

4/  
2ej.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“DETECCION DE MIOSINA DE PARASITOS ADULTOS DE *Taenia Solium* EN FLUIDOS BIOLÓGICOS RECUPERADOS DE INFECCIONES EXPERIMENTALES Y NATURALES.”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
**P R E S E N T A :**  
**JOSE ARMANDO MARTINEZ GUARNEROS**

ASESOR: MIBB. JAVIER AMBROSIO HERNANDEZ.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

260665.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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



Departamento 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 la TESIS:

Detección de miosina de parásitos adultos de Taenia solium  
en fluidos biológicos recuperados de infecciones experimentales  
y naturales.

que presenta el pasante: Martínez Guarneros José Armando.  
con número de cuenta: 8808105-6 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida 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"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 20 de Febrero de 1998

PRESIDENTE	<u>M.V.Z. J. Pablo Martínez Labat</u>	
VOCAL	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
SECRETARIO	<u>M.en C. Javier R. Ambrosio Hernández</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>O.F.H. René Damián Santos</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.en C. Andrés Romero Rojas</u>	

**ESTE TRABAJO FUE ELABORADO EN LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM. EN EL LABORATORIO DE LA DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH, EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGIA. BAJO LA DIRECCIÓN DEL: MIBB JAVIER AMBROSIO HERNANDEZ. CON EL APOYO DE DGAPA BAJO EL PROYECTO No IN200297.**

*Por que yo creo en las cosas,  
en los seres que me han hecho conocer,  
son los únicos que tomo en serio todavía  
Y que aun me hacen feliz. (Proust).*

*A mis padres:*

*María de Jesús G. y Florancio M.†*

*Por que por ustedes he logrado uno de mis mayores sueños  
Por creer en mí, por todo el sacrificio que a diario me brindaron  
Y por ser las personas a quien más quiero.*

*A mis hermanos:*

*Por compartir conmigo todos estos años.  
Espero que sean muchos más y que este logro que  
Comparto con ustedes también los haga felices.*

*A mis amigos de la J.E.S.C.:*

*Julio F. La nana y poneros (los Rubenos). Hugo. El Pato.  
Arturo V. Claudia Y. Rafael; por todos aquellos momentos  
que compartimos juntos (y compartiremos),  
y muy en especial a Mariola Narvaez.  
Por todo este tiempo en que me ha soportado.*

*A mis compañeros del laboratorio:  
May, Oli, Lau, Eli, Odo, Hugo, Toño, Víctor y David  
por todos los consejos y ayuda recibida  
gracias por ser como son (hojala y nunca cambien)*

*Agradesco en especial a mi director y asesor de tesis MIBB. Javier Ambrosio.  
Por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y al Maestro. Angel Martínez.  
Por que ambos me han enseñado lo interesante y apasionante que puede ser la ciencia.*

*Agradesco a la Dra. Ana Flisser por darme la oportunidad de pertenecer a  
Su laboratorio.*

*Agradesco a mis sinodales la revisión de esta tesis.  
MVZ. Pablo Martínez Labat.  
Dra. Susana E. Mendoza Elvira.  
MIBB. Javier Ambrosio H.  
QFB. René Damián Santos.  
M en C. Andras Romero R.*

## CONTENIDO.

	Página
RESUMEN.	i
ABREVIATURAS.	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.	v
I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Enfermedad parasitaria.	1
1.2. Generalidades sobre el parásito.	3
1.3. Ciclo biológico.	7
1.4. La relación hospedero-parásito.	8
1.5. El modelo experimental de teniosis.	9
II. JUSTIFICACIÓN.	11
III. HIPÓTESIS.	12
IV. OBJETIVOS.	12
V. MATERIAL Y MÉTODOS.	13
5.1. Obtención de parásitos de <i>Taenia solium</i> .	13
5.2. Infestaciones experimentales de teniosis.	14
5.3. Infestaciones naturales de teniosis.	16
5.4. Obtención de miosina de parásitos de <i>Taenia solium</i> .	17
5.5. Preparación y purificación de anticuerpos.	18
5.5.1. Anticuerpos policlonales antimiosina.	18
5.5.2. Anticuerpos monoclonales 4B3 antimiosina.	20
5.6. Estandarización de la captura de miosina en materia fecal y el suero.	22
5.7. Captura de miosina en materia fecal y suero.	23
5.7.1. Hámster.	23
5.7.2. Humano.	24

VI. RESULTADOS.	25
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	38
VIII. CONCLUSIONES.	46
IX. APÉNDICE.	48
9.1. Detección de proteínas (micrométodo colorimétrico).	48
9.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.	50
9.3. Análisis, aislamiento, purificación y marcaje enzimático de anticuerpos.	53
9.4. Determinación de la actividad biológica de anticuerpos.	57
X. REFERENCIAS.	58

## RESUMEN.

El complejo teniosis- cisticercosis por *T. solium* es una parasitosis ampliamente distribuida en nuestro país y es considerada como un serio problema de salud pública proponiéndose que uno de los aspectos claves en el control de la enfermedad es la detección y tratamiento de los individuos portadores del parásito adulto, esto ha motivado que se busquen métodos de diagnóstico más eficientes, que los análisis coproparasitoscópicos convencionales los cuales presentan una sensibilidad baja (60%), y estos no son adecuados para la detección específica de las tenias en humanos infestados. Usando el modelo experimental de teniosis en el hámster dorado recientemente con el anticuerpo monoclonal 4B3 (AcM-4B3) se ha demostrado la existencia de una proteína estructural, una miosina tipo II, la cual es liberada en la materia fecal de los animales infestados; con base en estos resultados previos se prepararon anticuerpos policlonales específicos contra miosina de cisticercos de *T. solium*, los cuales se purificaron por precipitación en sulfato de amonio saturado y por cromolitografía de afinidad, de igual forma se realizó la purificación de los AcM-4B3 obtenidos a partir de líquido de ascitis, y fueron marcados enzimáticamente con fosfatasa alcalina, una vez que se tenían ambos anticuerpos se estandarizó un ELISA de captura, con muestras de animales infestados con 5 cisticercos de *T. solium*, a los cuales se les hizo una recolección periódica de sangre y materia fecal durante el tiempo en que duró la infestación. Para la estandarización del ELISA en el caso de humanos las muestras fueron recolectadas de un estudio tendiente a identificar, mediante clínica, a portadores de teniosis.

Como fue demostrado anteriormente por Ambrosio et al (1997), se logró determinar la cinética de aparición de miosina en la materia fecal y el suero de los animales infestados experimentalmente y la cual corresponde al desarrollo de la infestación. Aparentemente, la cantidad mínima de miosina detectada es de 8 ng/ml lo cual podría indicar la alta sensibilidad del sistema, y cuando se estudió el efecto de un tratamiento cestodocida sobre la liberación de la miosina por parte de los parásitos se observa que existe un ligero aumento de esta en las muestras de heces una semana después del tratamiento, sin embargo en el suero de los animales, (el cual fue tratado previamente con ácido tricloroacético al 2% para liberación de

complejos inmunes) se observa que el aumento de la cantidad de miosina se incrementa una semana después para disminuir al estado basal en la semana siguiente; de la misma forma es posible determinar la presencia de la miosina en las muestras recolectadas de materia fecal y suero de los humanos estudiados.

Sin embargo es necesario disminuir el fondo de reacción, el cual podría interferir en algún momento en la determinación, así como el uso de un banco de muestras bien establecido que permita hacer uso de un análisis estadístico confiable, por lo que estos estudios sentarían las bases necesarias para el desarrollo de un método de diagnóstico más efectivo, esto se basaría en el hecho de que la liberación de la miosina en el modelo animal se incrementa durante el tiempo de la infestación, luego de una quimioterapia se podría evaluar la presencia del parásito dentro de su hospedero. Como fue indicado anteriormente la captura de la miosina en forma específica, sensible y con reactivos definidos podría tener una aplicación importante para el diagnóstico y la evaluación de tratamientos empleados en este tipo de parasitosis.

**ABREVIATURAS.**

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amonio saturado al 33%.
4-NFF	4-nitrofenilfosfato.
Ac Pol	anticuerpos policlonales
AcAcO	ácido acético.
ACF	adyuvante completo de Freund.
AcM	anticuerpos monoclonales 4B3.
AcM 4B <sub>3</sub>	anticuerpo monoclonal específico para miosina de <i>Tenia solium</i> .
ACMP	anticuerpo monoclonal purificado.
AG 8	sobrenadante de cultivo de células del mieloma AG8.
AIF	adyuvante incompleto de Freund.
ASB	albúmina sérica bovina fracción V
ATAcO	ácido tricloroacético al 2%.
CPS	exámenes coproparasitológicos.
DAB	3,3'-diaminobenzidina.
SDS	dodecilsulfato de sodio
EDTA	Ac. etilendiaminotetracético.
ELISA	Enzyme Linked Immunoasorbent Assay.(ensayo inmunoenzimático)
FA	fosfatasa alcalina.
GEL POLI	electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
Ig	inmunoglobulinas.
IgGC	inmunoglobulina de conejo comercial.
IgGP	inmunoglobulinas purificadas por cromatografía de afinidad.
ASC	líquido de ascitis.
LiAPSA	líquido de ascitis precipitado en sulfato de amonio al 33%.
MAPS II	Affigel-protein A monoclonal Antibody Purificación Sistem II.
NC	membrana de nitrocelulosa.
OPD	o-fenilendiamina.

