandas (103 y 115 kDa) en los antígenos de tenias de origen humano. En contra de extracto crudo de cisticercos hubo reacción hacia a un mayor número de fracciones antigénicas (5-7) situadas entre 101 y 8.9 kDa. Los antígenos reconocidos por 4B3 también fueron detectados por Inmunopunto en sobrenadantes de heces de hámsteres infectados, resultado que tuvo correlación con lo reconocido por 4B3 a productos liberados en cultivo *in vitro* de tenias recuperadas de hámsteres. En los ensayos inmunocitoquímicos con criocortes de parásitos adultos y metacéstodos, mostraron que 4B3 reconoció antígenos a nivel de fibras musculares, las cuales aparentemente tienen una diferente disposición dependiendo del estadio parasitario. El AcM 8D solo reconoció antígenos a nivel de espacio intersticial de los cisticercos. Los resultados del análisis inmunocitoquímico por 4B3 y lo obtenido por IET en relación a la fracción antigénica situada en 105 kDa, sugiere que en ambos estadios parasitarios hay reconocimiento a la paramiosina o AgB. En el caso de lo analizado para la fracción mayor a 206 kDa, la localización y el peso molecular de esta fracción, sugiere el reconocimiento hacia algún tipo de miosina parasitaria. Es posible que el AcM 4B3 haya reaccionado con epítopos comunes presentes en ambas proteínas, así como en los estadios parasitarios estudiados. En el caso del AcM 8D no fue posible establecer el epítipo reconocido, ni su localización a nivel de tejido parasitario del adulto.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades.

*Taenia solium* es un parásito céstodo hermafrodita, el cual provoca dos tipos de enfermedad. Una es causada en el hombre, como hospedero definitivo y se denomina teniosis, la otra es causada en el hombre como hospedero accidental, y en el cerdo como hospedero intermediario y se denomina cisticercosis. Este céstodo hermafrodita se alimenta del intestino del hospedero por carecer de aparato digestivo propio, la captación y asimilación de alimento se lleva a cabo a través del sincicio celular del tegumento el cual absorbe por difusión o transporte activo y probablemente también por endocitosis a las moléculas orgánicas de bajo peso molecular (71). La clasificación taxonómica ha sido establecida como sigue (72):

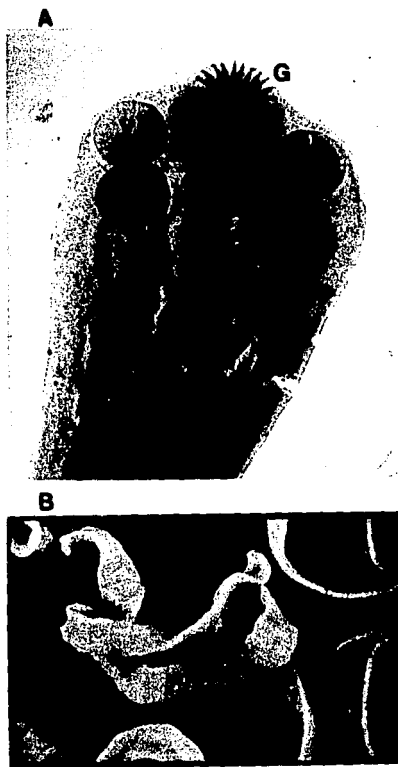
PHYLUM      Platyhelminthes  
 CLASE        Eucestoda  
 ORDEN        Taeniidea  
 FAMILIA      Taeniidae  
 GENERO        Taenia  
 ESPECIE      *Taenia solium*  
                   (Linnaeus, 1758)

Los temas tratados a lo largo de esta introducción estarán enfocados principalmente hacia la teniosis, ya que la caracterización de los AcM presentados en esta tesis, forma parte de un proyecto encaminado a mejorar el diagnóstico de esta parasitosis.

## 1.2 Morfología.

El adulto de *Taenia solium* es un gusano blanquecino que puede alcanzar hasta 8 metros de largo (Figura 1.B). Su unión al tubo digestivo es a través de un órgano de fijación conocido como escólex, en donde se ha descrito que se encuentra el ganglio nervioso del parásito y dos tipos de estructuras diferentes, que le sirven para fijarse al intestino: una es la doble corona de ganchos y otra la constituyen 4 ventosas. (Figura 1.A) Posterior al escólex se presenta un adelgazamiento que da origen a la segunda región denominada cuello, la cual es un área no segmentada y poco diferenciada, que corresponde a la porción germinal de donde se origina la tercera porción denominada estróbilo (8). El estróbilo constituye la mayor parte del cuerpo de gusano y está formado por una cadena de 800 a 1000 segmentos pequeños llamados proglótidos. Estos segmentos dependiendo de su cercanía al cuello pueden ser de tres tipos: inmaduros, maduros y grávidos. Los proglótidos más jóvenes e inmaduros, se encuentran cercanos al cuello, mientras que los más lejanos corresponden a los maduros y que una vez grávidos contienen miles de huevos. Cada proglótido maduro es un órgano de reproducción independiente en donde ocurre la fecundación y la reproducción de embriones por lo que contiene a los huevos, los cuales pueden alcanzar un número aproximado de 50,000 por proglótido, en distintos grados de madurez (32).

Los huevos de *T. solium* miden de 30 a 40  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen varias envolturas que le permiten al embrión hexacanto sobrevivir en el medio ambiente (36).



3

**Figura 1. Fase adulta de *Taenia solium*. A) Escólex visto al microscopio de luz (10x) de una tenia recuperada de una infección experimental en hámster (Tomada de Aguilar, 1994). G: doble corona de ganchos, V: ventosas, C: cuello. B) estróbilo de una tenia de origen humano en la que se observan los segmentos correspondientes a los proglótidos (Tomada de Flisser, 1988).**



La oncosfera o embrión hexacanto está formado por un epitelio delgado con extensiones citoplasmáticas, un complejo sistema muscular que opera los tres pares de ganchos, un par de glándulas que le ayudan a penetrar dentro del hospedero, células germinativas a partir de las cuales se desarrollará el siguiente estadio larvario y un sistema nervioso primitivo (71). El huevo es el único estadio del parásito expuesto al medio ambiente; la desecación y las altas temperaturas son factores que disminuyen su sobrevivencia. Sin embargo se sabe que los huevos son resistentes ya que pueden permanecer viables e infectantes en aguas negras, ríos, pasturas por semanas o meses (26).

El cisticerco o metacéstodo de *T. solium* es una vesícula ovalada transparente que mide de 0.5 a 2 cm de diámetro, con un escólex invaginado dentro de la vesícula. Este escólex, al igual que en la tenia adulta, posee cuatro ventosas y un rostelo con doble corona de ganchos en número de 22 a 33 (8).

En los cisticercos la superficie de la pared vesicular está cubierta de microtricas (61), y a través de esta superficie ocurre el intercambio metabólico entre el hospedero intermediario y el parásito, ya que al igual que el adulto, carece de sistema digestivo (43). En los cisticercos de *T. taeniaeformis* las microtricas también le sirven como mecanismo de protección contra la respuesta inmune del hospedero (79).

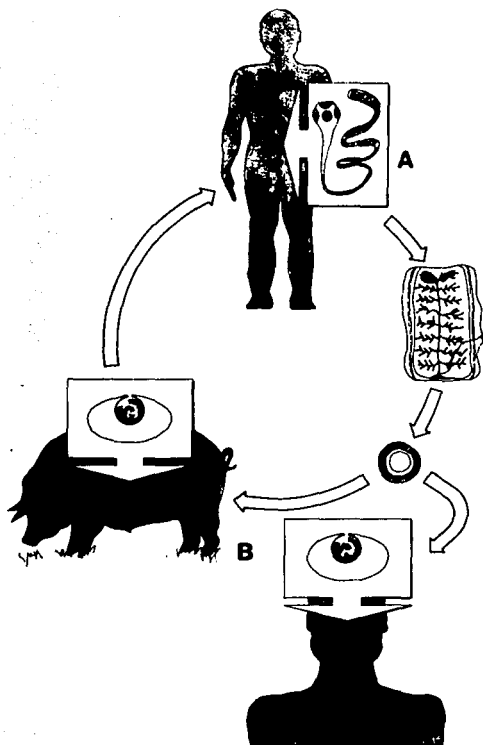
Cuando un cisticerco se establece en el sistema nervioso del ser humano, puede adquirir diferentes formas y tamaños dependiendo de las regiones en que se encuentre (59, 60).

### 1.3 Ciclo de vida. (Figura 2)

Un adulto de *T. solium*, comúnmente llamado solitaria vive por períodos prolongados en el intestino delgado del ser

humano y puede llegar a sobrevivir hasta 25 años. Cuando el parásito ha alcanzado un tamaño promedio de 2.2 m de longitud (aproximadamente 3 o 4 meses después de la infección) se empiezan a desalojar periódicamente uno o más proglótidos grávidos junto con las heces (26). Si el hombre, o el cerdo, ingieren huevos de *T. solium* presentes en los proglótidos grávidos que contaminan la materia fecal humana, desarrollan la cisticercosis. (14, 25). Esto se debe a que los huevos ingeridos eclosionan por acción del jugo gástrico y posteriormente por el jugo intestinal (18). Después de ser digerido y disgregado el cemento que une a los bloques del embrióforo (36), la oncosfera se libera y, con ayuda de sus ganchos, y sus secreciones enzimáticas, penetra a través de la pared intestinal hasta alcanzar capilares linfáticos y sanguíneos por cuya corriente son transportadas a cualquier tejido del organismo, principalmente en el sistema nervioso, músculo esquelético, ojo y tejido subcutáneo, desarrollándose el metacéstodo o cisticerco (23, 67).

El ciclo biológico de *T. solium* se completa cuando el ser humano ingiere carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida, la cual contiene cisticercos vivos (14, 25). Una vez en el estómago los cisticercos viables con su escólex invaginado son activados por las enzimas digestivas pepsina y tripsina, así como las sales biliares, lo que ocasiona la evaginación del escólex. Una vez que el escólex ha evaginado, las ventosas del parásito se fijan a la mucosa intestinal para favorecer que los ganchos se sujeten a la submucosa, y de ésta manera se sujete el parásito y crezca hasta dimensiones importantes (13), esta infección es conocida como teniosis (34).



**Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*.** A) Fase adulta, la tenia se encuentra en el intestino del hospedero definitivo. Cuando la tenia tiene proglótidis grávidos, éstos pueden ser eliminados en las heces y los huevos alcanzan el exterior. B) Fase de metacéstodo. Los huevos ingeridos por el hospedero intermediario (cerdo) o por el hospedero accidental (hombre) se desarrollan a cisticerco. En caso de que el hospedero definitivo consuma carne de cerdo infectada con el cisticerco desarrolla la tenia (Tomado de Aluja y cols, 1987).

#### 1.4 Aspectos clínicos.

La principal manifestación clínica del parasitismo intestinal por *T. solium* es la eliminación de proglótidos en la defecación (10,14). Se desconocen exactamente los síntomas clínicos presentados en la teniosis por *T. solium*, sin embargo para *T. saginata* las manifestaciones pueden consistir en dolor abdominal, anorexia, náusea, indigestión crónica, períodos alternos de diarrea y costipación, síntomas nerviosos de origen tóxico y eosinofilia moderada del 10% al 12% (9). Este cuadro clínico, que también podría presentarse en *T. solium* hace difícil el diagnóstico de teniosis, por ser leve, sin embargo se tienen reportes clínicos en donde *T. saginata* puede causar apendicitis (54), pancreatitis (55), y perforación del intestino delgado (42).

La causa de que la teniosis por *T. solium* de lugar a menos sintomatología, comparada con *T. saginata*, se debe a que los proglótidos son eliminados con menor frecuencia y de manera espontánea, además del menor tamaño y del volumen total, lo cual puede causar menor irritación intestinal. De esta manera puede decirse que la teniosis tiene un curso benigno o es asintomática por lo que la parasitosis puede pasar inadvertida por muchos años (19).

De acuerdo al ciclo de vida, el impacto en la salud de los individuos infectados por teniosis, aparentemente no es un problema serio como enfermedad parasitaria, sin embargo un adulto de *T. solium*, es el agente causal directo de la cisticercosis, lo cual lo hace realmente dañino para la salud de los individuos (14, 25 y 68).

### 1.5 Epidemiología.

La transmisión de *T. solium* entre los diferentes hospederos, es más frecuente e intensa en comunidades rurales, ya que allí el ciclo de vida está asociado a condiciones ambientales favorables, por ejemplo: crianza libre de cerdos con acceso a las heces humanas infectadas, la falta de letrinas y los malos hábitos higiénicos de las personas, de aquí que esta parasitosis esté ligada a condiciones socioeconómicas y culturales bajas (65). Sin embargo también puede presentarse en clases altas debido a la presencia de portadores asintomáticos (68).

Las infecciones por *T. solium*, son endémicas en varios países de Asia, África y América Latina (44,67); México y Brasil son los países más afectados en el continente americano (64) y no obstante, la presencia de esta enfermedad provoca severos daños en la salud pública así como en la economía ganadera (1,8).

En México, Colombia, Perú y Ecuador se han realizado algunos estudios epidemiológicos en comunidades rurales en donde la prevalencia de teniosis oscila entre el 1% a 2%. Aun así, la información epidemiológica de esta parasitosis, es poco precisa ya que las cifras registradas son muy variables y en su mayoría no se notifican los casos. Los datos que se tienen no son precisos, ya que provienen de hallazgos de laboratorio, que emplean metodologías con bajas sensibilidades y especificidades, además no se han hecho estudios longitudinales para la determinación directa de la frecuencia de la teniosis (14,25,68).

Para esto se requiere contar con una metodología precisa que permita obtener una información más certera.