<b>P M</b>	<b>pesos moleculares de referencia preteñidos.</b>
<b>PMCB</b>	<b>p-hidroximercurobenzoato.</b>
<b>PMSF</b>	<b>fenilmetil -sulfonil-fluoruro.</b>
<b>PZQ</b>	<b>praziquantel</b>
<b>SCNI</b>	<b>suero de conejo no inmunizado</b>
<b>SHAM</b>	<b>suero hiperimmune antimiosina.</b>
<b>SNC</b>	<b>suero de conejo normal.</b>
<b>SPI</b>	<b>semanas post-infestación.</b>
<b>SPSA</b>	<b>suero precipitado en sulfato de amonio.</b>
<b>SSAF</b>	<b>solución salina amortiguada a fosfatos pH 7.2</b>
<b>V</b>	<b>volts.</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS.****Página**

Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i> .	2
Esquema de la infestación experimental.	15
Esquema de la recuperación de muestras en infestaciones naturales.	16
Modelo de ELISA de captura para miosina.	23
Semipurificación de miosina por electroforesis en gel de poliacrilamida.	25
Anticuerpos policlonales antimiosina (producción y titulación).	27
Anticuerpos policlonales antimiosina (purificación y evaluación).	28
Anticuerpos monoclonales 4B3 (purificación y evaluación).	29
Anticuerpos monoclonales 4B3 (marcaje enzimático y titulación).	30
Análisis de la miosina adicionada a heces.	31
Cinética de aparición de miosina durante la infestación experimental.	33
Detección de miosina en heces de humanos.	34
Análisis de la miosina adicionada a suero.	35
Cinética de aparición de miosina en suero durante la infestación experimental.	36
Detección de miosina en suero de humanos.	37

## **L- INTRODUCCION.**

### **1.1. La enfermedad parasitaria.**

La teniosis es una parasitosis generalmente asintomática de difícil diagnóstico clínico, ya que aunque se le pueden asociar molestias ligeras como debilidad, estreñimiento, anorexia, disminución de peso y cefaleas<sup>1,2</sup>, su presencia no representa serios daños en la salud de los individuos infestados y esto la hace diferente de la otra parasitosis provocada por el mismo parásito denominada cisticercosis, en donde los individuos infestados podrían estar afectados severamente sobre todo cuando los parásitos se encuentran alojados en el cerebro. Sin embargo, la importancia de encontrar o detectar a un individuo portador de una tenia está basada en que este parásito es un elemento clave para la transmisión y la presencia de cisticercosis, debido a este hecho en México ha sido legislada como una enfermedad importante por detectar, tratar y controlar<sup>3</sup>. Es conocido, que la sola presencia de un parásito adulto o tenia puede provocar que en las heces de la persona infestada, sean expulsados miles de huevos que contaminan el entorno y además, el desarrollo de cada huevo es una cisticercosis en potencia<sup>4</sup> y esto es muy importante sobre todo cuando los individuos participan en la preparación o producción de alimentos<sup>5,6</sup> o cuando están en una edad económicamente productiva.<sup>7</sup> Diferentes estudios de tipo epidemiológico<sup>1,5,6,8-10</sup> han demostrado que existe una alta asociación entre individuos con cisticercosis y los portadores de tenias, lo cual habla de la estrecha relación entre una parasitosis y otra. Esta asociación está claramente establecida por el ciclo de vida del parásito (Fig. 1).



disminución de individuos infestados con tenias hay impacto para que disminuyan los índices de cisticercosis porcina medida por anticuerpos anticisticerco<sup>18</sup>.

La detección de los individuos portadores de tenias no es simple, de forma tradicional se requiere una serie de exámenes coproparasitológicos de grado laboriosos y los cuales no son sensibles<sup>4,19,20</sup> y esto, ha motivado a la búsqueda de métodos de diagnóstico más simples, sensibles y específicos con los que podría facilitarse el control de esta enfermedad parasitaria<sup>20,21</sup>. Los métodos de diagnóstico que han sido desarrollados hasta la actualidad<sup>4,22</sup> al igual que los convencionales, tienen que enfrentarse a factores tales como la identificación precisa de las diferentes especies de tenias que infectan al hombre (*T. solium* y *T. saginata*) y cuando son aplicadas, al inadecuado diagnóstico clínico o al tratamiento médico por desconocimiento exacto de la parasitosis y la terapéutica específica, la carencia de medicamentos específicos o su elevado costo y el desconocimiento de los mecanismos que intervienen en la relación hospedero-parásito<sup>10,23,24</sup>. Todos estos factores forzosamente tienen que ser considerados al momento de definir cualesquiera de los métodos de diagnóstico seleccionados, así como el tipo de control y prevención de la enfermedad que se quiera aplicar<sup>12,14</sup>.

## 1.2. Generalidades sobre el parásito.

La teniosis es una enfermedad conocida desde los tiempos de Hipócrates<sup>4</sup> y que sin embargo, sólo hasta el año de 1856, se logró conocer el ciclo biológico completo cuando Kurchenmeister infestó a un presidiario con cisticercos y cuatro meses después recuperó al parásito adulto de *T. solium*<sup>25</sup>. Luego, después del conocimiento del ciclo de vida, la asociación entre la infestación con el estadio parasitario de metacéstodo o cisticerco y el parásito intestinal, fue establecida en diferentes publicaciones desde el año de 1990<sup>5,9,26,27</sup>. Los resultados que muestran riesgo de infestación de teniosis en algunos

de estos estudios, indican que la enfermedad está favorecida por las condiciones económicas y de salud de los individuos infestados.

Sin embargo, en publicaciones mas recientes, se ha demostrado la importancia del conocimiento de esta asociación ya que es una enfermedad de tipo contagioso que se puede presentar bajo cualquier circunstancia que la propicie <sup>6,16,24</sup> y que sobre todo podría tener reelevancia cuando los individuos migran de una zona endémica a zonas urbanas <sup>6,16,19</sup>.

La clasificación que se ha dado para los parásitos de *T. solium* (Linnaeus, 1758) está basada en varias características morfológicas importantes, las cuales serán descritas como sigue <sup>28,29</sup>, se les ha situado dentro del Phylum *Platyhelminthes*, debido a que cuando son parásitos adultos tienen un aspecto aplanado o acintado, con simetría bilateral, sin cavidad celomática. Dentro de la clase *Cestoidea*, ya que además de ser aplanados dorsoventralmente, son de tamaño variable y de constitución semejante, en la cual se puede diferenciar el escólex, el cuello y el estróbilo. Se les ha considerado dentro de la subclase *Eucestoda*, ya que las tenias tienen dentro de los proglótidos maduros un juego de órganos genitales masculinos y femeninos y porque la oncósfera tiene generalmente 6 ganchos. Se considera a estos parásitos dentro de la familia *Taeniidae* ya que su útero presenta un tallo longitudinal en la porción media y presenta ramas laterales, además de que los poros genitales dentro de los proglótidos están distribuidos normalmente de forma alterna.

El parásito adulto es conocido de manera convencional como “solitaria” porque normalmente los individuos sólo contienen a un ejemplar, sin embargo la forma larvaria o de metacéstodo es conocida comúnmente como cisticerco y en el caso de cerdos infestados, este estadio parasitario es denominado como “tomatillo”, “granillo” ó “zahuate” <sup>11</sup>.

### 1.2.1 Parásitos adultos o tenias.

Los parásitos adultos (Fig. 1A) habitan de manera natural en el intestino del ser humano, lugar en donde alcanzan su pleno desarrollo y donde llegan a medir de 1.5 a 5 metros de longitud. Este crecimiento es una de las características que diferencia a las tenias de *T. solium* con las de *T. saginata*, ya que llegan a alcanzar hasta 8 m de largo. Además, otra característica importante que diferencia a las tenias es que las de *T. solium* presentan una porción cefálica denominada escólex y el cual contiene un roseto armado con una doble corona de ganchos grandes y pequeños (22-36 ganchos). Como ya había sido establecido, estas estructuras anatómicas (ventosas y ganchos) son las responsables de que el parásito se ancle a la pared del yeyuno y gracias a ello, el parásito comience a crecer y a segmentarse desde el cuello. El proceso de segmentación genera una cadena estrobilar o estróbilo, en la que cada segmento es denominado proglótido.

A su vez, cada proglótido que se aleja del escólex cambia de tamaño, se hace más grande y se diferencia en tres diferentes tipos: proglótidos inmaduros, maduros y grávidos. La división de los proglótidos está basada en la evolución de sus órganos reproductores, por lo que en los inmaduros podrían no haber órganos reproductores o bien estos estarían afuncionales; en los maduros, considerados como unidades reproductoras independientes, los órganos reproductores son funcionales ya que poseen órganos genitales masculinos y femeninos bien diferenciados. El caso de los proglótidos grávidos es comparable con el de un saco lleno de huevos, ya que dentro de ellos se almacenan hasta 50000 huevos<sup>23,30-32</sup>.

### 1.2.2 Metacéstodos o cisticercos

Los cisticercos (Fig. 1B) son parásitos constituidos por una vesícula de diámetro aproximado a 0.5 y 2 cm, ovalada, translúcida y llena de un líquido denominado fluido vesicular. Una porción de la vesícula sufre una invaginación en donde se aloja el escólex de la tenia que cuando se dan las condiciones ambientales propicias, proporcionadas por el hospedero, evagina y se desarrolla hasta alcanzar el estadio de parásito adulto <sup>30</sup>.