### 1.6. Diagnóstico.

El diagnóstico actual de la teniosis aun está basado en el aplicado desde hace veinte años los cuales son, la observación macroscópica de las deposiciones para buscar próglótidos y exámenes encaminados a la búsqueda de huevos por exámenes coproparasitológicos de concentración o flotación con sales. Estas metodologías solo permiten identificar género, ya que no es posible la diferenciación morfológica de los huevos de *T. solium* y *T. saginata* (10). Además, la eliminación de próglótidos no es cotidiana y las técnicas carecen de especificidad y sensibilidad (68), por lo tanto se requiere de la repetición de los exámenes además del uso de otras técnicas con la finalidad de lograr un mejor diagnóstico (26,74).

Estas causas han motivado la búsqueda de tecnologías más sensibles y específicas basadas en técnicas de vanguardia, con las que sería posible la identificación de individuos portadores de adultos de *T. solium*.

Mediante hibridación *in situ* utilizando sondas de DNA marcadas radiactivamente, ha sido posible la detección de hasta un huevo del parásito así como la diferenciación entre *T. solium* y *T. saginata*, sin embargo, al igual que la técnica coproparasitológica depende de la eliminación de huevos (17,24).

Actualmente ha sido desarrollado un método inmunoenzimático de captura, en el que se ha estandarizado la detección de productos del parásito adulto y que se encuentran liberados en las heces de individuos infectados, este método ha mostrado gran sensibilidad, sin embargo carece de especificidad para diferenciar a *T. solium* de *T. saginata* (5,6,7,9), aun así, la especificidad es buena para descartar

reacciones cruzadas con otras helmintiasis; una de las esperanzas por la aplicación de ésta tecnología es el incremento de su utilidad por producción de anticuerpos monoclonales o sondas de DNA específicas (5,6,17).

### 1.7 Anticuerpos monoclonales

En el caso de la producción de anticuerpos monoclonales (29,35,47) con utilidad en el diagnóstico es posible aumentar la especificidad de los ensayos inmunoenzimáticos (5,6). La ventaja de usar esta tecnología es que con ella se puede hacer la preparación de cantidades ilimitadas de anticuerpos, los cuales son química, física e inmunológicamente homogéneos, ya que cada anticuerpo proviene de células derivadas de una sola clona (Figura 3), (62,73).

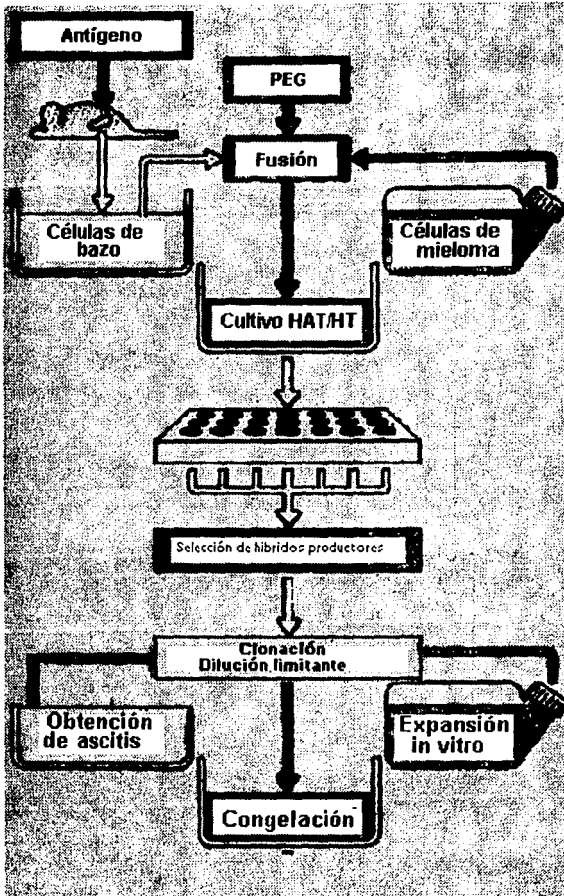
El uso de los anticuerpos monoclonales es muy amplia, ya que también han sido utilizados para la detección de antígenos celulares y solubles en combinación con otros métodos inmunológicos como RIA, (radioinmunoensayo) ELISA, IET e IFA (inmunofluorescencia) (73).

La utilidad de los anticuerpos monoclonales es variada, ya que puede ser aplicada a métodos de diagnóstico como: (73)

- \* Identificación de leucocitos.
- \* Determinación de subgrupos de linfocitos.
- \* Detección viral y subclasificación.
- \* Identificación de parásitos.
- \* Detección de microorganismos.
- \* Determinación de hormonas polipeptídicas.
- \* Detección de proteínas carcinoembrionarias.
- \* Detección de miosina cardiaca para lesión al miocardio.
- \* Tipificación de leucemias y linfomas.

- \* Aplicación inmunohistoquímica en secciones de tejido.
  - o bien pueden ser utilizados como reactivos de terapia para:
    - a) Terapéutica antitumoral.
    - b) Inmunosupresión:
      - Trasplante de órganos.
      - Enfermedades autoinmunitarias e hipersensibilidad.
    - c) Control de la fertilidad
      - Una vez que los anticuerpos monoclonales fueron producidos su caracterización es crucial para determinar su empleo y ella consiste en el análisis inmunoquímico, inmunohistoquímico ó serológico del anticuerpo (48, 63, 76, y 78).





**Figura 3. Producción de Anticuerpos monoclonales.** El diagrama muestra los eventos más importantes de la preparación de los AcM (Modificado de Roitt, 1991). **PEG:** polietilenglicol, **HAT:** hipoxantina, aminopterina y timidina. **HT:** hipoxantina, timidina.

### 1.8 Caracterización.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser caracterizados por técnicas diversas que van desde ensayos de precipitación en gel como la técnica de Ouchterlony (53), ensayos inmunoenzimáticos como el ELISA (52, 58), el Inmunopunto (33), la inmunoelectrotransferencia (IET) (12,77), el radioinmunoensayo (RIA) (66) o por inmunofluorescencia (IFA) directa o indirecta (31). Cada una de estas técnicas tiene ventajas y desventajas, dependiendo del grado de caracterización requerida (31).

El ELISA, o sus variantes, ha tenido amplio uso por la alta sensibilidad y especificidad que brinda (52,58). La IET (12,77), basa su eficacia en el poder resolutivo de la electroforesis en geles de poliacrilamida (21) y su electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa, donde la reacción antígeno-anticuerpo, se dará sobre este tipo de soportes, una de las desventajas de ésta técnica, es que se corre el riesgo de destrucción del antígeno y por lo tanto puede haber reconocimiento de un epítipo probablemente nuevo o diferente del originalmente reconocido por el AcM. Otro problema, es que el reconocimiento del AcM pueda estar dirigido a epítopos de 5 a 10 aminoácidos, y así poder presentarse reacciones cruzadas porque el epítipo es duplicable o muy parecido en otro polipéptido (31).

El empleo de la inmunofluorescencia para la caracterización de anticuerpos monoclonales, tiene más uso como una técnica inmunohistoquímica o citoquímica, en la que hay detección y localización de los antígenos reconocidos en células o tejidos, y la técnica se basa en el empleo de compuestos fluorescentes, acoplados a los anticuerpos (73).

La técnica tiene una aplicación sobre todo por que no es necesario caracterizar el ACM directamente, sino que por el empleo de anticuerpos secundarios (conjugados a compuestos fluorescentes) facilitan los ensayos indirectos que aumentan la señal y de ésta manera sea más fácilmente observable al microscopio de fluorescencia. Los agentes fluorescentes utilizados más frecuentemente son el isotiocianato de fluoresceína (FITC) e isotiocianato de tetrametil rodamina (RITC), FITC, es un fluorocromo que se une con rapidez covalentemente a las proteínas a un pH alcalino, en principio a través del aminoácido lisina y grupos amino terminales. Su absorción máxima es de 490 a 495 nm, y emite su color verde característico a 517 nm, en el caso de RITC, la emisión es en rojo, tiene un máximo de absorción a 550nm y una emisión máxima a 580 nm (73).

Actualmente, en las observaciones de Fluorescencia, se utiliza un sistema de epifluorescencia que emplea un iluminador vertical y un espejo dicroico (57). en este sistema, el haz de excitación se enfoca directo sobre el espécimen de tejido a través del objetivo del lente, la luz fluorescente emitida del espécimen epiluminado, se transmite, entonces al ojo a través del espejo dicroico. Un espejo dicroico permite el paso de luz de longitudes de ondas seleccionadas en una dirección a través de él, pero no en la dirección opuesta. Las ventajas de la observación con epifluorescencia de los fluorocromos es: 1) la fluorescencia se puede combinar con luz transmitida para examen de contraste de fase de los tejidos, permitiendo así una mejor definición de la morfología y fluorescencia y 2) un sistema intercambiable de filtros permite un examen rápido del

espécimen a diferentes longitudes de onda para una tinción doble de fluorocromos, es decir, fluoresceína y rodamina respectivamente; dando como resultado a este sistema una sensibilidad mayor al ensayo (73).

En el presente trabajo de tesis se ha combinado las técnicas descritas con la finalidad de ayudar en la caracterización de los anticuerpos monoclonales seleccionados, utilizando diferentes antígenos y poniendo especial atención al reconocimiento hacia antígenos de metacéstodos y adultos de *T. solium*.

## HIPÓTESIS

La caracterización de AcM, preparados en contra de diferentes antígenos de *T. solium*, permitirá conocer si existen antígenos comunes entre diferentes estadios parasitarios.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

\* Desarrollar y estandarizar técnicas de vanguardia tendientes a mejorar el diagnóstico de la parasitosis por adultos de *Taenia solium*.

### PARTICULARES:

- \* Caracterizar dos anticuerpos monoclonales producidos en contra de antígenos de diferentes estadios de *T. solium*.
- \* Identificar en extractos antigénicos y en productos secretados por parásitos mantenidos en cultivo *in vitro*, las fracciones antigénicas reconocidas por los anticuerpos monoclonales.
- \* Localizar en cortes de tejido parasitario (metacéstodo y adulto) a los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales.

## METODOLOGÍA

### 4.1) Modelo experimental de teniosis.

4.1.1. Preparación de los animales. Se utilizaron hámsteres dorados de 10 semanas de edad, de ambos sexos y con un peso aproximado de 100 g. Previo a la infección experimental todos los animales fueron desparasitados con praziquantel (Cisticid, Merck) a una dosis de 30 mg/Kg por vía oral. Este medicamento fue administrado durante tres días consecutivos previos a la infección. Posterior a la desparasitación y durante la infección inducida, los animales fueron mantenidos en jaulas con camas de aserrín estéril. La alimentación consistió de agua estéril y alimento balanceado comercial para roedores (Laboratory autoclave rodent diet 5010).

4.1.2. Infección e inmunosupresión. La teniosis por *Taenia solium* fue inducida en los hámsteres mediante la administración oral de cisticercos recién recuperados de la carne de un cerdo infectado y por tratamiento con un fármaco inmunosupresor (9). A cada hámster se le dieron cinco cisticercos y la inmunosupresión se hizo mediante acetato de metil prednisolona (Depo-medrol, UpJohn), la cual fue aplicada vía intramuscular a una dosis de 2 mg por animal a intervalos de 15 días post-infección para favorecer la instalación y el desarrollo de los parásitos. Pasados 45 días post-infección, los hámsteres fueron sacrificados con éter para la recuperación de sus intestinos y de las porciones correspondientes al intestino delgado se obtuvieron los adultos de *T. solium*, los cuales fueron tratados dependiendo de las necesidades de los estudios.

## 4.2 Preparación de material antigénico.

4.2.1 Extracto crudo de adultos de *T. solium*. Fueron utilizados los extractos de diferentes fuentes; tenias adultas recuperadas de los tamizados de heces de individuos infectados naturalmente y tenias recuperadas a la necropsia de hámsteres infectados experimentalmente (Ver lo relacionado al modelo experimental (4.1.2). Independientemente del origen de las tenias, éstas fueron procesadas de la misma forma luego de su recuperación de acuerdo a lo descrito por Allan en 1990 (5). Inicialmente los parásitos fueron lavados 5 veces con una solución salina (0.5 M) amortiguada con fosfatos 0.01 M pH 7.2 (SSAF) para retirar los restos de materia fecal. Luego los parásitos fueron homogeneizados mediante un Polytron (Brinkman Instruments) en presencia de una solución que contenía KCl 3M y bajo un baño de hielo. El procedimiento se repitió el número de veces suficiente para obtener una suspensión parasitaria perfectamente homogénea. El extracto se mantuvo toda la noche, bajo agitación suave, a 4°C. Posteriormente, la suspensión fue centrifugada a 2,000 g (3,200 rpm) durante 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue dializado en contra de SSAF y una vez más fue centrifugado a 24,000 g (6,500 rpm) durante 60 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado a través de membranas de acetato de celulosa con un diámetro de poro de 0.22µm. El filtrado obtenido fue concentrado por presión positiva de NO<sub>2</sub> con ayuda de membranas de ultrafiltración (AMICON INC. DIAFLO). Se le determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (11) utilizando a Albúmina Sérica Bovina Fracción V (SIGMA A-7906) como estándar y posteriormente fue fraccionado en alícuotas y guardado a -20°C hasta su uso.

**4.2.2. Productos de liberación de tenias cultivadas *in vitro*.** Estos antígenos fueron preparados de acuerdo a lo descrito por Allan en 1990 (5). Las tenias adultas recuperadas de los hámsteres fueron limpiadas de cualquier contaminación visible por detritos fecales. Posteriormente fueron lavadas con SSAF (2 o 3 veces), SSAF estéril (3 veces) combinada con una solución 1X/SSAF de antibióticos-antimicóticos (GIBCO 600-5245AE 100x). Posteriormente fueron sometidos a cultivo *in vitro* en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, 4030-1800EJ), el cual contenía, HEPES (0.2%), glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1mM, y bicarbonato de sodio al 0.007%. Las condiciones de cultivo fueron de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 hr. Posterior al tiempo de cultivo, el medio se recuperó y fue concentrado 10 veces por presión positiva de Nitrógeno, utilizando membranas de ultrafiltración (AMICON INC. DIAFLO) con un diámetro de poro que retuvo a partículas mayores a 10 kDa.