Las condiciones que determinan la evaginación están dadas por la secreción de enzimas biliares y pancreáticas. Estos parásitos pueden tener diversas localizaciones dentro de un organismo infestado y por lo que pueden estar situados en cualquier tejido de cualquier órgano <sup>22,31</sup>. En el caso del ser humano, la localización de suma importancia médica, es en el sistema nervioso central, en donde los daños en la salud podrían llegar a ser muy graves <sup>32-36</sup>. La localización de los cisticercos cuando infectan a la población mexicana, es preponderantemente en cerebro y ojo, mientras que en otros países (sobre todo asiáticos) tienen una localización en músculos <sup>14,22</sup>. En lo relativo a la enfermedad provocada por estos parásitos, ha sido establecido que en la República Mexicana las zonas con mayor riesgo corresponden a las situadas en la zona del Bajío y que corresponden principalmente a zonas porcicultoras como el estado de Michoacán o bien, a aquellas zonas donde las condiciones de nivel de escolaridad son bajas y en donde se practica de manera habitual el fecalismo al aire libre y la crianza de cerdos intradomiciliariamente <sup>12</sup>.

### 1.2.3. Huevo.

Los huevos de *Taenia solium* (Fig. 1. C) son estructuras complejas preparadas para sobrevivir bajo condiciones extremas. Miden aproximadamente 4 µm de diámetro, se encuentran rodeados por una capa celular llamada vitelo de la que obtienen nutrientes,

este vitelo rodea al embrióforo que mantiene la integridad del parásito mantenido en un estado de latencia.

Dentro del embrióforo se encuentra la membrana oncosferal que cubre a la oncósfera o embrión hexacanto que es la forma latente del parásito. La constitución de estos huevos de *T. solium* les permite resistir al medio en que se encuentren, ya que dentro o fuera de los proglótidos, pueden mantenerse viables durante semanas o meses no importando que sean suelos húmedos y sombreados <sup>37,38</sup>.

### 1.3. Ciclo Biológico

El hombre es el hospedero definitivo de *T. solium* (Fig. 1A) porque en él se desarrolla la fase adulta del parásito, capaz de llevar a cabo la reproducción sexual. El hospedero intermediario natural es el cerdo (Fig. 1B), ya que le ofrece al parásito las condiciones necesarias para el desarrollo de las formas de metacéstodo. Cuando el hombre es infestado por el metacéstodo se sitúa como hospedero accidental (Fig. 1B') y esta forma de la parasitosis provoca un mayor daño a su salud <sup>19,30,39</sup>. Se considera, que el blanco óptimo y directo de ataque es la eliminación del parásito adulto; aunque también se considera que la prevención de la infestación en los cerdos, a través de la vacunación, podría permitir también el control de la infestación <sup>40,41</sup>. Independientemente del proceso de control aplicado, el freno de la presencia de portadores de parásitos adultos es el evento clave para un adecuado control de la parasitosis.

El parásito adulto de *T. solium* habita únicamente en el intestino delgado del ser humano, en donde llega a sobrevivir hasta 25 años. Como ya había sido mencionado, el parásito adulto contiene un estróbilo formado de proglótidos grávidos quienes, cuando se encuentra el parásito dentro del hospedero, pueden llegar a desprenderse espontáneamente (promedio de 4-5/día) y son evacuados contenidos en las heces del

hospedero. La primera expulsión de proglótidos generalmente ocurre entre 62 y 72 días después de la infestación, cuando el parásito mide alrededor de 2 m de largo. Luego de evacuados los proglótidos, su ruptura permite la liberación de los huevos, los cuales podrían alcanzar al hospedero intermediario por distintos medios como la transmisión ano-boca, vegetales y frutas mal lavadas o transmisión aérea <sup>30,42</sup>.

Una vez que los huevos han alcanzado el tubo digestivo del hospedero intermediario, las enzimas proteolíticas y las sales biliares actúan como activadores de las oncosferas contenidas en los huevos para que penetren en la mucosa intestinal del hospedero, alcancen los capilares linfáticos y/o sanguíneos y se distribuyan a varios órganos. Los eventos que ocurren luego de la penetración de las oncosferas a los tejidos son desconocidos, aunque se sabe que un embrión requiere de al menos 10 semanas para convertirse en un cisticerco y de esta forma puede sobrevivir por varios años dentro de los tejidos infestados del hospedero porcino o humano <sup>11,30,31,38</sup>.

El ciclo se cierra cuando el ser humano ingiere carne cruda o insuficientemente cocida que proviene de un cerdo con cisticercos. Nuevamente, la acción de las enzimas gástricas e intestinales y de las sales biliares, activan al cisticerco el cual se fija a la pared intestinal. El parásito fijado crece y se diferencia hasta convertirse en una tenia madura productora de proglótidos grávidos en un periodo aproximado de cuatro meses <sup>11, 14,43,44</sup>.

#### **1.4. La relación hospedero-parásito.**

La teniosis y la cisticercosis es una zoonosis en la que el hombre es el hospedero definitivo o intermediario, en donde el hombre y los parásitos adultos han logrado una simbiosis casi perfecta, ya que el individuo infestado pudiera llegar a presentar algún tipo de sintomatología que no pondría en riesgo su salud y que estaría asociada con algún malestar común <sup>22</sup>; esto implica que el parásito, al igual que otros helmintos, han estado

desarrollando fenómenos de sobrevivencia aún desconocidos que le permiten sobrellevar y evadir los mecanismos de defensa mecánicos e inmunológicos del hospedero <sup>38,45-47</sup>. Algunos de estos mecanismos han sido propuestos y principalmente han sido estudiados con cisticercos; con estos parásitos se ha determinado que inducen algún grado de alteración de la inmunidad del hospedero con lo que modifican una posible respuesta agresiva en su contra, también se ha demostrado que producen sustancias que podrían favorecer su permanencia dentro del hospedero <sup>48,49</sup>, o bien, que podrían desarrollar fenómenos de mimetización con tejidos del hospedero con lo que evitarían una respuesta inmune en su contra. Para la teniosis no se han hecho estudios semejantes, sin embargo recientemente (y gracias al empleo de un modelo experimental de teniosis) se demostró que los parásitos secretan a la miosina <sup>18</sup>, que es una proteína estructural, pero que se presenta durante la infestación y lo cual podría tener reelevancia en la relación hospedero-parásito ya que si la proteína es activa, esta puede tener alguna función de sobrevivencia dentro del hospedero infestado.

### 1.5. El modelo experimental de teniosis.

Como ya fue indicado, el desarrollo de mejores métodos de diagnóstico para el tratamiento de individuos naturalmente infestados no es empresa fácil, ya que la detección es complicada y en aquellos casos exitosos de tratamiento, los parásitos están tan dañados que no pueden ser utilizados en caso de que se requiera su estudio. Esto ha motivado al desarrollo y la adaptación de un modelo experimental de teniosis en hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) <sup>19</sup> con en el que se espera lograr avances en el conocimiento de estos parásitos.

Los éxitos, obtenidos hasta la fecha con la adaptación del mencionado modelo experimental<sup>5</sup>, han sido los relacionados con estudios iniciales de la relación hospedero-

parásito y la recuperación de antígenos para diagnóstico basado en la captura de productos secretados por parásitos vivos en las heces de animales infestados <sup>22,50</sup>. Esto último, relacionado con el diagnóstico en humanos infestados, ha sido de gran éxito, ya que los métodos coproparasitoscópicos convencionales han sido rebasados en su aplicación en el ámbito de campo por el número de muestras que se pueden analizar en corto tiempo, el menor volumen de materia fecal que se requiere para el análisis, el diagnóstico más sensible para tenias que infectan al hombre (*T. solium* y *T. saginata*), la detección de los individuos infestados aún en periodos prepatentes en donde estos individuos aún no arrojan huevos o proglótidos en sus heces y además, el método es ideal en el seguimiento de tratamientos cestodíctidas para valoración de su efectividad. Sin embargo, el modelo experimental, a pesar de los argumentos que validan su empleo, aún carece de un elemento importante como es la identificación específica y oportuna de parásitos de *T. solium* <sup>22</sup> lo cual podría repercutir en un adecuado tratamiento de este tipo de teniosis. Esta es la razón por la que actualmente se está tratando de mejorar el diagnóstico mediante la búsqueda de otros elementos que lo hagan más efectivo.

## II. JUSTIFICACIÓN.

La teniosis es una parasitosis producida por *T. solium*, y es una enfermedad parasitaria importante en la salud de los mexicanos debido a que se presenta generalmente en forma asintomática, ya que produce daño mínimo en la mucosa intestinal, y su diagnóstico se realiza por la identificación de los proglótidos en la materia fecal, o por el análisis de los huevos mediante exámenes coproparasitológicos de sedimentación, cuya sensibilidad es del 60 %, lo cual no permite un adecuado diagnóstico, sin embargo aunque se ha desarrollado el método de diagnóstico por la técnica de ELISA de captura de coproantígenos que es 100% sensible y 94 % específica, no permite distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*.