**4.2.3. Extracto crudo de metacéstodos de *T. solium*.**

La recolección de cisticercos se realizó a partir de la disección de carne de cerdo fresca infestada de parásitos. Los cisticercos se puncionaron para eliminar el fluido vesicular, posteriormente se colocaron en un recipiente que contenía SSAF y se realizaron varios lavados, se eliminó el exceso de líquido, se pesaron y congelaron a -70°C. Los cisticercos se descongelaron y se maceraron en 0.5 ml de agua destilada por cada gramo de cisticerco, con inhibidores de proteasas en las siguientes proporciones: (PMSF) al 0.006%, (PHMB) al 0.04%, (TPCK) 200 µg, (TLCK) 200 µg. Posteriormente se centrifugó a 2,000 g (3200 rpm) durante 1 hora a 4°C, el precipitado se resuspendió en SSAF PH 7.2, se sonicó dos



veces a 7Hz durante 1 minuto y se centrifugó, al primer sobrenadante se le añadió 1 ml de solución de fosfatos 0.1M (SSAF 10X) y se mezcló con el obtenido en la segunda centrifugación. Se determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford (11); el extracto se fraccionó y se congeló a -70°C hasta su uso (4).

#### 4.2.4. Productos secretados en cultivo *in vitro* de cisticercos de *T. solium*.

De igual manera, se extrajeron cisticercos viables de la carne de cerdo infestada, cuidando en esta vez que la integridad de la vesícula no fuera afectada, estos cisticercos fueron lavados con SSAF (2 o 3 veces), SSAF estéril (3 veces) combinada con una solución 1X/SSAF de antibióticos-antimicóticos (GIBCO 600-5245AE 100x). Posteriormente fueron sometidos a cultivo *in vitro* en medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO, 4030-1800EJ), el cual contenía, HEPES (0.2%), glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1mM, y bicarbonato de sodio al 0.007%. Las condiciones de cultivo fueron de 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 hr. Posterior al tiempo de cultivo, el medio se recuperó y fue concentrado 10 veces por presión positiva con Nitrógeno, utilizando membranas de ultrafiltración (AMICON INC. DIAFLO) con un diámetro de poro que retuvo a partículas mayores a 10 kDa, se adicionó al volumen final inhibidores de proteasas en las concentraciones descritas anteriormente, se le determinó la concentración de proteína como ya fue descrito por Bradford (11), se fraccionó y se almacenó a -20°C hasta su uso (4).

### 4.3 Preparación de anticuerpos monoclonales.

Fueron utilizados dos anticuerpos monoclonales (AcM) diferentes; uno de ellos (denominado 4B3) fue producido en contra de extractos crudos de tenias adultas recuperados de hámsteres infectados (ETHA), el otro (denominado 8D) fue preparado en contra de productos liberados al medio de cultivo de cisticercos mantenidos en cultivo *in vitro* (PLC). Mientras que el 4B3 fue preparado por los Dres. J. Allan y K. Ersfeld (en la Universidad de Salford, Inglaterra), el AcM 8D fue preparado por la Biol. Y. Medina en el INDRE/SSA de la Cd. de México (45). La preparación de ambos AcM fue similar ya que en ambos casos se prepararon inmunoglobulinas de la clase G1 utilizando células no secretoras de inmunoglobulinas provenientes del mieloma murino X63/Ag8.653 y fusionadas en presencia de PEG 4000 (GIBCO 14030-019) (28,31).

#### 4.3.1. Anticuerpos monoclonales en contra de extractos crudos de tenias adultas recuperadas de hámsteres.

Inicialmente los ratones hembras de la cepa Balb/c fueron inmunizados, por vía intraperitoneal, con 0.2 µg de ETHA en presencia de adyuvante completo de Freund (ACF); posteriormente fueron inoculadas, usando la misma vía de administración, tres inmunizaciones más en intervalos de 10 a 14 días, en las cuales se aplicó 0.2 µg de ETHA en adyuvante incompleto de Freund. La cuarta y última inmunización (tres días previos a la fusión) fue en la vena de la cola, con 0.2 µg de extracto crudo.

La fusión de las células del bazo y de las del mieloma se hizo como ha sido descrito por Goding en 1983, y por Harlow-Lane en 1988, con modificaciones recomendadas por Craig y cols. en 1986 (15,28 y 31). Para ello los ratones inmunizados

con ETHA fueron sacrificados por dislocación cervical y desinfectados con etanol al 70% para recuperar los bazos. Las células B obtenidas de los bazos fueron fusionadas, usando polietilenglicol 4000 al 50%, con las células del mieloma ya mencionadas.

Inicialmente la selección de los hibridomas se hizo luego de tres semanas de cultivo en presencia de medio de cultivo Optimen 1 (GIBCO 319G185-03) complementado con suero fetal bovino (SFB) inactivado (GIBCO 16000-028,010) al 5%, una mezcla al 1% de antibióticos (estreptomicina 50 µg/ml, penicilina 1,000,000 UI/ml), L-glutamina 2 mM, azaserina 0.0045 mM, e hipoxantina 0.075 mM. Posterior a este tiempo de selección, las células fueron cultivadas una vez más por dos semanas usando el mismo medio de cultivo sólo que en ausencia de azaserina. Luego de la selección en medios de cultivo selectivos los hibridomas fueron mantenidos en Optimen 1 complementado con suero fetal bovino inactivado al 5% (condiciones de cultivo: 37°C, 95% de humedad relativa y 7% de CO<sub>2</sub>).

Para la selección de los hibridomas productores de AcM anti-ETHA se hicieron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) indirectos en los que los sobrenadantes de cultivo fueron utilizados como anticuerpos primarios. Para estos análisis se utilizaron micropozos de placas Immulon IV (Dynatech Laboratories) sensibilizados, a 4°C durante toda la noche, con 100 µl/pozo de ETHA (concentración total de 5µg/ml) en una solución amortiguada con carbonatos 0.05M a pH 9.6. Luego los pozos fueron bloqueados durante 1 hr a temperatura ambiente con SSAF-Tween 20 al 0.3% y pasado el tiempo fueron adicionados 100 µl/pozo de sobrenadantes de cultivo. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de ratón

polivalente conjugado a peroxidasa y producido en cabra (dilución 1:1000 en SSAF-Tween 0.05%). El revelado de la reacción enzima-sustrato se hizo en presencia de 100  $\mu$ l de una solución amortiguada de fosfatos 0.01M y Na<sub>2</sub>EDTA 1mM a pH 6.0 que contenía 100 mg/50 ml de 5-aminosalicílico (SIGMA A-6178) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.005%, la reacción se incubó durante 25 min. Una vez efectuada la reacción se hicieron lecturas en un elisómetro para la determinación de las densidades ópticas de cada pozo a 450 nm. Los sobrenadantes de cultivo que dieron reacción positiva a anticuerpos anti-*T. solium* fueron seleccionados y las células correspondientes fueron clonadas por dilución limitante(39,40).

**4.3.2. Anticuerpos monoclonales contra productos secretados en cultivo *in vitro* de cisticercos de *T. solium* (PLC).** Inicialmente los ratones hembras de la cepa Balb/c fueron inmunizadas, por vía intraperitoneal, con 80  $\mu$ g de proteína de PLC en presencia de ACF; posteriormente fueron inoculadas usando la misma vía de administración, dos inmunizaciones más en intervalos de 10 a 14 días las cuales fueron aplicadas con 40  $\mu$ g de extracto crudo en AIF. La tercera y última inmunización (tres días previos a la fusión) fue aplicada por administración intravenosa en la vena de la cola del animal con 40  $\mu$ g de proteína de PLC sin ACF.

La fusión de las células del bazo y de las del mieloma se hicieron como se ha descrito por Goding, 1983 y Harlow-Lane 1988 (28,31) (Técnica por centrifugación con PEG al 30%, modificada por Isibasi y cols (45)). Para ello los ratones inmunizados con el extracto crudo fueron sacrificados por dislocación cervical y desinfectados con benzal para recuperar los bazos. Las células obtenidas de los bazos

fueron fusionadas, usando PEG 4000 (GIBCO 14030-019) con las células del mieloma ya mencionadas.

Inicialmente la selección de los hibridomas se hizo luego de tres semanas de cultivo en presencia de medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero fetal de bovino (SFB) al 20%, una mezcla de antibióticos al 1% (penicilina 50 µg/ml estreptomicina 1,000,000 U/ml), L-glutamina 2mM y un medio de selección denominado HAT que consta de (hipoxantina, aminopterina y timidina) (41,75). Posterior a este tiempo de selección en este medio diferencial, los hibridomas fueron analizados por ELISA para detectar aquellos productores de AcM anti-PLC.

Para la selección de los hibridomas productores de AcM anti-PLC se hicieron ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) indirectos en los que los sobrenadantes de cultivo fueron utilizados como anticuerpos primarios como ya fue descrito para el análisis de AcM anti-ETHA. En este caso fueron empleados micropozos de placas Nunc (Inter-Med 269620 y 269787) sensibilizados con 100 µl de proteína de PLC (50 µg/ml). Posteriormente los micropozos fueron bloqueados con leche descremada al 5% (SVELTES) e inmediatamente después fueron adicionados 100 µl/pozo de sobrenadantes de cultivo de las clonas a analizar. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-ratón polivalente conjugado a peroxidasa (dilución 1:500 en SSAF-Tween 20, 0.05%) (SIGMA P-1379). Para el revelado de la reacción enzima-sustrato se utilizaron 4 mg de orto-fenilendiamina (SIGMA P-9029) en 10 ml de una mezcla de ácido cítrico 0.1M y citrato de sodio 0.1M (1:1) más 4 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La reacción enzimática fue detenida mediante la adición de 100 µl/pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Las lecturas de la

reacción enzimática para cada pozo fueron medidas a una longitud de onda de 490 nm en un elisómetro. Los sobrenadantes de cultivo de hibridomas que dieron positividad de absorbancia de 0.5 o mayor fueron seleccionados para la clonación de las células respectivas mediante dilución limitante (39,40).

#### **4.4 Ensayos inmunológicos de los AcM 4B3 y 8D.**

**4.4.1 Determinación de clase y subclase.** Estas determinaciones se hicieron mediante ELISA como los descritos anteriormente, se fijó el antígeno contra el cual fue producido cada AcM a una concentración de 25 µg/ml y se adicionó como anticuerpo primario el sobrenadante de cultivo *in vitro* de los AcM 4B3 ó 8D, como anticuerpos secundarios se utilizaron los conjugados comerciales anti-IgG ó anti-IgM de ratón-peroxidasa (dilución 1:500) en SSAF-Tween 0.05%. En el caso de la determinación de subclases, como anticuerpos secundarios se utilizaron los conjugados comerciales en contra de IgG1, IgG2a, IgG2b, o IgG3 de ratón sin marcar producidas en conejo de tal manera que como anticuerpos terciarios se utilizó anti-IgG de conejo-peroxidasa a la misma dilución empleada para los conjugados anteriormente descritos. Como sustrato se utilizó OPD en las concentraciones antes descritas.

**4.4.2. Determinación de la especificidad de los AcM hacia diferentes antígenos parasitarios.** La especificidad de 4B3 y 8D se hizo mediante ELISA indirecto (descritos previamente en preparación de los anticuerpos monoclonales). Los antígenos utilizados fueron:

-**Céstodos.** Extractos crudos de cisticercos de *T. solium*, recuperados de cerdos infectados naturalmente (C), de adultos de *T. solium* recuperados de humanos infectados naturalmente (ETh<sub>u</sub>), de adultos de *T. solium* recuperados de hámsteres infectados experimentalmente (ETh<sub>a</sub>), de adultos de *T. saginata* recuperadas de humanos infectados naturalmente (Ts<sub>ag</sub>), de cisticercos de *T. taeniaeformis* (Ctae) y de adultos de *T. taeniaeformis* (Ttae).

-**Céstodos.** Productos de liberación de cisticercos de *T. solium* cultivados *in vitro* (PLC) y de adultos de *T. solium* de hámster (PLTh<sub>a</sub>).

-**Tremátodos.** Extractos crudos de *Fasciola hepática* recuperadas de hígados bovinos (Fh<sub>ep</sub>).

-**Nemátodos.** Extractos crudos de *Trichinella spiralis* recuperada del músculo de ratas infectadas experimentalmente (T<sub>spir</sub>), de *Macracanthorhynchus hirodinaceus* (M<sub>hiro</sub>) y de *Ascaris suum* (A<sub>suum</sub>) recuperado de intestino de cerdos del rastro municipal de Morelia Mich.

-**Protozoarios.** Suspensión celular de *Leishmania mexicana* (L<sub>mex</sub>).

Todos los antígenos fueron utilizados a una concentración final de 25 µg/ml, excepto el antígeno de *L. mexicana* lo constituyeron 10 millones de células/ml.