Además de que no hay estudios profundos sobre esta parasitosis, y gracias al empleo del modelo experimental de teniosis se han producido anticuerpos monoclonales específicos (AcM-4B3), los cuales fueron caracterizados anteriormente y se sabe que reconocen a la miosina que es una proteína estructural del parásito, y que aparentemente tiene importancia en la relación hospedero-parásito, lo cual podría ser aprovechado para identificar y detectar al parásito. El presente estudio está enfocado para determinar la posibilidad de utilizar la miosina de estos parásitos, como una herramienta de diagnóstico mediante la combinación de anticuerpos policlonales y el AcM-4B3 los cuales reconocen específicamente a la miosina secretada por los parásitos adultos de *T. solium*. Este estudio permitirá sentar las bases necesarias para el desarrollo de un adecuado método de diagnóstico, basado en la detección de miosina, el cual podría no sólo apoyar al diagnóstico de la parasitosis como tal, sino también a la evaluación de la eficacia de la terapia medicamentosa que se siga en los individuos infestados.

### **III. HIPÓTESIS.**

Por medio de la detección de miosina de *T.solium* en heces y suero de hámster infestados en forma experimental y de humanos infestados en forma natural, es posible el seguimiento de la infestación, la cual podría estar correlacionada con la presencia de parásitos vivos y ello podría tener aplicación en la valoración de la eficacia de tratamientos cestodicidas.

### **IV. OBJETIVOS**

1. Preparar anticuerpos policlonales contra miosina de parásitos de *T. solium*.
2. Determinar, mediante una combinación de anticuerpos policlonales y el anticuerpo monoclonal 4B3, la presencia de miosina de parásitos adultos en suero y heces de animales infestados experimentalmente y de humanos infestados en forma natural.
3. Determinar el efecto de un tratamiento cestodicida sobre la detección de miosina parasitaria en animales infestados experimentalmente.
4. Determinar las posibilidades de utilizar a la miosina de tenias como un marcador de infestación que pueda ayudar al diagnóstico en humanos infestados naturalmente.

### **III. HIPÓTESIS.**

Por medio de la detección de miosina de *T.solium* en heces y suero de hámster infestados en forma experimental y de humanos infestados en forma natural, es posible el seguimiento de la infestación, la cual podría estar correlacionada con la presencia de parásitos vivos y ello podría tener aplicación en la valoración de la eficacia de tratamientos cestodicidas.

### **IV. OBJETIVOS**

1. Preparar anticuerpos policlonales contra miosina de parásitos de *T. solium*.
2. Determinar, mediante una combinación de anticuerpos policlonales y el anticuerpo monoclonal 4B3, la presencia de miosina de parásitos adultos en suero y heces de animales infestados experimentalmente y de humanos infestados en forma natural.
3. Determinar el efecto de un tratamiento cestodicida sobre la detección de miosina parasitaria en animales infestados experimentalmente.
4. Determinar las posibilidades de utilizar a la miosina de tenias como un marcador de infestación que pueda ayudar al diagnóstico en humanos infestados naturalmente.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 5.1. Obtención de parásitos de *Taenia solium*.

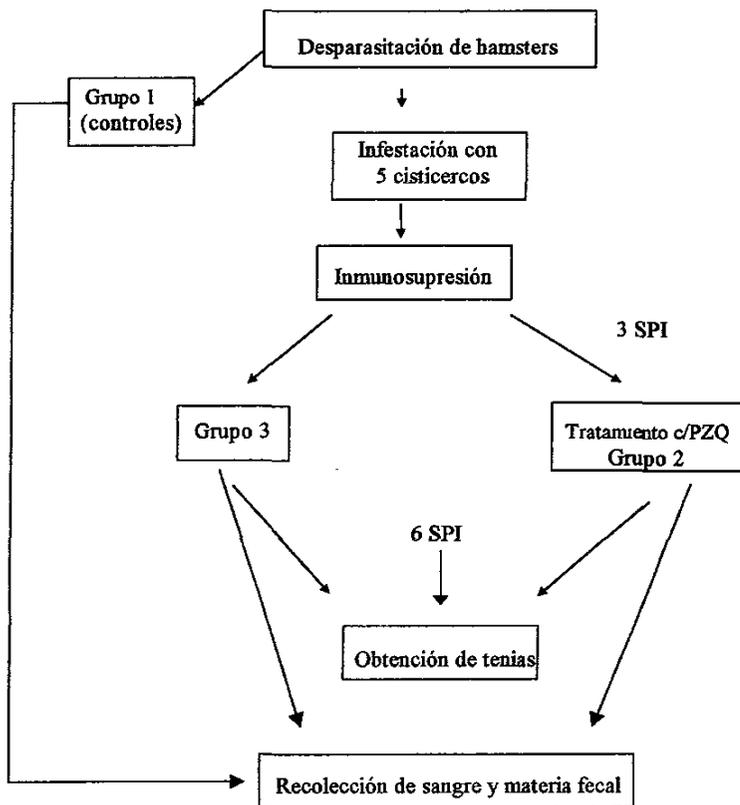
5.1.1. Cisticercos. Estos parásitos fueron recuperados del músculo de cerdos infestados naturalmente y posteriormente fueron divididos en dos partes: En una de ellas los parásitos fueron empleados para la infestación de los hamsters (ver lo correspondiente a tenias) y en la otra, los parásitos fueron utilizados para la extracción de miosina. Para la preparación de miosina, los parásitos fueron lavados tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (SSAF) para eliminar restos del tejido del hospedero y en algunos casos los parásitos fueron congelados a -20°C hasta su empleo.

5.1.2. Tenias. La obtención de estos parásitos se hizo luego de la infestación experimental de hamsters dorados (*Mesocricetus auratus*) (10 semanas de edad aproximadamente, de ambos sexos y un peso aproximado a 100 g). Cada hámster fue infestado con 5 cisticercos por vía oral, una semana después de haber sido desparasitados con praziquantel (PZQ) (Cisticid, Merck) (dosis: 2.4 mg/por animal). Con el objetivo de mantener la infestación parasitaria, los hamsters fueron inmunosuprimidos con acetato de metil-prednisolona (Depomedrol, UPJHON) (dosis de 2 mg/animal, administración intramuscular) aplicado en dos ocasiones a intervalos de 15 días post-infestación. Gracias a estas condiciones experimentales de infestación, se permitió la instalación, el mantenimiento y el desarrollo de las tenias como ha sido descrito por Allan *et al*<sup>19</sup> y Avila<sup>50</sup>. Durante el tiempo que los animales permanecieron en estudio fueron mantenidos en jaulas con camas de aserrín estéril y con alimentación consistente de alimento comercial balanceado para roedores (Laboratory rodent diet) y agua estéril *ad libitum*. Durante el tiempo que duró el estudio, se hicieron recuperaciones de materia fecal y sueros de los animales a intervalos de tiempo

definido (ver esquema experimental). La sangre fue recuperada por punción del seno venoso retroorbital. Luego de seis semanas de infestación, los hamsters fueron sacrificados con éter y de su intestino se hicieron recuperaciones de los parásitos adultos. Al igual que con los cisticercos, las tenias fueron lavadas SSAF y congeladas a -20 °C hasta su utilización en la preparación de miosina.

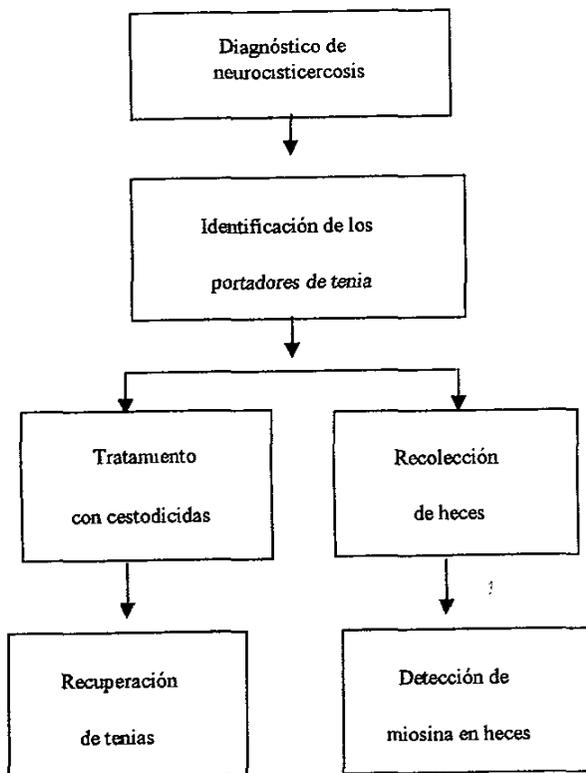
## **5.2. Infestaciones experimentales con teniosis.**

Se formaron tres grupos diferentes de 10 animales cada uno, con la finalidad de determinar y comparar entre ellos la detección de miosina secretada por las tenias; así como de tratar de evaluar el efecto de un tratamiento con PZQ, durante la infestación parasitaria (Figura 2). Los animales empleados tuvieron las características ya descritas en la parte correspondiente a la producción de tenias y, para el seguimiento de la infestación, se hicieron tomas de muestras de materia fecal y sangre como también ya fue descrito.



**Figura 2. Esquema de la infestación experimental.** Se formaron tres grupos de animales (1, 2 y 3), los animales de los grupos 2 y 3 fueron infestados con 5 cisticercos por vía oral, e inmunosuprimidos con metil-prednisolona por vía subcutánea, los animales del grupo 2 fueron tratados con PZQ a la tercera semana postinfestación (SPI), los animales del grupo 1 fueron controles. A todos los animales se les hizo recolección de materia fecal y de sangre a intervalos de tiempo. A las seis semanas, los animales del grupo 2 y 3 fueron sacrificados y sus intestinos fueron revisados para la recuperación de parásitos adultos.

**5.3. Infestaciones naturales con teniosis.** La obtención de muestras de humanos infestados en forma natural, fue a partir de los casos conocidos de cisticercosis, a través de un estudio realizado en centros hospitalarios.<sup>51</sup>



**Figura 3.** Esquema de la recuperación de muestras en infecciones naturales. Las muestras fecales de los pacientes infestados en forma natural fueron recolectadas a partir de la localización de casos de neurocisticercosis en centros hospitalarios<sup>51</sup> y de los cuáles se buscó al portador de *Taenia*, a los portadores se les recolectaron muestras de heces las cuales se utilizaron para el análisis de miosina, estas muestras se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### 5.4. Obtención de miosina de parásitos de *Taenia solium*.

Se obtuvo miosina de tejidos de cisticercos y para ello, se hicieron preparaciones mediante extracciones salinas de acuerdo a lo descrito por Dowben <sup>52</sup>, Giese <sup>53</sup> y Ambrosio *et al* <sup>18</sup>. Luego de haber descongelado a los parásitos, en el caso que así fuera, se les hicieron lavados con SSAF como fue indicado anteriormente y luego se les homogeneizó en presencia de una solución de NaCl 0.2 M complementada con inhibidores enzimáticos (PMSF al 0.006%, EDTA 10mM y PMCB 0.04%) empleando un polytrón (Brinkman Instruments) a una alta velocidad durante 15 min en presencia de un baño de hielo. La suspensión resultante fue centrifugada a 6200 g durante 30 min. a 4 °C, y la pastilla obtenida, considerada como un extracto rico de miosina, fue solubilizada con una solución de KCl 0.6 M a pH 6.5 y en presencia de los inhibidores de proteasas ya descritos. Nuevamente, la suspensión fue homogeneizada y centrifugada bajo las condiciones ya descritas. El sobrenadante recuperado rico en miosina fue fraccionado en alícuotas, se le hizo determinación de su concentración de proteínas utilizando un kit comercial (Bio Rad) basado en la reacción con azul de Coomassie(ver apéndice 9.1). Como proteína estándar, para la evaluación de la concentración de proteína, se utilizó albúmina sérica bovina fracción V(ASB). Posteriormente las fracciones se congelaron a -20 °C hasta su uso. La evaluación de la calidad de la miosina purificada se hizo mediante análisis en gel de poliacrilamida (GELPOLI) al 5% en condiciones reductoras (ver apéndice 9.2) y el análisis para determinar si el purificado correspondía a miosina, se hizo mediante inmunoprecipitación utilizando el AcM-4B3 que reconoce específicamente a miosina de acuerdo a lo descrito por Ambrosio *et al* <sup>18</sup>.

## 5.5. Preparación y purificación de anticuerpos.

### 5.5.1. Anticuerpos policlonales antimiosina.

**Preparación.** Se hizo una separación de la banda correspondiente a miosina nativa, luego del revelado de geles preparativos con acetato de sodio 4M (ver apéndice 9.2). Para la obtención de la fracción se hicieron corrimientos de 600  $\mu\text{g}$  de proteína (ver miosina de parásitos de *T. solium*) en GELPOLI tal y como fue descrito anteriormente. Las bandas seleccionadas (> 206 kDa) fueron separadas de los geles, homogeneizadas con Adyuvante Completo de Freund (ACF) (Sigma) en proporción de volumen a volumen y la mezcla obtenida, fue administrada por vía subcutánea en el lomo de un conejo Nueva Zelanda tal y como lo describen Harlow y Lane <sup>54</sup>.

En total se hicieron tres inmunizaciones con la miosina recuperada de la forma descrita, la diferencia fue que dos inmunizaciones se hicieron en presencia de Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) (GIBCO BRL). La evaluación de los títulos de anticuerpos antimiosina producidos se hizo de acuerdo a ensayos inmunoenzimáticos (ELISA's), para los cuales se utilizó como antígeno a la miosina semipurificada por precipitación en sales, ajustada a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y en presencia de una solución amortiguadora de carbonatos a pH 9.6(ver apéndice 9.3). En el momento que se consideró que los títulos de anticuerpos alcanzaban la máxima producción, luego de las inmunizaciones y las valoraciones aplicadas, se hicieron recuperaciones de sangre por punción cardiaca y de la sangre obtenida se aisló el suero, luego de permitir la contracción del coaguló durante toda la noche a 4°C, el cual fue centrifugado a 3000 r.p.m. durante 5 min. El suero hiperinmune antimiosina fue fraccionado en alícuotas y congelado a -20 °C hasta su uso o bien, procesado para la purificación de los anticuerpos.

**Purificación.** La purificación de los anticuerpos se llevó a cabo por precipitaciones con sulfato de amonio saturado, de acuerdo a lo descrito por Harlow y Lane <sup>54</sup> Posteriormente los anticuerpos fueron sometidos a purificación mediante una columna de afinidad de proteína A- Sepharosa. Para estos fines, la columna con el gel fue lavada con 3 volúmenes de solución salina amortiguada a fosfatos (SSAF) 0.1 M pH 8.0 y posterior a ello, las proteínas fueron puestas en contacto con el gel durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. La columna fue lavada inicialmente 5 veces con SSAF para eluir a las proteínas no adsorbidas al gel y luego, se aplicó una solución de ácido acético 0.1 M (diluido en NaCl 0.15 M) para eluir a las inmunoglobulinas de la clase G adsorbidas al gel. Cada fracción fue recuperada en presencia de 100  $\mu$ l de SSAF 0.5 M a pH 8.0. La detección de las fracciones con proteína purificada se hizo por medición de su absorbancia a 280 nm, utilizando un espectrofotómetro (SPECTRONIC 21D). Las fracciones seleccionadas fueron mezcladas, dializadas exhaustivamente contra SSAF a 4°C y luego la mezcla fue concentrada por presión positiva con N<sub>2</sub> utilizando un equipo de concentración AMICON con una membrana DIAFLO (10 kDa de diámetro de poro). La muestra, luego de la determinación de su concentración de proteínas por el método de Bradford<sup>43</sup> (ver apéndice 9.1), utilizando como estándar inmunoglobulinas G de conejo (Sigma), fue fraccionada en alícuotas, las cuales fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

El control de calidad de la purificación por afinidad de las proteínas, se llevó a cabo por medio de GELPOLI en concentraciones de 12.5 %, bajo condiciones reductoras en presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (ver apéndice 9.2).

**Evaluación de la actividad biológica por inmunopunto** El proceso se realizó sensibilizando membrana de nitrocelulosa (NC) con  $10\mu\text{A}$  de muestra de miosina a una concentración de  $10\mu\text{g/ml}$ , los sitios de unión inespecífica se bloquearon con ASB al 5%. Posteriormente se adicionaron los anticuerpos policlonales (Dil. 1:1000), luego de la reacción, se adicionó el anticuerpo secundario marcado a peroxidasa. Para el revelado de la reacción se utilizó diaminobenzidina (DAB) (ver apéndice 9.4).

### 5.5. 2. Anticuerpos monoclonales 4B3 antimiosina (AcM 4B3).

**Preparación de anticuerpos desde líquido de ascitis.** La producción del líquido de ascitis se hizo de acuerdo a lo descrito por Harlow y Lane <sup>54</sup>, para lo cual los hibridomas productores del AcM 4B3 fueron introducidos en la cavidad peritoneal de ratones Balb/c y, luego de 15 días de inoculación se hizo la recuperación del líquido. El cual fue analizado en su reconocimiento a miosina y posteriormente utilizado para purificar los AcM 4B3.

Estos anticuerpos monoclonales provienen de hibridomas de clones de 4B3, estos AcM han sido caracterizados<sup>18</sup>, y su principal reconocimiento está dado hacia una fracción antigénica mayor a 206 kDa, la cual corresponde a la miosina parasitaria de *Taenia solium* en su forma nativa o dimerica.

**Purificación de los AcM 4B3.** Uno de los primeros pasos en la purificación de los anticuerpos fue su precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado al 33% a pH de 7.8 <sup>54</sup>, (ver apéndice 9.3). Las precipitaciones fueron repetidas por dos ocasiones más y, una vez que la proteína fue solubilizada en SSAF, se le aplicó una diálisis exhaustiva hasta eliminar el exceso de sales. Como un segundo proceso de purificación de los anticuerpos, se procedió a purificarlos mediante una cromatografía de afinidad

Para estos fines se empleó una columna de afinidad comercial de Affi Gel-protein A-MAPS II (BIO RAD) y se procedió de acuerdo a como lo recomienda el fabricante, variando el tiempo de contacto de la proteína con el gel desde 2 horas a temperatura ambiente ó toda la noche a 4 °C. Las fracciones obtenidas (1 ml), luego de la adición de la solución de elución, fueron colectadas en presencia de 100  $\mu$ l de SSAF 10X. A cada fracción recolectada se le determinó su absorbancia a 280 nm mediante un espectrofotómetro (SPECTRONIC 21D)(Figura 8 A), y de las fracciones consideradas que contenían anticuerpos puros se hizo una mezcla, la cual fue dializada como ya se indicó y posteriormente analizada. El análisis consistió en determinar su concentración de proteína (utilizando inmunoglobulinas G de conejo como standard), su pureza mediante GELPOLI al 12.5 % bajo condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol y evaluación de su reconocimiento hacia miosina por inmunopunto (Figura8., B y C).