**4.4.3. Determinación del reconocimiento de los AcM hacia diferentes fracciones antigénicas.** Para estos ensayos se hicieron corrimientos electroforéticos de los diferentes antígenos de *T. solium* en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) utilizando un equipo de electroforesis vertical (Mighty Small SE250-SE270 HOEFFER). El desarrollo de la técnica estuvo basada en lo recomendado por Harlow-Lane, 1988 (31), por lo que se utilizaron geles a una concentración de 5% y 10% de acrilamida en ausencia de 2-mercaptoetanol (condiciones no reductoras) y en presencia de 2-mercaptoetanol (condiciones reductoras). Se utilizaron geles discontinuos para concentración y separación de las muestras, en las que las condiciones fueron de 110 V durante 2 hr para la separación de las muestras. Se emplearon marcadores de peso molecular preteñidos de rango amplio (GIBCO 161-0800), así como azul de bromofenol y pironina como controles del corrimiento electroforético. Posterior a los corrimientos electroforéticos los geles fueron utilizados para transferencia a membranas de nitrocelulosa (NC) o para tinción de proteínas. Cuando se efectuaron tinciones de los geles se emplearon las técnicas de tinción con azul de Coomasie (4,46) o con plata (80) en caso de requerir mayor visualización del fraccionamiento antigénico.

La transferencia de las proteínas a NC fue hecha utilizando membranas (Scheileicher & Schuell 0.2  $\mu$ m, BA83) con ayuda de un equipo de electrotransferencia (HOEFFER, TE2H02) utilizando condiciones descritas por Harlow-Lane, 1988 (31) y las recomendadas por el fabricante: 100 V, durante 1hr. En algunos casos, para corroborar el estado de



la electrotransferencia, se aplicó la tinción de la NC posterior a la transferencia con rojo de Ponceau (SIGMA, P-3504) como lo describen Harlow-Lane, 1988 (31) y Alcántara, 1994 (4).

Las reacciones inmunológicas para determinar el reconocimiento de los AcM hacia las fracciones antigénicas se hicieron utilizando las membranas de NC con las proteínas transferidas. Para ello se utilizó una metodología similar a lo descrito al ELISA indirecto sólo que aplicado al desarrollo de la reacción por precipitación como lo describen Towbin y cols, 1979 y Harlow-Lane 1988 (77,31): Las membranas de NC fueron bloqueadas en presencia de leche descremada (SVELTES), incubadas en presencia de sobrenadantes de cultivo de los AcM (500  $\mu$ l) y en presencia de un anticuerpo secundario como el anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (500  $\mu$ l de una dilución 1:500). Como sustrato se utilizó diaminobenzidina (DAB) (30mg/60ml SIGMA CHEMICAL D-5637) y 1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. En todos los casos las reacciones fueron permitidas, luego de la adición del sustrato, hasta la aparición del color durante aproximadamente 5 min, y se detuvo la reacción lavando la NC con agua. Se calcularon los pesos moleculares de las fracciones reconocidas como lo sugiere Shapiro, 1967(69).

**4.4.4. Determinación del reconocimiento de 4B3 a antígenos liberados en las heces de hámsteres infectados experimentalmente.** Para estos ensayos se utilizaron sobrenadantes de heces de hámsteres preparados en SSAF-Tween 0.3 % (5 y 9) y analizados mediante ensayos de inmunopunto en membranas de NC utilizando un equipo de Bio Dot (BIO RAD 176545,170647). La técnica de detección de los coproantígenos

mediante inmunopunto estuvo basada en lo descrito por Chaicumpa, W en 1992 (16), en la cual se realizó el pegado de los antígenos presentes en el sobrenadante de heces a la NC durante 30 min. Posteriormente las membranas de NC con el antígeno pegado fueron procesadas como fue descrito para la inmunolectrotransferencia.

Previo a los ensayos de inmunopunto y debido a la inespecificidad observada hacia los sobrenadantes de heces de hámsteres no infectados, el conjugado anti-IgG de ratón-peroxidasa fue previamente adsorbido durante tres ocasiones con sobrenadantes de heces de hámsteres no infectados utilizando micropozos de placas Nunc Maxisorb (Inter Med. 439454). Para la adsorción del conjugado se colocaron 100  $\mu$ l/pozo de los sobrenadantes de heces y se permitió la sensibilización por toda la noche a 4°C, después del bloqueo pertinente se adicionaron 100  $\mu$ l/pozo de anti-IgG de ratón-peroxidasa a una dilución 1:500 y se permitió la incubación durante 2 hr; esto se repitió 2 veces más y se recuperó todo el volumen del conjugado triadsorbido y se adicionó el total de éste como segundo anticuerpo después de la incubación con el monoclonal 4B3.

#### **4.5 Ensayos inmunohistoquímicos para el reconocimiento de 4B3 y 8D.**

4.5.1. Determinación del reconocimiento a tejidos de cisticercos de *T. solium*. Para estos ensayos fueron recuperados cisticercos enteros del músculo de cerdos infectados naturalmente. Luego de la recuperación, los cisticercos fueron incluidos en Tissue Tek II (AMES, Laboratorio Miles de Mexico 4583) y congelados rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido. Posteriormente se

hicieron cortes de 10  $\mu\text{m}$  de los tejidos utilizando un Criostáto (American Optical Corporation), los cuales fueron recuperados sobre un portaobjetos y fijados en acetona (-20°C) durante 5 min. Para los ensayos de inmunofluorescencia, las preparaciones fueron procesadas como fue descrito para los ELISAs indirectos: fueron bloqueadas con leche descremada, incubadas en presencia de sobrenadantes de cultivo de 4B3, 8D y del mieloma (Ag8) y finalmente incubadas en presencia de anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón conjugados a isotiocianato de fluoresceína (IgG-FITC) (SIGMA A-4416), diluido 1:50 en azul de Evans 1:5000 (49). Para la observación de las preparaciones se utilizó un microscopio de epifluorescencia NIKON con objetivos de 10, 40, 60 y 100x, utilizando un sistema intercambiable de filtros de excitación y barrera para eliminar la autofluorescencia en un rango de longitud de onda de 490 a 517 nm (FITC), además se hicieron observaciones simultáneas utilizando el campo claro del mismo microscopio. Las observaciones fueron registradas mediante fotografías tomadas con película de color Fujicolor ASA 1600.

**4.5.2. Determinación del reconocimiento a tejidos de adultos de *T. solium* recuperadas de hámster.** Luego de la recuperación de los parásitos adultos (ver lo correspondiente a la preparación de antígenos de tenias adultas de hámster 4.2.1) éstos fueron fraccionados en escólex, cuello y proglótido terminal. Una vez separadas las secciones mencionadas, cada una de ellas fue tratada de la misma forma que se indicó anteriormente para los cisticercos. El grosor de los cortes obtenidos con estos tejidos varió de 7 a 10  $\mu\text{m}$ . El procesamiento para la observación de los tejidos fue similar a lo descrito previamente para los cisticercos.

## RESULTADOS

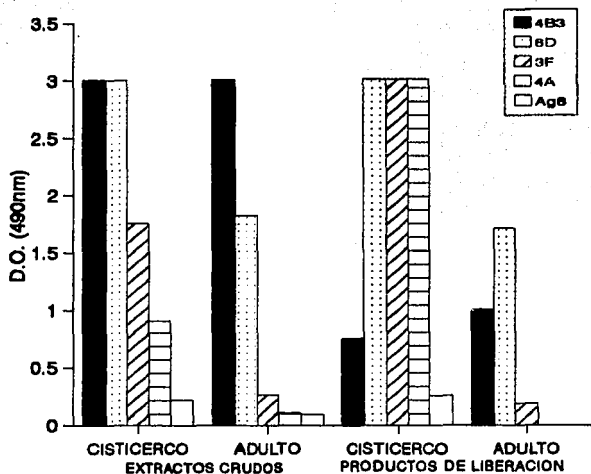
**5.1 Selección de los anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de extractos crudos de adultos de *T. solium*.** Como ya fue descrito en materiales y métodos se hizo la caracterización de dos clonas, productoras de anticuerpos (4B3 y 8D). El análisis de los sobrenadantes de cultivo de estas clonas mostró que ambas reconocieron a los extractos crudos de tenias adultas, independientemente de la forma en que fueron producidos (Figura 4).

Las clonas seleccionadas mostraron estabilidad bajo condiciones de congelación en nitrógeno líquido, así como en la expansión *in vitro* posterior a la descongelación. En el caso de la inducción de ascitis, por su pase de células a peritoneo de ratón, la única clona que fue capaz de inducir tumor fue la clona 4B3.

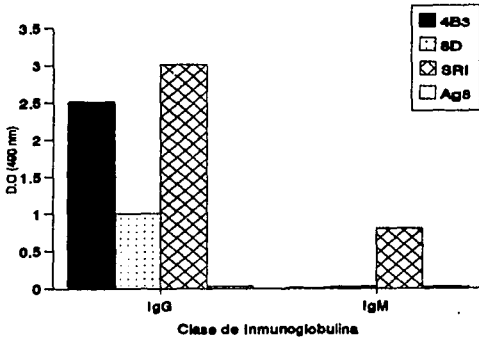
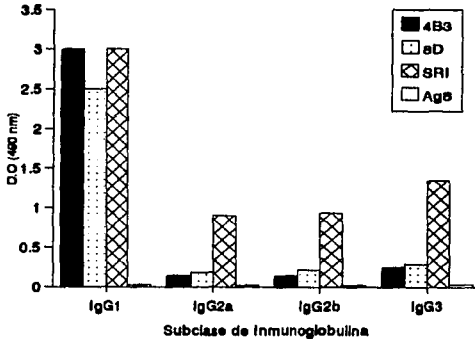
### **5.2 Ensayos inmunológicos.**

**5.2.1. Determinación de clase y subclase.** Los ensayos inmunoenzimáticos mostraron que la clase de inmunoglobulina secretada por las dos clonas (4B3 y 8D) fue la clase IgG y subclase 1. (Figura 5A y 5B) respectivamente, mientras que un suero policlonal dirigido contra el metacéstodo de *T. solium* presenta todas las clases y subclases de anticuerpos.

**5.2.2. Determinación de especificidad hacia diferentes antígenos parasitarios.** Los resultados de diferentes ELISA's mostraron que los sobrenadantes de cultivo de las clonas seleccionadas tuvieron mayor grado de reconocimiento hacia antígenos de céstodos y no así para otros antígenos (Figura 6).



**Figura 4.** Selección de AcM que reconocen a extractos crudos de adultos de *T. solium*. Se realizó un ELISA en donde se fijaron los antígenos a una concentración de 25 µg/ml; como Ac. primario se utilizó el sobrenadante de cultivo de las clonas **4B3** y **8D**, y del mieloma **Ag8** y como Ac. secundario anti-IgA, IgG, IgM conjugados a peroxidasa. Se usó como sustrato OPD con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 490 nm.  
**D.O:** Densidad Óptica.

**A****B**

**Figura 5. Determinación de clase y subclase de los AcM 4B3 y 8D.** Se hicieron ELISA/s indirectos. Cada AcM fué probado con el Ag contra el que fue preparado. Como Ac. primario se usó sobrenadante de cultivo del mieloma (*Ag8*), de los hibridomas (*4B3* y *8D*) y suero de ratones inmunizados (*SRI*). Como anticuerpos secundarios se utilizaron Anticuerpos comerciales anti-IgG ó IgM conjugados a peroxidasa, como sustrato se utilizó OPD con  $H_2O_2$ , y la lectura se hizo a 490 nm. **A)** Determinación de clase, **B)** Determinación de subclase. En este último ensayo se utilizó un Ac. terciario comercial anti-IgG de conejo-peroxidasa.

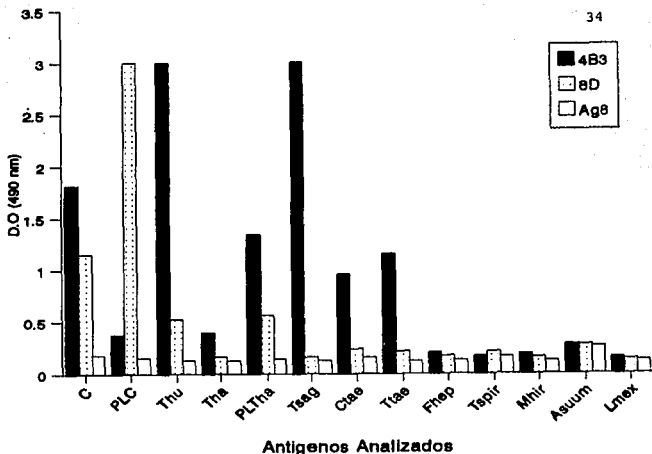


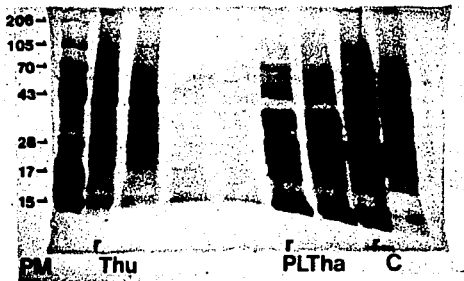
Figura 6. Determinación de especificidad de los AcM 4B3 y 8D frente a diferentes antígenos parasitarios. La determinación fue hecha por ELISA, en la que se analizaron sobrenadantes de cultivo (Ac. primario), anti-IgG de ratón- peroxidasa (Ac. secundario) y como sustrato OPD con H<sub>2</sub>O, a 490 nm. C: extracto crudo de cisticercos de *T. solium*, PLC: productos de liberación *in vitro* de cisticercos de *T. solium*, Thu: extracto crudo de adultos de *T. solium* de humano, Tha: extracto crudo de adultos de *T. solium* de hámster, PLTha: productos de liberación *in vitro* de adultos de *T. solium* de hámster, Tsag: extracto crudo de *T. saginata*, Ctac: extracto crudo de cisticercos de *T. taeniaeformis*, Ttae: extracto crudo de adultos de *T. taeniaeformis*, Fhsp: extracto crudo de *F. hepática*, Tspir: extracto crudo de *Trichinella spiralis*, Mhir: extracto crudo de *Macracantorynchus hirudinaceus*, Asuum: extracto crudo de *Ascaris suum*, Lmex: células de *Leishmania mexicana*. Todos los antígenos fueron analizados a una concentración de 25 µg/ml, sólo en el caso de *L. mex* se usó el equivalente a 10,000,000 células/ml.

El AcM 4B3 reconoció indistintamente a los céstodos utilizados en este ensayo, principalmente Taenidos independientemente de sus diferentes estadios parasitarios, aunque en el caso de extractos crudos de *T. solium* de origen humano hubo mayor reconocimiento comparado con extractos de tenias recuperadas de hámsteres infectados. El AcM 8D sólo reconoció a extractos crudos de metacéstodos y adultos *T. solium*, estas últimas de origen humano, así como a productos de liberación *in vitro* de cisticercos y de tenias recuperadas de hámster infectados.

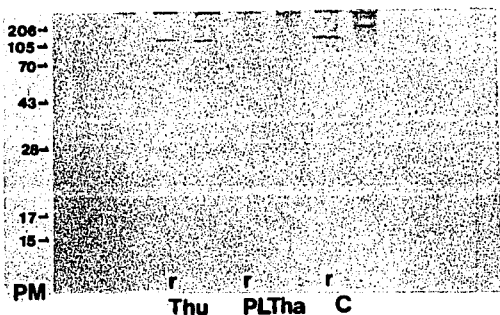
**5.2.3. Determinación del reconocimiento hacia diferentes fracciones antigénicas.** El análisis del reconocimiento hacia las diferentes fracciones antigénicas, tratadas bajo distintas condiciones (Figura 7.A) procesadas por IET, mostró que 4B3 y 8D tenían reconocimientos diferentes hacia los antígenos utilizados. 4B3 reconoció en los antígenos utilizados, una fracción antigénica que está por arriba del marcador de peso molecular preteñido de 206 kDa, y que en el caso de extractos crudos de adultos de *T. solium*, aparentemente fue la mejor reconocida. También durante el análisis se observó otra banda menos definida de peso molecular aproximado a los 105 kDa. Estos resultados no fueron afectados por las condiciones de los ensayos.

Sin embargo en el análisis de los productos de liberación de tenias recuperadas de hámster y de los extractos crudos de cisticercos, se observó que hay alteración del patrón de reconocimiento de la banda mayor a 206 kDa y la de 105 kDa. El reconocimiento de 4B3 a extractos crudos de cisticercos también se dió a otras fracciones antigénicas ubicadas en los 105 y 190 kDa, en condiciones reductoras y no reductoras respectivamente (Figura 7.B).



**A**

36

**B**

**Figura 7. Análisis por IET del reconocimiento del AcM 4B3.**

**A)** Electroforesis en gel de poliacrilamida de antígenos de *T. solium*. Gel al 10% teñido con plata (15µg/carril). **PM:** pesos moleculares preteñidos. **Thu:** extractos crudos de tenias de origen humano, **PLTha:** productos de liberación *in vitro* de tenias recuperadas de hámster. **C:** extractos crudos de cisticercos.  
**B)** Inmunoelectrotransferencia a papel de NC. Después de la transferencia el papel se hizo reaccionar con 4B3 (Ac primario) luego con anti-IgG de ratón-peroxidasa (Ac. secundario). El revelado se hizo con DAB en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, **r:** condiciones reductoras (presencia de B-mercaptoetanol).

En el caso del análisis de 8D frente a extractos crudos de adultos de *T. solium* de origen humano en condiciones reductoras y no reductoras, mostró que este AcM detectó dos fracciones antigénicas de aproximadamente 116 y 103 kDa (Figura 8.B). En el caso del análisis de productos de liberación de adultos de *T. solium*, 8D no reconoció fracción antigénica alguna. Este no fue el caso cuando se analizó los extractos crudos de cisticercos de *T. solium*, ya que en este ensayo el AcM reconoció bajo condiciones reductoras a siete bandas diferentes cuyos pesos moleculares, oscilaban entre 93 a 8 kDa y que bajo condiciones no reductoras correspondieron a cinco fracciones antigénicas situadas entre 101 y 30 kDa aproximadamente (Figura 8.A).

**5.2.4. Determinación del reconocimiento de 4B3 a antígenos liberados en las heces de hámsteres infectados experimentalmente.** El análisis mediante inmunopunto de sobrenadantes de heces de hámsteres infectados mostró que el AcM 4B3 reaccionó contra antígenos liberados en las heces luego de 7 días post-infección y esta misma situación se presentó durante todos los tiempos de infección estudiados (Figura 9).

### **5.3. Ensayos inmunohistoquímicos.**

**5.3.1. Determinación del reconocimiento a tejidos de cisticercos de *T. solium*.** El análisis por epifluorescencia de los cortes de cisticercos (aumento: 10 X) mostró que 4B3 reconoció canal espiral (CE) y el interior de la pared vesicular (PV) (Figura 10).

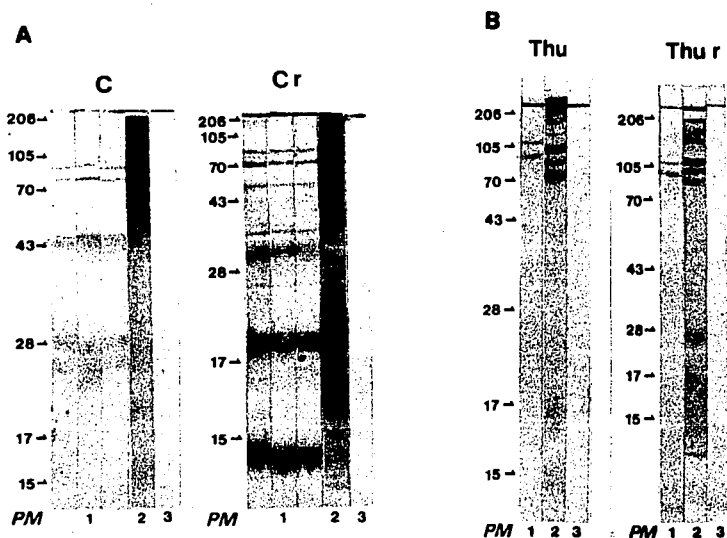
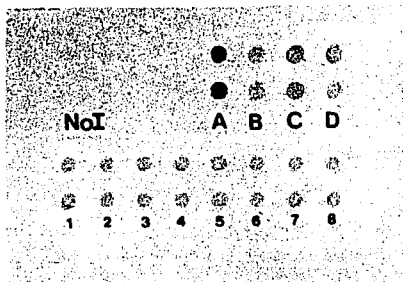
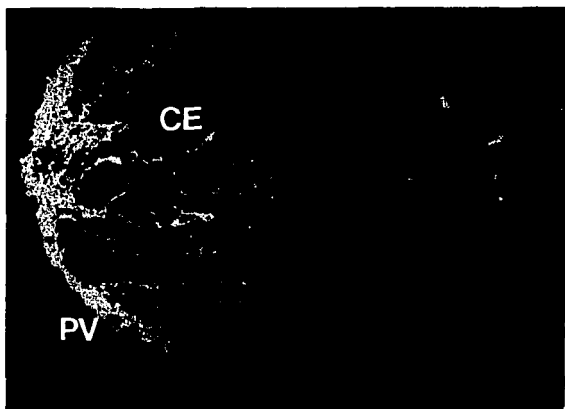


Figura 8. Análisis por IET del reconocimiento del AcM 8D.

A) Extractos crudos de cisticercos transferidos en condiciones no reductoras (C) y reductoras (Cr). PM: pesos moleculares, 1: 8D (triplicados), 2: Ac policlonal anti-cisticerco y 3: sobrenadante de cultivo del mieloma Ag8. B) Extractos crudos de tenias de origen humano transferidos en condiciones no reductoras (Thu) y reductoras (Thur). Las reacciones y el revelado en A y B se hizo como se describió en la Figura 7.



**Figura 9. Inmunoensayo en punto del reconocimiento del AcM 4B3 a coproantígenos.** Se analizaron los sobrenadantes de heces de hámsteres no infectados e infectados e comparando las reacciones con los diferentes antígenos de *T. solium*. Los antígenos fueron adsorbidos a NC y hechos reaccionar con el AcM 4B3 (Ac primario), con el anti-IgG de ratón-peroxidasa (Ac. secundario) y el revelado se hizo con DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El conjugado fue adsorbido tres ocasiones con sobrenadante de heces de hámster no infectadas. **NoI:** sobrenadante de heces de hámster no infectadas, **A:** extracto crudo de tenias de origen humano, **B:** extracto crudo de tenias recuperadas de hámster, **C:** productos de liberación *in vitro* de tenias recuperadas de hámster y **D:** extracto crudo de cisticerco. **1,2,3,4,5,6,7,8** corresponden a los sobrenadantes de heces de hamster infectados, cuyos días posinfección son: **7,14,20,27,30,39,44, y 50** respectivamente.



**Figura 10. Mosaico del reconocimiento de 4B3 en cisticerco (10 X).** Se observa un criocorte (10 $\mu$ m) de cisticerco tratado con el AcM 4B3 (Ac primario) y anti-IgG de ratón-FITC (Ac secundario). La observación se hizo en microscopio de epifluorescencia a 495 nm. La zona sin fluorescencia corresponde a la emisión del azul de Evans (adicionado al conjugado) y la fluorescencia correspond al marcaje indirecto de 4B3. **PV:** pared vesicular, **CE:** canal espiral correspondiente a la tenia invaginada.

La observación de estos mismos cortes a mayor aumento (60X), mostró que la fluorescencia estuvo localizada en las fibras musculares y que dependiendo de la región donde se encuentre, se da la distribución de la marca. Por ejemplo en el canal espiral, las fibras musculares tienen un orden acorde de los contornos en que se presenta el parásito invaginado (CE) (Figura 11.B), no así en pared vesicular (PV) (Figura 11.A).

El análisis de reconocimiento del AcM 8D, fue hecho bajo condiciones similares de observación descritas para 4B3. De esta manera se observó que 8D reconoce antígenos situados en el intersticio (I) por abajo del tegumento en las paredes vesiculares observadas. Esto igual que en PV, fue observado dentro del canal espiral, correspondiente al gusano invaginado. La observación a mayor aumento (60 x) de lo reconocido por 8D mostró que la fluorescencia a nivel de pared vesicular podría estar localizada dentro de células subtegumentarias y de bolsas de glucógeno (Figura 12.A). Observaciones similares a las descritas anteriormente se obtuvieron a nivel de canal espiral (Figura 12.B).

**5.3.2. Determinación del reconocimiento a tejidos de tenias adultas recuperadas de hámster.** Las observaciones de la fluorescencia asociada a 4B3 en los tejidos parasitarios analizados mostraron lo siguiente: **Escólex:** Destacó la observación de autofluorescencia intensa emitida por los ganchos del parásito, cuando el tejido fue incubado únicamente en presencia de sobrenadante del mieloma Ag8 (Figura 13.A); sin embargo cuando se utilizó sobrenadante de cultivo de 4B3, la fluorescencia fue intensa y estuvo asociada a ventosas y rostelo (Fig 13.B y 14.A), lo cual no se observó en el control negativo.

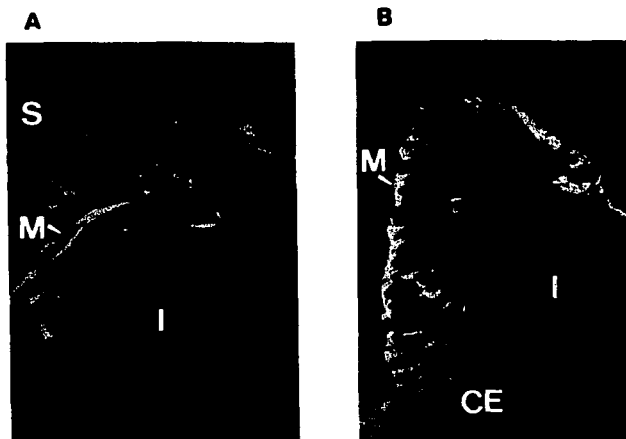


Figura 11. Reconocimiento del AcM 4B3 en cisticerco. Criocortes (10 $\mu$ m) de cisticerco observado a 60X. A) pared vesicular. B) canal espiral S: superficie parasitaria y tegumento, M: músculo, I: intersticio, CE: canal espiral.

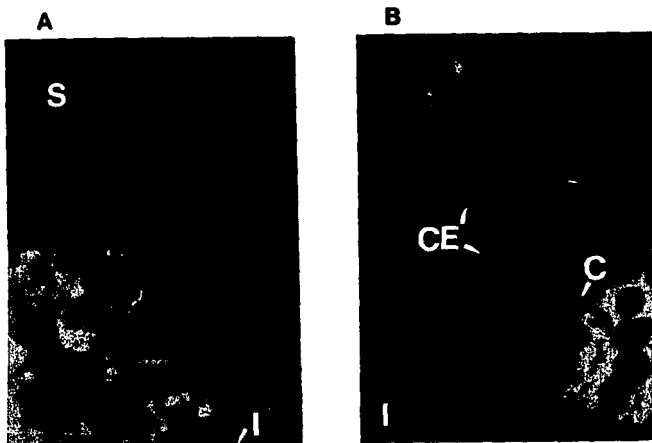


Figura 12. Reconocimiento del AcM 8D en cisticerco. Criocortes del cisticerco (10 $\mu$ m). A) pared vesicular, B) canal espiral, S: superficie y tegumento, I: intersticio, CE: canal espiral, correspondiente a la tenia invaginada, C: corpúsculos calcáreos. Observaciones a 60 X.