**Marcaje enzimático de los AcM-4B3 purificados.** Con esta finalidad se empleo la técnica descrita por Avrameas *et al*<sup>55</sup>, la cual ha sido descrita en la parte correspondiente a métodos dentro del apéndice 9.3 y como marcador se utilizó a la fosfatasa alcalina (FA). Posterior al marcaje de los anticuerpos, el exceso de enzima fue eliminado usando una columna de sephadex G-25 y el monitoreo de la fracción marcada enzimáticamente se hizo por mediciones de absorbancia de las fracciones a 280 nm y por mediciones de la absorbancia a 405nm indicativo de la actividad enzimática (Figura 9 A). Las fracciones seleccionadas fueron mezcladas y concentradas, luego de su análisis de reconocimiento a la miosina por ELISA (Figura 4 y 9B), fueron fraccionadas en alícuotas y congeladas hasta su uso a -20 °C.

**Evaluación por inmunopunto.** El proceso se realizó sensibilizando membrana de nitrocelulosa (NC) con 10 $\mu$ l de muestra de miosina semipurificada en bajas concentraciones de sales (NaCl, KCl) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, los sitios de unión inespecífica se

bloquearon con ASB al 5%, posteriormente se adicionaron los AcM 4B3 (1 $\mu$ l de cada muestra en 1 ml), luego de la reacción, se adicionó el anticuerpo secundario marcado a peroxidasa, para el revelado de la reacción se utilizó diaminobenzidina (DAB)(ver apéndice 9.4).

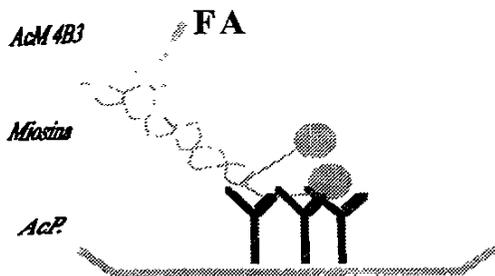
#### 5.6. Estandarización de la captura de miosina en materia fecal y suero.

**Materia fecal de hámster.** Con la finalidad de evaluar las concentraciones mínimas de miosina detectadas, fueron adicionadas diferentes concentraciones de miosina (8, 80, 800 ng/ml) a sobrenadantes de heces de hamsters no infestados, tal y como se ha descrito para la detección de miosina miocárdica <sup>56</sup>. Estos sobrenadantes fueron preparados mediante la solubilización de material fecal en SSAF-Teewn al 0.3% y agitación vigorosa en vórtex La suspensión fecal resultante fue centrifugada a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y el sobrenadante recuperado fue utilizado en los ensayos descritos. Este procedimiento de preparación de sobrenadante de materia fecal fue seguido en todos los casos que se requirió, incluyendo el tratamiento de la materia fecal humana. Los ensayos realizados a la materia fecal, fueron hechos basados en lo descrito por Allan *et al* <sup>22</sup>, la diferencia con lo descrito por estos autores, fue que el sistema de captura de la miosina se hizo con los anticuerpos policlonales antimiosina y para el revelado fueron empleados los AcM-4B3 conjugados a FA y como sustrato se empleo 4NFF respectivo (ver apéndice 9.3).

**Suero de hámster.** Al igual que con la materia fecal de animales no infestados, se hicieron adiciones de diferentes concentraciones de miosina exógena (8, 80, 800 ng/ml) iguales a las ya descritas. Sin embargo, para facilitar la detección de la miosina, los sueros fueron tratados con ácido tricloroacético al 2% (ATAcO) para la disociación de complejos inmunes <sup>57</sup> y sin ATAcO, los sueros fueron diluidos en relación 1:100 y probados en el ensayo de captura (Figura 13 A y B).

**Materia fecal de pacientes infestados naturalmente** Con la finalidad de evaluar las concentraciones mínimas de miosina detectadas, se adicionaron diferentes concentraciones de miosina a sobrenadantes de heces de humanos no infestados, para comparar con los animales infestados experimentalmente, siguiendo el mismo procedimiento como en el modelo animal(Figura 2 y 3).

**Suero de pacientes infestados naturalmente.** Al igual que con la materia fecal, se hicieron adiciones de diferentes concentraciones de miosina (8, 80, 800 ng/ml) iguales a las ya descritas para el modelo animal, en donde además se realizó el mismo tratamiento con ATAcO al 2 % para la disociación de complejos inmunes como fue descrito anteriormente



**Figura 4: Modelo del ELISA de Captura de miosina.** ELISA de captura diseñado para determinar miosina de parásitos adultos de *Taenia solium* en muestras de heces y suero, tanto del modelo animal como de pacientes infestados en forma natural.

## 5.7. Captura de miosina en materia fecal y suero.

### 5.7.1. Hámster.

**Materia fecal.** Una vez que se estandarizó, el ELISA de captura con miosina exógena se procedió a probar la presencia de la miosina en los sobrenadantes de heces colectadas

durante la infestación experimental; utilizando para ello 10  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos policlonales como sistema de captura, estos anticuerpos fueron adsorbidos previamente con sobrenadante de heces y de cultivo celular de AcM-4B3 para evitar inespecificidad por reacciones cruzadas. posteriormente fueron adsorbidos a placas de poliestireno(2 h/37 °C), los sitios de unión inespecifica se bloquearon con ASB al 5% (2h/37°C). luego se dejaron reaccionar con las muestras como fue indicado anteriormente, finalmente se adicionó el AcM-FA (18  $\mu\text{g/ml}$ )(2h/37°C). El revelado de la reacción se hizo con el sustrato 4NFF y leyéndose la absorbancia a 405 nm, luego de 60 minutos en un lector de ELISA.

**Suero.** Los sueros de la infestación experimental fueron analizados luego de un previo tratamiento con ATAcO al 2 % para la liberar los complejos inmunes, posteriormente estos sueros fueron puestos a reaccionar con anticuerpos policlonales en donde se utilizaron 10  $\mu\text{g/ml}$ (2h/37°C), los cuales estaban previamente absorbidos a suero normal de hámster y sobrenadante de cultivo celular de AcM-4B3 para evitar reacciones cruzadas, después se colocaron las muestras a evaluar(1h/37°C), para finalmente adicionar el AcM-FA (12 5  $\mu\text{g/ml}$ )(2h/37°C), para él revelando enzimático se utilizó el sustrato cromógeno 4NFF, la absorbancia fue leída a 405 nm a los 30 minutos de reacción.

### 5.7.2. Humano.

**Materia fecal.** Una vez que se estandarizó el ELISA de captura con miosina exógena, se procedió a probar las heces recolectadas en centros hospitalarios (Figura 3), utilizando el mismo procedimiento descrito para el caso del modelo animal (Figura 12).

**Suero de humano.** Los sueros de las infestaciones naturales se probaron utilizando un previo tratamiento para la liberación de complejos inmunes con ATAcO al 2 % como ya fue descrito anteriormente para el caso del modelo animal (Figura.15).

## VI. RESULTADOS.

### 6.1. Infestaciones experimentales de hamsters.

Después de seis semanas de infestación fueron obtenidos 15 parásitos adultos de 4 animales del grupo 2, ( $\bar{X} = 3.75$  parásitos por animal). Esto indica que aparentemente para este grupo se obtuvo un 40% de infestación exitosa, ya que no se pudo determinar si los otros animales estuvieron parasitados. En el caso del grupo 3, sacrificados en el mismo tiempo de infestación, no se encontraron parásitos. Sin embargo, en un animal que murió a los 17 días post-infestación le fueron encontrados 3 parásitos adultos.

### 6.2. Miosina de parásitos de *T. solium*

Se logró obtener miosina nativa desde los tejidos parasitarios en un estado de pureza parcial cuando se utilizó KCl 0.6 M (Figura 5). El revelado mostró que el tratamiento con sales favorece el que se mantenga y separe adecuadamente la proteína de alto peso molecular.

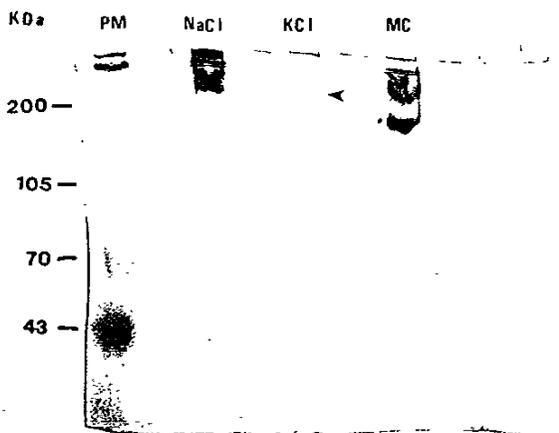
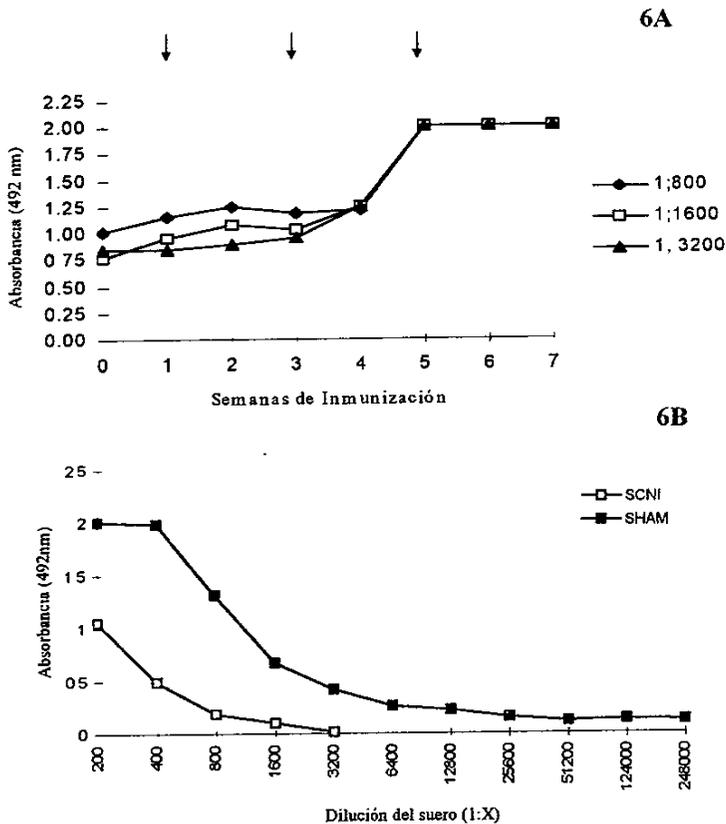