**Figura 13. Reconocimiento del AcM 4B3 en tenia adulta. Criocortes (7 $\mu$ m) de escólex de tenias recuperadas de hámster observadas a 10X . A) autofluorescencia, B) reconocimiento de 4B3. G: ganchos R: rostelo.**

En ventosas la distribución de la marca fluorescente, aparentemente se presentó en capas (**Figura 14.B**), las cuales dependiendo de la zona de observación tienen una distribución diferente. **Cuello:** La marca fluorescente en esta región tuvo una distribución diferente al escolex, y que se observaron abundantes filamentos alargados con aparente dirección hacia los proglótidos iniciales (**Figura 14.C**). **Proglótidos:** la marca fluorescente asociada a 4B3 tuvo una mayor distribución en los bordes de los proglótidos analizados, que incluso define el contorno de este tejido parasitario (**Figura 15.A**), y la observación en el interior del mismo proglótido, la marca asociada a fibras musculares se encuentra en un aparente desorden (**Figura 15.B**)

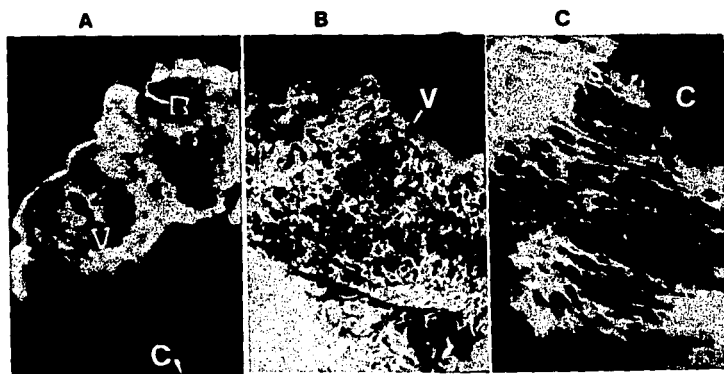
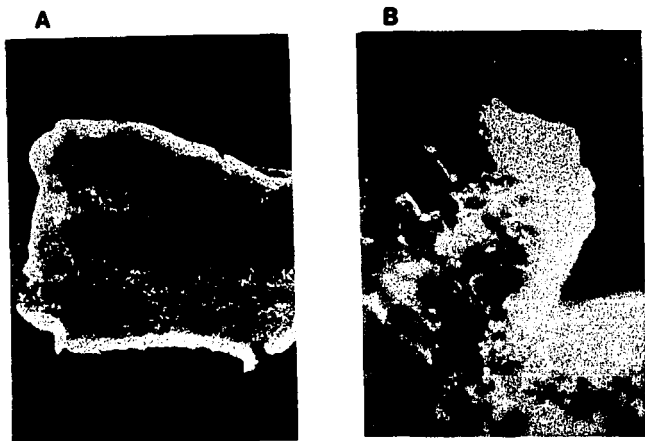


Figura 14. Reconocimiento del AcM 4B3 en tenia adulta. Criocortes de escólex y cuello (7 $\mu$ m). A) ventosas(10X) B) ventosas(60X) C)cuello(60 X), V:ventosa, R: rostellum, C: cuello.



**Figura 15. Reconocimiento del AcM 4B3 en tenia adulta. Criocortes de proglótidos finales (7 $\mu$ m) recuperados de tenias de hámster. A) proglótido observado a 10 X. B) proglótido observado a 60X.**

## DISCUSION.

La caracterización de los anticuerpos monoclonales utilizados en la presente tesis, mostró que son inmunoglobulinas G1, lo cual tiene relación con el esquema de inmunización utilizado, ya que la clase de anticuerpos obtenidos, está en función de la cantidad y de los tiempos de administración del antígeno (73). Además se ha establecido que el empleo de adyuvante completo de Freund (ACF) favorece la producción de anticuerpos IgG1 (28). En relación a la afinidad de los AcM, deducida de los esquemas de inmunización utilizados, podría tener relación con las diferentes cantidades de antígeno, (4B3): 0.2  $\mu$ g. (8D): 80  $\mu$ g. El AcM 4B3 probablemente sería un anticuerpo con mediana o alta afinidad lo cual correspondería al reconocimiento de una fracción antigénica definida (Figura 7.B) y a la detección de pequeñas cantidades de antígenos, como fue mostrado en el análisis de inmunopunto, para detectar productos parasitarios liberados en las heces de hámsteres infectados (Figura 9). El AcM 8D comparado con 4B3, es diferente y probablemente correspondería a un anticuerpo de baja afinidad, ya que reconoce un mayor número de fracciones antigénicas, (Figura 8.A) y además de que fue preparado con una mayor concentración de antígeno. Aparte de la afinidad, otra de las diferencias entre 8D Y 4B3, es que la clona productora de 4B3 fue la única capaz de inducir ascitis en ratones Balb/c de acuerdo al protocolo propuesto por Harlow y Lane en 1988 (31), y ello no fue el caso para la clona 8D, ya que después de un mes de la inoculación no hubo crecimiento alguno. Dos explicaciones que apoyaran el nulo crecimiento de la clona 8D, estaría basado: una en que ésta clona induce un tumor de

lento crecimiento (28,31), y otra sería que la cepa de ratones utilizada durante la fusión con las células del mieloma no era realmente Balb/c y se presente un fenómeno de rechazo para las células inoculadas (28). Respecto a esta última explicación sería necesario utilizar ratones F1 provenientes de progenitores Balb/c y otra cepa diferente (31).

La especificidad antigénica de los AcM, en la que los antígenos parasitarios de céstodos son los más reconocidos por los dos AcM (Figura 6), se observó que 4B3 es específico de género pero no de especie ya que reconoció a extractos totales y productos de liberación de *T. solium*, *T. saginata* y *T. taeniaeformis*. Estos resultados indican que 4B3 pudiera estar reaccionando con un epítipo semejante entre estos parásitos, como ha sido demostrado para anticuerpos monoclonales de alta especificidad que puede reconocer epítopos comunes en diferentes antígenos. El análisis del AcM 8D mostró que este anticuerpo tiene especificidad de especie, porque reconoce a antígenos de *T. solium* sin importar si se trata de extractos totales de cisticercos y tenias adultas de humano así como de tenias de hámster mantenidas en cultivo *in vitro*.

La comparación inmunoquímica de 4B3 y 8D, en su reconocimiento hacia antígenos de *Taenia solium* mostró que hubo diferencias marcadas; por ejemplo, 4B3 reaccionó con extractos crudos de cisticercos, productos de liberación de tenias de hámster; extractos crudos de tenias adultas de origen humano y débilmente extractos de tenias de hámster. Por su parte 8D reaccionó con extractos totales de adultos recuperados de seres humanos infectados, productos liberados por las tenias cultivadas *in vitro*, y extractos crudos y

productos de liberación de cisticercos. El ACM 8D no tuvo reacción hacia extractos totales de tenias recuperadas de hámster infectados. Con estos resultados se pensaría que 4B3 está reaccionando con determinantes antigénicos comunes que se mantienen desde el estadio larvario hasta el estadio adulto, y la misma situación podría ser el caso de 8D. El que 8D no reconociera antígenos de taenias de hámster, nos indicaría que estos parásitos son diferentes de las recuperadas de seres humanos infectados, y esto también fue visto para 4B3. (Figura 6). Una vez más, estas observaciones sugieren que en la expresión de antígenos, hay diferencias entre tenias adultas recuperadas de hospederos diferentes y no importando que ellas tengan características morfológicas y morfométricas similares (3). Además este fenómeno estaría relacionado con la parasitosis y el hospedero, ya que es importante recordar que la teniosis en hámster dorado es inducida, y no natural como la que se presenta en el ser humano. Además el análisis del reconocimiento por ELISA hacia productos de liberación de tenias de hámster, no así por IET, solo muestra que el antígeno o epítipo reconocido por 8D pierde su conformación al ser tratado por los métodos electroforéticos, lo cual hace que en IET ya no se reconozca (31).

El análisis inmunquímico por IET de 4B3 mostró que hay reconocimiento hacia una fracción antigénica bien definida para los extractos de adultos de *T. solium*, mayor a 206 kDa, así como un débil reconocimiento hacia una fracción localizada en los 105 kDa (Figura 7.B). Los resultados fueron repetidos cuando se analizaron los extractos de cisticercos, sólo que aparte de la banda mayor a 206 kDa,

hubo el reconocimiento fuerte hacia otras dos bandas de menor peso molecular situadas entre los 190 y 105 kDa.

Tanto en el caso de extractos crudos de adultos como de cisticercos de *T. solium*, la fracción reconocida correspondiente a los 105 kDa sugiere tratarse de una fracción antigénica situada en el antígeno B (Ag B) (30,37,56), que como será descrito más adelante, tiene relación con lo descrito en la inmunolocalización del AgB en pared vesicular de tejidos de cisticercos (37). Este determinante antigénico reconocido por 4B3, aparte de estar en diferentes estadios parasitarios, podría encontrarse como epítipo común entre proteínas relacionadas, teniendo como base las observaciones siguientes: 1. El AgB es de localización muscular en tejido larvario (37), es una paramiosina (38) denominada así por poseer características de miosina y se encuentra en secreciones del parásito (37). 2. La proteína mayor a 206 kD detectada en los estadios larvario y adulto de *T. solium* por 4B3, pretende corresponder a miosina o sus derivados que son localizados en fibras musculares de tejidos y que generalmente tienen un peso molecular mayor a 200 kDa (20,22,27,41,75). 3. Las miosinas analizadas de diferentes parásitos tienen secuencias de aminoácidos comunes, que tal vez corresponderían a las reconocidas por 4B3 y lo cual tendría que ser corroborado con otros estudios (38).

Por otra parte, el análisis por ELISA e IET de 4B3 en contra de productos de liberación de tenias recuperadas de hámster, tuvo correlación con lo obtenido en los ensayos de inmunopunto (Figura 9) ya que aparentemente fueron detectados los mismos antígenos de liberación en los sobrenadantes de heces de hámster infectados, estos hallazgos abren una



incógnita en relación a que fenómenos del hospedero influyen para que antígenos de localización muscular, sean liberados en las heces. Y al respecto esto mismo ha sido planteado para tratar de explicar la secreción del antígeno B en los cisticercos (37,38). En este sentido se proponen algunas sugerencias relacionadas tomando en cuenta el modelo experimental en estudio: 1) Ruptura de proglótidos durante el desarrollo del parásito adulto, con la consiguiente liberación de antígenos internos y contenidos en los bordes de estas porciones parasitarias (Figura 15.A). y 2) Excreción de los antígenos a través del tegumento como ha sido propuesto para el AgB en cisticercos (37) para manejar la respuesta inmune del hospedero y que ello tuviera relación con la liberación del antígeno desde infecciones tempranas (Figura 9).

El análisis por IET del AcM 8D, mostró que hubo reconocimiento hacia 5 o 7 fracciones antigénicas en cisticercos y hacia 2 fracciones de tenias adultas de seres humanos. La razón del reconocimiento de varias bandas en los extractos de cisticercos podría deberse a una inadecuada clonación o por la presencia de un determinante antigénico común entre un amplio número de fracciones antigénicas del extracto, que también ha sido descrito para otros tipos de extractos antigénicos (31). Con base en estos resultados ha sido propuesto que la monoclonalidad de un anticuerpo no está determinada por el reconocimiento hacia una sola banda de un fraccionamiento electroforético, sino que la monoclonalidad de un anticuerpo está dada por que proviene de la clona de una sola célula y es de ésta manera que pueden ser obtenidos anticuerpos monoclonales que reconozcan hasta 10 bandas de un antígeno fraccionado (76), esto último dado por la afinidad

que presenta el anticuerpo monoclonal. Por estas causas la preparación de un anticuerpo monoclonal, en relación a su especificidad, dependerá de manera importante de la inmunización con la fuente antigénica específica (31).

Otra posible explicación para el reconocimiento de un epítipo común para diferentes antígenos, tiene bases en la presencia de epítipos compartidos o muy similares entre diferentes glicoproteínas, en las que los carbohidratos son prácticamente iguales (48,51), y ello se ajustaría con la preparación de 8D, ya que fue preparado en contra de productos liberados en cultivo *in vitro* de cisticercos en el que probablemente son glicoproteínas (48).

Con los ensayos inmunohistoquímicos se pudieron establecer los niveles de tejido parasitario en los que se encontraron los antígenos reconocidos por los anticuerpos monoclonales. El AcM 4B3 reconoció un epítipo compartido entre dos proteínas similares en los dos estadios parasitarios estudiados (Figura 7.B) que por su distribución y localización indica que forman parte de una proteína muscular (Figura 11A y 11B). Sin embargo en los resultados por IET se encontró que el principal determinante antigénico reconocido por 4B3 es mayor a un peso de 206 kDa y así mismo por las condiciones en que fueron realizados los ensayos, no se descarta que 4B3 este detectando a la paramiosina que tiene un peso entre 105 y 95 kDa (30,37,56). De acuerdo al peso molecular y al cruce con Ag B, es posible que el determinante antigénico mayor a 206 kDa, detectado por 4B3 corresponde a miosina, lo cual tendría que ser confirmado posteriormente. La fracción antigénica reconocida por 4B3 situada en 105 kDa, aparentemente AgB, está posiblemente en menor concentración en tenias comparado con cisticercos y

ello plantea 2 incógnitas 1) que región antigénica cruza con paramiosina y 2) cual es el motivo de que haya menor concentración de paramiosina en parásitos adultos con respecto a cisticercos (Figura 7.B).

El análisis de la organización tisular de lo reconocido por 4B3, en cisticercos como en tenias adultas, es distinta: en cisticercos el principal reconocimiento del AcM esta a nivel de fibras musculares situadas en el canal espiral, las que observadas a mayores aumentos presentan aparentemente una organización ordenada (Figura 11.A), que en la pared vesicular es de organización diferente (Figura 11.B). Esto podría ser explicado en función de las necesidades de los diferentes estadios parasitarios, ya que en el caso de la tenia invaginada, la disposición de fibras musculares podría tener relación con el estado en reposo que guarda el parásito y no así en el caso del cisticerco el cual se encuentra activo dentro de su hospedero, por lo que requiere una organización diferente de sus músculos para efectuar sus funciones de sobrevivencia. En este sentido, Slaiss propuso que la tenia invaginada tiene una disposición especial de las fibras musculares las que favorecen la evaginación del parásito y aparentemente son de función diferente en los cisticercos (70).