Figura 5. Semipurificación de miosina por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las proteínas (35  $\mu\text{g}$ /pozo) fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5 % (100 v, 1h, 4°C) en condiciones reductoras. PM: pesos moleculares preteñidos de alto peso molecular, la cadena pesada de miosina comercial esta situada aproximadamente dentro de los 200 kDa. NaCl 0.2 M: Primer extracción de la miosina desde tejidos parasitarios. KCl 0.6M: segunda extracción de miosina nativa MC: miosina comercial. La proteína tiene un peso molecular aparente mayor a los 200 kDa. El gel, luego del corrimiento electroforético, fue teñido con azul de Coomassie y desteñido con ácido acético (AcAcO) al 10%. La flecha indica la banda correspondiente a miosina nativa.

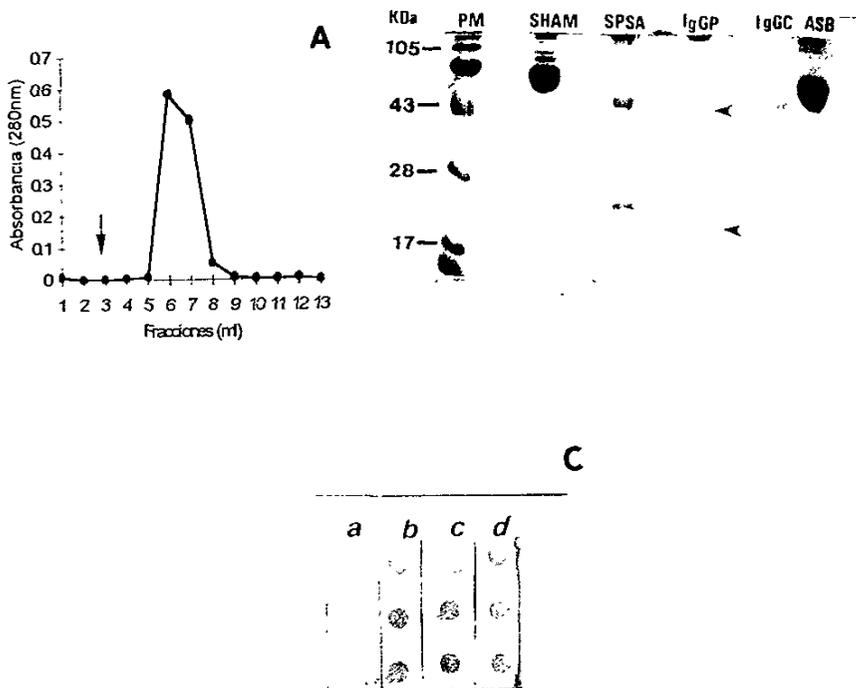
### 6.3. Anticuerpos policlonales antimiosina.

Luego de la inmunización del conejo con las fracciones de los geles que contenían a la miosina nativa, se evaluó el reconocimiento de los anticuerpos presentes en los sueros hiperinmunes producidos. Como antígeno fue utilizada la proteína semipurificada en KCl 0.6 M. Cuando fueron analizadas diferentes diluciones del antisuero, su comportamiento en el reconocimiento hacia la miosina fue muy semejante y lo que se observó, es que luego de dos inmunizaciones hubo un incremento notable en la producción de los anticuerpos. La tercera inmunización indujo la máxima producción de ellos (Figura 6A). La titulación del reconocimiento específico del suero hiperinmune, comparado con el suero normal, mostró que a diluciones bajas comprendidas entre el suero concentrado y la dilución 1: 400 había un mejor reconocimiento hacia miosina de *T. solium* (Figura 6B) con respecto a las otras diluciones estudiadas, sin embargo hay un ligero reconocimiento por parte de los anticuerpos normales del conejo hacia la miosina (Figura 6B).

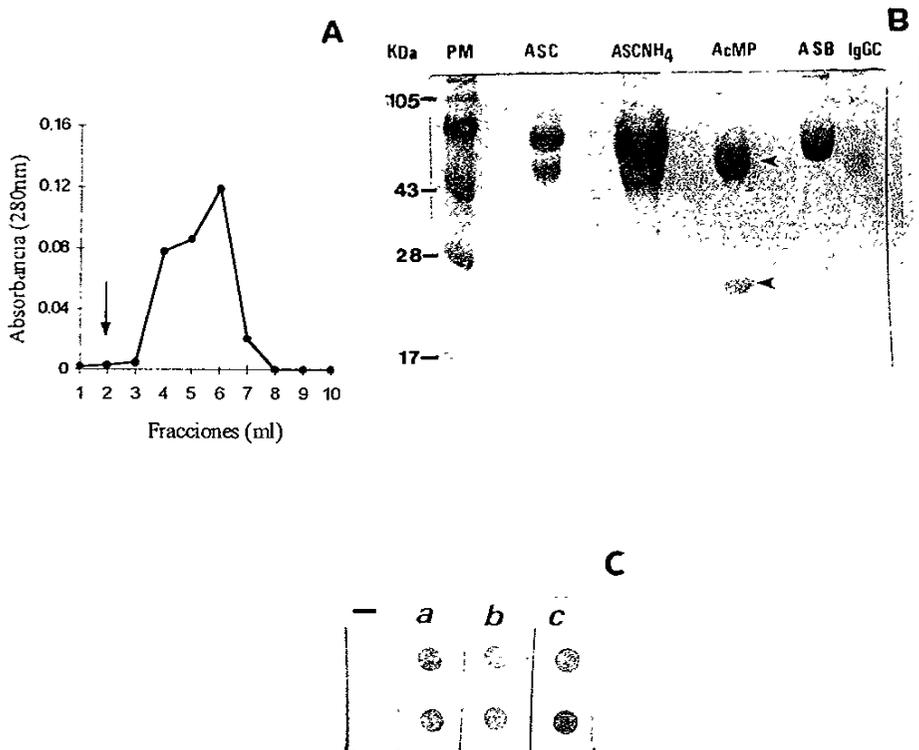


**Figura 6. Anticuerpos policlonales antimiosina. A) Producción.** Se hicieron determinaciones de los anticuerpos producidos mediante ELISA, la miosina semipurificada ( $2.5\mu\text{g/ml}$ ) fue adsorbida a los micropozos y procesada como ha sido indicado para estos ensayos. Como anticuerpo primario se usó las diluciones del antisuero y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti IgG de conejo (1:1000) conjugado a peroxidasa. Se indican las semanas en las que se hicieron administraciones del antígeno (flechas), así como las diluciones probadas. **B) Titulación.** Los antiseros fueron analizados por ELISA en diferentes diluciones (Suero Hiperinmune Antimiosina SHAM) y su reconocimiento hacia miosina fue comparado con el suero de conejos no inmunizados (Suero de Conejo No Inmunizado SCNI).

Luego de la evaluación de los anticuerpos, éstos fueron purificados por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturado al 33% y mediante columna de afinidad (Figura 7A y B). La evaluación mediante inmunopunto (ver apéndice 9.4) del reconocimiento hacia la miosina, luego de la purificación, mostró que los anticuerpos purificados seguían reconociendo a su antígeno (Figura 7C).