Al observar lo reconocido por 4B3 a nivel de tejido parasitario adulto, la disposición de la marca fluorescente tuvo una distribución diferente de acuerdo a las regiones del parásito analizadas. En el escólex, la marca estuvo concentrada principalmente en ventosas y rostelo (Figura 14.A y 14.B). Esta distribución podría tener relación con la fortaleza necesaria, dada por las fibras musculares, para que esta porción parasitaria se sostenga firmemente al intestino

del ser humano y del hámster. A nivel de cuello, la marca por 4B3 se distribuye de manera diferente a lo observado en escolex, ya que el orden de las fibras musculares en este nivel sugiere tener tal disposición para el sostén de el parásito en la luz intestinal, lo cual implicaría que esta porción parasitaria es muy resistente. Estas afirmaciones tendrían relación con lo establecido por Lumsden, quien afirma que la distribución de algunas fibras musculares en los céstodos es importante en el mantenimiento del parásito frente al embate de los movimientos peristálticos intestinales y ello evita su expulsión (2). En relación a los proglótidos observados, tomando en cuenta que los analizados fueron los mas lejanos al escólex y cuello, la distribución de lo reconocido por 4B3 mostró que en estas regiones parasitarias, hay aparente desorden de las fibras musculares (Figura 15.B), no así en los bordes de los mismos y ello tendría relación con la relajación de las estructuras musculares a estos niveles. Esta relajación tendría tal disposición para facilitar la expulsión de los proglótidos finales, ya que en condiciones experimentales la tenia adulta no requiere una completa madurez para eliminar sus proglótidos terminales (Benitez M. comunicación personal), y en condiciones naturales sí hay eliminación de proglótidos maduros. Estas consideraciones indican que la resistencia de un proglótido, comparada con la del cuello, podría ser menor y con ello pueden ser más fácilmente separados del parásito. Si el análisis inmunocitoquímico por el ACM 4B3 pudiera ser efectuado en cortes de tenias de origen humano, la intensidad de marca fluorescente sería mayor, y posiblemente se detectarían otras estructuras involucradas y ello basado en

la diferencia de reacción presentada por 4B3 hacia extracto crudo de tenias de humano y de hámster por ELISA (Fig.6).

En relación con el análisis inmunohistoquímico con el AcM 8D sólo hubo reconocimiento a cortes de cisticercos a nivel de su espacio intersticial. En el caso de tenias de hámster, en los cortes analizados, no se observó reactividad del monoclonal 8D hacia alguna región del parásito. Estas observaciones tienen relación con lo determinado en los ensayos de ELISA, ya que el antígeno reconocido por 8D a nivel de tenias de humano puede no encontrarse en tenias de hámster, y lo cual podría estar asociado al desarrollo parasitario dependiendo del hospedero como ya fue mencionado. Sólo efectuando análisis con tejido de tenias adultas de origen humano se podrá definir la localización de lo reconocido por 8D.

De esta manera el presente trabajo formó una pequeña parte de un proyecto en común cuyo objetivo es proveer de tecnología de vanguardia para mejorar el diagnóstico específico de Teniosis, de ésta manera la caracterización inmunoquímica e inmunohistoquímica de anticuerpos monoclonales ha sido descrita como apoyo base para pretender dar un panorama más grande del o los anticuerpos en cuestión (48,63,78).

Además al caracterizar inmunohistoquímicamente, éstos anticuerpos se permitió abrir un campo más de estudio, en relación a la proteína muscular localizada, la cual podría aportar mayor conocimiento de la fisiología de *Taenia solium* en sus fase metacéstodo y adulto, esperando de igual forma que aporte a futuro datos importantes que expliquen la relación hospedero-parásito en la Teniosis.

## CONCLUSIONES

Los Anticuerpos monoclonales caracterizados, son IgG1 que tienen diferente reconocimiento. El ACM 4B3 reconoce antígenos de ténidos, lo cual ocasiona que sea específico de género, 8D por su parte, reconoció antígenos de *T. solium* y ello lo hace específico de especie.

El Anticuerpo monoclonal 4B3, podría ser un candidato para diagnóstico de adultos de *Taenia solium* en hámsteres infectados, ya que tiene la capacidad de reconocer antígenos liberados en heces durante todos los tiempos de infección.

El Anticuerpo Monoclonal 8D reconoció un epítipo en antígenos de adultos de *T. solium* de humano que no es detectado en tenias de hámster. Esto hace suponer que a pesar de que las características morfológicas y morfométricas sean semejantes entre las tenias recuperadas de hospederos diferentes, hay antígenos distintos y ello podría deberse a que la infección en hámster no es natural, sino inducida. Esta también podría ser la explicación del diferente reconocimiento de 4B3 hacia antígenos de tenias de origen humano y experimental.

4B3, es un anticuerpo monoclonal que reconoce un epítipo común en proteínas localizadas en las fibras musculares de cisticercos y adultos de *T. solium*. Las proteínas reconocidas pueden ser derivados de miosina y la paramiosina caracterizada en cisticercos.

El ACM 4B3 permitió profundizar en el estudio de una proteína muscular que podría aportar mayor conocimiento de la fisiología de *Taenia solium* en sus fases de metacéstodo y adulto; además, este conocimiento generado facilitaría más elementos que expliquen como se mantiene la relación hospedero-parásito en la Teniosis.

## APENDICE

### 8.1 CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

La técnica empleada para la determinación de proteínas esta basada en un microensayo (BIO-RAD Protein Assay 500-0006, 500-0001) modificado y originalmente propuesto por Bradford en 1976. Este método se basa en el viraje proporcional del azul brillante de coomasie G-250 con respecto a la concentración de proteínas, el colorante se une a residuos de arginina y en menor proporción a histidina, lisina, tirosina, triptofano y fenilalanina.

Para la determinación de proteínas, se usó una proteína estandar (Albumina), y se hizo la siguiente distribución:

tubo	Agua destilada ( $\mu$ l)	$\mu$ l de albumina (mg/ml)	Ractivo de Bradford ( $\mu$ l)
1	800	0	200
2	795	5	200
3	790	10	200
4	785	15	200
5	780	20	200
muestra	800-vol.muestra	vol. muestra	200
blanco	800	0	200

Posterior a la preparación de los sistemas se adicionó finalmente el reactivo de Bradford, se mezcla el contenido de los tubos en vortex y se dejan reposar durante 20 min. Las lecturas de las reacciones coloridas se realizan en un espectrofotometro a 595 nm. Con los valores de absorbancia obtenidos con la proteína estandar se realiza una regresión lineal y con ella se calcula de acuerdo a la absorbancia dada por la muestra en cuestión su concentración.

**Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254.**

## 8.2 TINCION CON AZUL DE COOMASSIE

Después de una electroforesis, el gel es colocado en la solución de teñido durante 2 hr o toda la noche.

La solución de teñido consiste en:

Azul de Coomasie(R-250)	300 mg
Metanol al 30%	150 ml
Acido acético al 10%	50 ml
Agua destilada desionizada	c.b.p 300 ml

Posterior al teñido del gel, se quita el exceso de colorante mediante lavados con una solución de ácido acético al 10%. En caso de que el teñido sea intenso, o se desee un desteñido más rápido, se puede aplicar calor durante éste. El desteñido puede ser más eficiente utilizando una mezcla de metanol Ac.AcO (5:1).

Harlow, L.; Lane, D. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. PP. 649.

Meyer, T.S.; and Lamberts, B.L. 1965. Use of Coomasie brilliant blue R-250 for electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Bioch. Bioph. Act.* 107:144-145.



### 8.3 TINCIÓN CON NITRATO DE PLATA.

#### REACTIVOS.

- \* Solución stock Ditiotreititol (DTT) a 20 mg/ml.
- \* Agua destilada/desionizada.
- \* Tiosulfato de sodio pentahidratado Sol. stock 100mg/ml.
- \* Solución de nitrato de plata:

Nitrato de plata	0.8 g
Hidróxido de sodio 0.4%	20 ml
Hidróxido de amonio concentrado	1.5 ml

Mezclar el hidróxido de sodio con el hidróxido de amonio, diluir el nitrato de plata en 4 ml de agua destilada desionizada y adicionar gota a gota y en agitación a la solución de hidróxido de sodio e hidróxido de amonio, aforar a 100 ml con agua destilada desionizada.

- \* Solución de desarrollo:

Formaldehído en solución concentrado	200 $\mu$ l
Acido cítrico 1%	2.5 ml
Tiosulfato de sodio pentahidratado	
Sol. stock 100mg/ml	20 $\mu$ l

Mezclar y aforar a 500 ml con agua destilada/desionizada.

- \* Solución de lavado: metanol al 50% y ácido acético al 5% en agua destilada/desionizada.

- \* Solución de almacenamiento: etanol o metanol al 10%.

**PROCEDIMIENTO**

1. - Después de desteñir el gel con ácido acético, lavar 3 veces con agua bidestilada/desionizada durante 5 min c/u.
2. - Tomar 12.5  $\mu$ l de sol. stock de DTT y llevar a 50 ml de etanol al 50%.
3. - Adicionar esta solución al gel por espacio de 1 hora.
4. - Lavar el gel con 150 ml de agua destilada/desionizada.
5. - Tomar 200  $\mu$ l de una sol. stock de Tiosulfato de sodio pentahidratado y llevar a 100 ml con agua destilada/desionizada.
6. - Desechar el agua del gel e incubarlo con esta solución durante 1 min.
7. - Lavar el gel 3 veces con 100 ml de agua destilada desionizada durante 20 seg. c/u.
8. - Desechar el agua y adicionar 100 ml de la solución de nitrato de plata e incubarlo durante 30 min.
9. - Lavar 3 veces el gel con 150 ml de agua destilada desionizada por 5 min c/u.
10. - Desechar el agua y adicionar 150 ml de la sol. de desarrollo e incubar hasta que aparezcan las bandas en el gel.
11. - Desechar la sol. de desarrollo y adicionar 100 ml de solución de lavado y dejarla por 10 min. Almacenar el gel en 100 ml de metanol o etanol al 10% a 4°C.

Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, P.V., and Hancock, R. 1981. Silver Staining of proteins in Polyacrylamide Gels. *Anal. Biochem.* 118: 197-203.

#### 8.4 TINCION CON ROJO DE PONCEAU S.

Preparar una solución stock de Ponceau S (20mg/ml) en ácido tricloro acético al 30%. El stock se diluye en ácido acético al 1% dando una concentración final de Ponceau S de 0.2%.

Se incuba la membrana en Ponceau S por 2 min; y el exceso de colorante se lava con agua destilada hasta que aparezca el bandeo correspondiente. Posteriormente se prosigue con la inmuno-electrotransferencia y la reacción colorida desaparecera conforme se lave a la membrana.

*Harlow, L.; Lane, D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. PP. 494.*

### 8.5 INDUCCION DE LIQUIDO DE ASCITIS.

1. A un ratón adulto de aproximadamente 6 semanas de edad, genéticamente igual del que surgieron los hibridomas se le inyectan 0.5 ml de pristane (2,6,10,14-tetramethyl-penta decane) o adyuvante incompleto de Freund en la cavidad peritoneal.

2. Después de 7-14 días serán inyectadas aproximadamente 5 millones de células (hibridoma) recién cultivadas por vía intraperitoneal. La selección de las células estará basada en su rápido crecimiento; las cuales una vez seleccionadas serán centrifugadas y resuspendidas en no más de 0.5 ml de SSAF. (Solución salina amortiguada con fosfatos).

3. El fluido ascítico puede comenzar a establecerse dentro de 1-2 semanas siguientes a la inyección de las células, dependiendo de la capacidad de crecimiento en cav. peritoneal de los hibridomas.

*Harlow, L., Lane, D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. PP. 123.*

## REFERENCIAS

1. Acha, P.; and Pszifres, B. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2a ed. Organización Panamericana de la salud. Publ. Cient. Washington. USA. pp. 503.
2. Arme, C.; and Pappas, P.W. 1983. Biology of the Eucestoda. The fine structure of adult tapeworms. Academic Press. London. pp. 190-205.
3. Aguilar, V.L. 1995. Efecto de la carga parasitaria y la dosis del esteroide metil prednisolona en el desarrollo del estadio adulto de *Taenia solium* en el modelo experimental del *Mesocricetus auratus*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F. PP:1-81.
4. Alcántara, P.; Meza, A.; Mata, O.;, Correa, D. 1994. Manual de Diagnóstico de Cisticercosis y Trichinellosis. II Curso Teórico-Práctico. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. pp.2,10,24,32.
5. Allan, J.C. 1990. Coproantigens in intestinal cestode infection. Thesis for Ph.D. University of Liverpool. pp.34-46.
6. Allan, J.C.; Avila, G.; Garcia Noval, J.; Flisser, A.; and Craig, P.S. 1990. Immunodiagnosis of Teniasis by coproantigen detection. Parasit. 101:473-477.
7. Allan, J.C.; Mencos, F.; Garcia Noval, J.; Sarti, E.; Flisser, A.; Wang, Y.; Liu, D.; and Craig, P.S. 1992. Dipsticks dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. Parasit. 107: 79-85.
8. Aluja, A.; Escobar, A.; Escobedo, F.; Flisser, A.; Lacleste, J.P.; Larralde, C.; Madrazo, I.; Velazquez, V.; y Willms, K. 1987. Cisticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Biblioteca de la Salud. Inst. Nac. de Sal. Pub. Fondo de Cultura Económica. México D.F. pp:23-32.

9. Avila, R.G. 1992. Detección de antígenos de *Taenia solium* en heces por un método inmunoenzimático. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp.1-122.
10. Botero, D.; Escobedo, F.; Larralde, C.; Schantz, P.; y Schenone, H. 1993. Epidemiología y Control de la Teniasis/Cisticercosis en América Latina. OPS/OMS. Version 2.0. pp.1.2-1.5
11. Bradford, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72:248-254.
12. Burnette, W.N. 1981. Western blotting: Electroforetic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiiodinated protein A. Anal Biochem. 112:185-203.
13. Cañedo, L.; Lacllette, J.P.; and Morales, E. 1982. Evagination of the Metacestode of *Taenia solium*. In: Flisser, A.; Willms, K.; Lacllette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives. Academic Press. New York. USA. pp. 363-374.
14. Correa, D.; Morales, Z.; Medina, Y.; Garcia, C.; Medina, M.E.; Mandujano, A.; Ortiz, D.; Meza, A. 1991. Teniasis y Cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de nuevos y viejos descubrimientos. Publicación técnica del Instituto Nacional de Referencia y Diagnóstico Epidemiológicos México D.F. pp. 3-28.
15. Craig, P.S.; Macpherson, C.N.L.; and Nelson, G.S. 1986. The identification of eggs of *Echinococcus* by immunofluorescence using anti-oncospherical monoclonal antibody. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 152-158.
16. Chaicumpa, W.; Yuwaporn, R.; Buri, D.; Chongsua, M.; and Echeverria, P. 1992. Diagnosis of typhoid fever by detection of *Salmonella Typhi* antigen in murin. J. Clin Microbiol.; 30(9): 2513-2515.

17. Chapman, A.; Vallejo, V.; Mossie G.K.; Ortiz, D.; Agabian, N.; and Flisser A. 1995. Isolation and Characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg Detection Assay. *J. of Clin. Microbiol.* 33 (5):1283-1288.
18. Cheng, C.T. 1978. *Parasitología General*. Editorial Delta. A. C. España. pp.234-246.
19. Chester, P.; Clifton, J.; Wayne, E.C. 1986. *Parasitología Clínica*. Salvat Editores. México D.F. pp.125-137
20. Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. 1990. *Molecular Cell Biology. Actin, Myosin and Intermediate Filaments*. 2a ed. Scient. Amer. Books. New York. USA. pp.859
21. Djondjurov, L.; y Holtzer, H. 1979. A Method of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate. Poliacrilamide Gels. *Anal. Bioch.* 94:274-277.
22. Dowben, R.M. 1969. *General Physiology. An molecular approach Contractility*. Harper International. pp.499.
23. Flisser, A. 1988. Neurocysticercosis in México. *Parasit. Today.* 4:131-137.
24. Flisser, A.; Reid, A.; Garcia Zepeda, E.; Mcmanus, D.P. 1988. Specific detection of *Taenia saginata* eggs by hibridization. *Lancet.* 1429-1430.
25. Flisser, A. 1994. Teniasis y Cysticercosis due to *Taenia solium*. In *Process of clinical parasitology*. Tsich, Sun. (ed). CRC Press. Inc New York. 4:77-116.
26. Gemmell, M.; Matyas, Z.; Pawlowsky, Z.; and Soulsby E.J.L. 1983. Guidelines for surveillance, prevention and control of Teniasis-Cysticercosis. WHO. Publication VPH/83.49 Switzerland. pp.207.
27. Giese, A.C. 1973. *All Phisiology. The Chemical Basis of contractility*. 4th ed., Sanders Company. pp.630.
28. Goding, W. J. 1983. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, Inc. Orlando Florida. USA. pp.56-87.

29. Groth, F.; Scheidegge, D. 1980. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J. Immunol Meth.* 35:1-21.
30. Guerra, G.; Flisser, A.; Cañedo, L.; Lacleste, J.P. 1982. Biochemical and Immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Lacleste J.P, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. USA. pp.437-451.
31. Harlow, E.; Lane, D. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. USA. pp.139-242,274,473-599.
32. Heath, D. 1982. In vitro culture of cysticerci: an aid to investigations of morphological development and host-parasite relationships. In: Flisser A, Willms K, Lacleste J.P, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press: New York. USA. pp. 477-493.
33. Hawkes R. 1986. The dot immunobinding assay. *Meth. Enzimol.* 121:484-491.
34. Kassai, T.; Cordero, M.; Euseby, J.; Gaafar, S.; Hiepe, Th.; and Himonas, C.A. (1988). Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). *Veter. Parasitol.* 29:299-326.
35. Kohler, G.; and Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefinid specificity. *Nature* 256:495-497.
36. Lacleste, J.P.; Ornelas, Y.; Merchant, M.T.; and Willms, K.; 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In: Flisser, A.; Willms, K.; Lacleste, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; and Beltran, F. (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. USA. pp.375-388.
37. Lacleste, J.P.; Merchant, M.; and Willms, K. 1987. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 73: 121-129.



38. Laclette, J.P.; Landa, A.; Arcos, L.; and Willms, K.; 1991. Paramyosin is the Schistosoma mansoni (Trematoda) homologue of antigen B from Taenia solium (Cestoda) Mol. Biochem. Parasitol. 44:287-296.
39. Lefkovits, Y.; and Waldman, H. 1984. Limiting dilution analysis of cells of the immune system. II: What can be learnt? Immunol. Today. 5(10):295-298.
40. Lefkovits, I.; and Waldman, H. 1984. Limiting dilution analysis of the cells of immune system. I: The clonal basis of the immune response. Immunol. Today. 5(9):265-268.
41. Lehninger, L.A. 1978. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. Biosíntesis de Nucleótidos. 2a ed. Ed. Omega S.A. Barcelona. pp 739-756.
42. Lenoble, E.; and Demontier, C. 1988. Perforations of the small intestine and intestinal parasitic diseases. Apropos of a case of peritonitis caused by perforation of the small intestine combined with Taenia saginata infection. J. Chir. Paris 125: 350-352.
43. Lumsden, R.D.; Voge, M.; and Sogandares-Bernal, F. 1982. The metacystode tegument: Fine structure, development, topochemistry, and interactions with the host. In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives. Academic Press. New York: USA. pp. 307-361.
44. Mahajan, R.C. 1982. Geographical distribution of human cysticercosis. In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives. Academic Press. New York. USA. pp.39-46.
45. Medina, Y.; Correa, D.; Olivera, H.; y Soler, C. 1995. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen III. Producción de Anticuerpos Monoclonales. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos SSA. México D.F. pp. AcM5-AcM41.
46. Meyer, T.S.; and Lamberts, B.L. 1965. Use of coomasie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. Biochi. Bioph. Act. 107: 144-145.

47. Milstein, C. 1980. Monoclonal Antibodies. Scientific American 243:56.
48. Mohamed, Zad A.; Norell, D.; Dreuwke, K.; Rene, J.M.; Van, Z.; and Andre, M.D. 1994. Immunologic Characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* egg antigen. American Journal Trop. Med Hygien. 50(4):487-498.
49. Morell, C.M. 1984. Genes and antigens of parasites. A Laboratory Manual. 2nd ed. Instituto Oswaldo Cruz. Brasil. pp.433-478.
50. Mueller, U.M.; Hawes, C.S.; and Jones, W.R. 1986. Monoclonal antibody by hybridoma growth in Freund's adjuvant primed mice. J.Immunol. Meth. 87:193-196.
51. Omer Ali, P.; Mansoni, M.; Woody, J.N.; Smithers, S.R.; Simpson, A.J. 1989. Antibody to carbohydrate and polypeptide epitopes on surface of Schistosomula of *Schistosoma mansoni* in Egyptian patients with acute and chronic Schistosomiasis. Parasitology. 98:417-424.
52. O'Sullivan, M.V.; Bridges, J.W.; and Marks, V. 1979. Enzyme Immunoassay a review. Ann. Clin. Bioch. 16:221.
53. Ouchterlony, O.; and Nilson, L.A. 1986. Immunodifusión and immunoelectroforesis. Chapter 32; in; Hand book of Experimental Immunology. Weir D.M (ed) Blackwell. Vol 1.
54. Panzari, A.; Castoldi, F.; and Unidiano, D. 1965. Acute apendicitis due to taeniasis (*Taenia solium*). Med. Oanam. 23:112-113.
55. Plane, P.; Ronceray, J.; and Dubin P. 1980. Acute pancreatitis from obstruction of Wirsung's canal by *Taenia saginata*. J. Chir. Paris. 117:194-193.
56. Plancarte, A.; Flisser, A.; and Larralde, C.; Fibronectinlike properties of antigen B form cysticerci of *Taenia solium*. In: Flisser, A.; Willms, K.; Lacleste, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F.(eds). Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives. Academic Press. New York. USA. pp. 453-463.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

57. Ploem, J.S. 1967. The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie*. 68.
58. Porstmann, T.; and Kiessig, S.T. 1992. Enzyme immunoassay Techniques. *J. Immunol. Meth.* 150:5-21.
59. Rabiela, M.T.; Rivas, A.; Castillo, S.; Gonzalez-Angulo, A.; . 1985. Pruebas morfológicas de que *Cisticercus cellulosae* y *Cisticercus racemosus* son larvas de *Taenia solium*. *Arch. Invest. Med. México*. 16:83-86.
60. Rabiela, M.T.; Rivas, A.; Flisser A. 1989. Morphological types of *Taenia solium* cysticercos. *Parasitology Today*. 5:357-359.
61. Ramirez-Bon, E.; Merchant, M.; González-del Pliego, M.; and Cañedo, L. 1982. Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. In: Flisser, A.; Willms, K.; LaClette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). *Cysticercosis: Cysticercosis: Present status knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. USA. pp. 261-280.
62. Roit, Y.; Brostoff, J.; Male, D. 1991. *Inmunología*. 2a ed. Ed. Salvat. pp. 2-512.
63. Sanchez, M.R.; Ramirez, J.A.; Larriva-Sahd, J.; Rodriguez, M.H.; Mancilla, R.; Ortiz, L. 1994. Antigen characterization of *Plasmodium vivax* with monoclonal antibodies. *Am. J. of Med. and Hyg.* 51(1):60-67.
64. Sarti, E. 1989. Epidemiología de la Teniasis/Cisticercosis. En: Flisser, A.; Malagón, F. (eds) *Cisticercosis Humana y Porcina. Su conocimiento e investigación en México*. CONACyT y Limusa Noriega. México 233-242.
65. Sarti, E.; Schantz, P.M.; Plancarte, A.; Wilson, M.; Gutierrez, I.O.; Lopez, A.S.; Roberts, J.; and Flisser, A.; 1992. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* Taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a Village in Morelos, Mex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(6):677-685.
66. Schall, R.F.; Tenoso, J.H. 1981. Alternatives to radioimmunoassay: Labels and methods. *Clin Chem.* 27:157.

67. Schenone, H.; Villaroel, F.; Rojas, A.; and Ramirez, R. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. USA. pp. 25-38.
68. Shantz, P.M.; and Sarti, E. 1989. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia*. 57:153-163.
69. Shapiro, A.; Viñuela, E.; and Maizel, J. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrilamide gels. *ioch. Biophys. Res. Comm.* 28(5):815-820.
70. Slais, J. 1982. Morphological of the scolex of *cisticercus cellulosae* in brain cysticercosis. En: Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C.; Beltran, F. (eds). *Cysticercosis: Present states knowledge and perspectives*. Academic Press. New York. pp.235-299.
71. Smyth, J.D.; and McManus, D.P. 1989. *The physiology and biochemistry of cestodes*. Cambridge University Press. Great Britain. pp.5-51
72. Soulsby E.J.L. 1988. *Parasitología y Enfermedades parasitarias en los animales domesticos*. 7a edición. De. Interamericana. México D.F. pp. 105-117.
73. Stites, D.; Terr, A. 1993. *Inmunología Básica y Clínica*. 7a edición. El Manual Moderno. México D.F. pp. 274-287.
74. Straka, S.; Skracikova, M.; Michal, L.; y Konvit, I.; 1989. Evaluation of ovosopic method in the diagnosis of invasion with the tapeworm, *Taenia saginata*. *Cas lek. Cesk.* 128:56-58.
75. Stryer, L.1985. *Bioquímica. Biosíntesis de Nucleotidos*. 2a ed. Ed. Reverté S.A España. pp. 469-493.
76. Susumu, S.; Wichit, R.; Peng, G.; Takao, Y.; Tadashi, W.; Nobuo, S.; and Fujiro, S. 1994. Characterization of recognition specificity of autoreactive, polyspecific monoclonal antibodies obtained from spleen cells of parasite-infected BALB/c mice. *Parasite Immunology*. 16: 609-617.

77. Towbin, H.; Staehelin, T., and Gordon, J. 1979.  
Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide  
gels to nitrocellulose sheets. Proc.Nat.Acad.Sci.USA.  
76:4350-4354.
78. Van Dam, G.J.; Kornellis, D.; Van Zeyl, R.; Rotmans, J.P.;  
Deelder, A.M. 1993. *Schistosoma mansoni*: analysis of  
monoclonal antibodies reactive with gut-associated  
antigens. Parasitology Research. 79:55-62.
79. Williams, J.F.; Engelkirk, P.G.; y Lindsay, M.C. 1982.  
Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En:  
Flisser, A.; Willms, K.; Lacleste, J.P.; Larralde, C.;  
Ridaura, C.; Beltran, F (eds). Cysticercosis: Present  
states knowledge and perspectives. Academic Press. New  
York. pp.621-632
80. Wray, W.; Boulikas, T.; Wray, P. V.; Hancock, R. 1981.  
Silver Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels.  
Anal.Bioch. 118: 197-203.