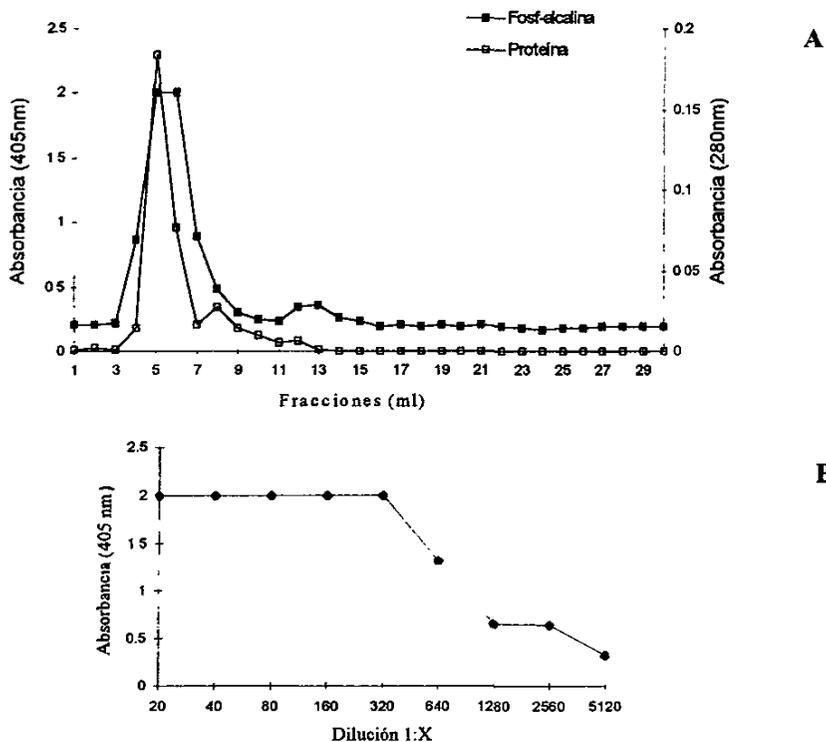


**Figura 7. Anticuerpos policlonales antimiosina (purificación y evaluación).** **A)** Cromatografía de afinidad: Luego de adicionar la solución de elución (flecha), se hicieron las colecciones de las fracciones, y se les determinó su absorbancia a 280 nm. Las fracciones seleccionadas fueron concentradas bajo presión positiva de  $\text{N}_2$  y se analizaron para determinar su pureza. **B)** Evaluación de la purificación. Las proteínas (35  $\mu\text{g}$ /pozo) fueron separadas por electroforesis en GELPOLI al 12.5 % (100 v, 1h, 4°C) bajo condiciones reductoras con  $\beta$ -mercaptoetanol. PM: pesos moleculares preteñidos de alto peso molecular. SHAM: suero hiperinmune antimiosina nativa. SPSA: suero precipitado con sulfato de amonio. IgGP: inmunoglobulinas purificadas. IgGC: anticuerpos comerciales de conejo. ASB: albúmina sérica de bovino. El gel fue teñido con azul de Coomassie y desteñido con ácido acético al 10%. Las flechas indican la cadena pesada (50 kDa) y ligera (25 kDa). **C)** Evaluación de la actividad biológica. Se empleó inmunopunto con anticuerpos anti IgG de conejo conjugados a peroxidasa y DAB como sustrato, las lecturas se hicieron a 492 nm. a: suero de conejo no inmunizado (SNCI), b: Suero hiperinmune antimiosina (SHAM), c: suero precipitado con sulfato de amonio (SPSA), d: inmunoglobulinas purificadas (IgGP).



**Figura 8. Anticuerpos monoclonales 4B3 (purificación y evaluación).** **A) Cromatografía de afinidad:** Luego de la adición de la solución de elución (flecha), se hicieron colecciones de las fracciones, y se les determinó su absorbancia a 280 nm. Las fracciones seleccionadas se concentraron bajo presión positiva de N<sub>2</sub> y posteriormente se analizaron para determinar su pureza. **B) Evaluación de la purificación.** Las proteínas (35 µg/pozo) fueron separadas por electroforesis en GELPOLI al 12.5 % (100 v, 1h, 4°C) bajo condiciones reductoras con β-mercaptoetanol. PM: pesos moleculares preteñidos. ASC: líquido de ascitis, 1:10. ASCNH<sub>4</sub>: líquido de ascitis, 1:10 precipitado en sulfato de amonio. AcMP: anticuerpos monoclonales purificados. ASB: albúmina sérica bovina fracción V e IgGC: inmunoglobulina de conejo comercial. El gel, luego del corrimiento electroforético, fue teñido con azul de Coomassie y desteñido con ácido acético al 10%. Las flechas indican la cadena pesada (50 kDa) y ligera (25 kDa). **C) Evaluación de la actividad biológica.** Se empleó inmunopunto con anticuerpos anti IgG de ratón conjugados a peroxidasa. (-) sobrenadante de cultivo de células del mieloma (Ag 8), a: ASC, líquido de ascitis (1:10), b: ASCNH<sub>4</sub>, líquido de ascitis, 1:10 precipitado en sulfato de amonio c: AcMP, anticuerpos monoclonales purificados.

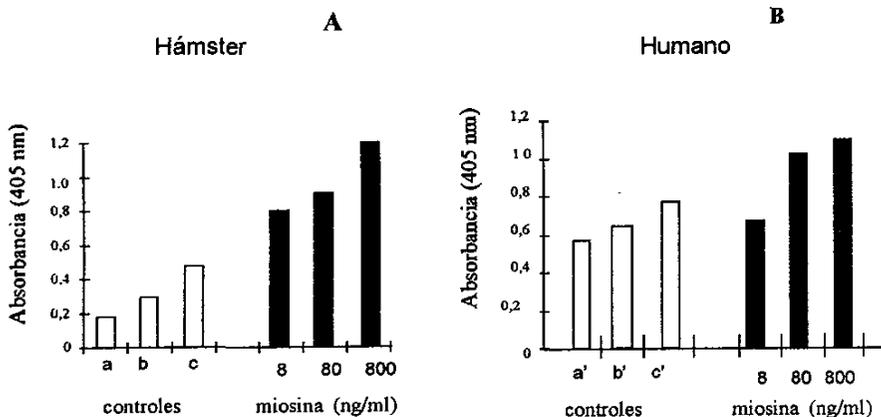
**6.4 Anticuerpos monoclonales.** Posterior a la purificación y evaluación de la actividad de los AcM, se procedió a conjugarlos a fosfatasa alcalina, para lo cual se determinó la actividad enzimática en microplaca y se midió la absorbancia de las proteínas puras (Figura 9A). Aparentemente, el método empleado permitió un marcaje eficiente de los AcM y a su vez, este método de marcado no alteró el reconocimiento de los AcM hacia la miosina (Figura 9B).



**Figura 9 Anticuerpos monoclonales.** a) **Marcaje enzimático.** La evaluación del marcaje consistió en dos procesos: 1) Determinación de proteína a 280 nm ( $\square$ ) y 2) Determinación de la actividad enzimática de la FA a 405 nm ( $\blacksquare$ ). Las fracciones correspondientes, a anticuerpos marcados, fueron seleccionadas de aquellas en las que se detectó la actividad enzimática y la presencia de proteínas (fracciones 4-8). La actividad enzimática fue determinada mediante microensayos utilizando al 4-NFF como sustrato. b) **Titulación.** La evaluación del reconocimiento de ACM-FA fue por una ELISA de captura en donde se utilizó como antígeno miosina (2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), purificada de cisticercos con KCL 0.6 M y para el revelado se usaron AcM-4B3 conjugados a FA, a las diluciones indicadas. La actividad enzimática (1 h, 37°C), y las lecturas de la reacción fueron leídas a 405 nm.

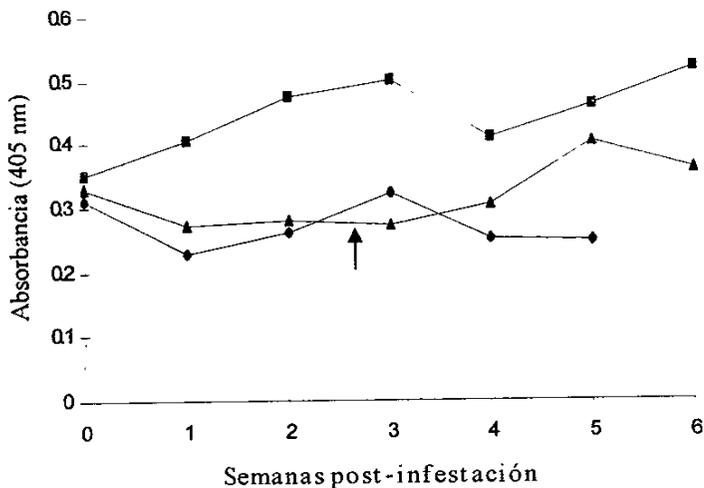
## 6.5. Captura de miosina en heces.

**6.5.1. Estandarización.** La adición de miosina a materia fecal de hamsters y humanos y, su captura por anticuerpos policlonales fue posible bajo los ensayos efectuados. Se observó que la cantidad de miosina capturada estaba en relación directa con su concentración de esta proteína en la materia fecal (Figura 10 A y B). De acuerdo a tres diferentes ensayos de captura, para cada tipo de materia fecal, la sensibilidad podría detectar desde los 8 ng/ml de miosina adicionada. Aparentemente, en la captura de miosina de heces de hamsters, podría ser posible que se detectaran menores concentraciones de miosina exógena tal y como lo mostraron las muestras analizadas de animales infestados durante 7 semanas (Figura 10 A).



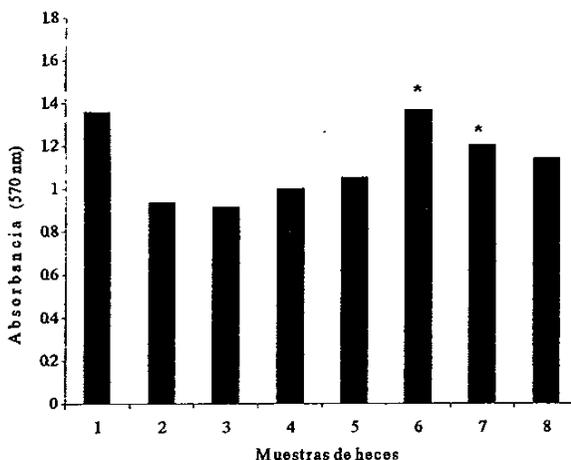
**Figura 10. Análisis de la miosina adicionada a heces.** Diferentes concentraciones de miosina de *T. solum* semipurificada en KCl 0.6 M fueron adicionadas a sobrenadantes de heces de hámster y humanos no infestados. Como captura se usaron anticuerpos policlonales antimiosina purificados y para el revelado, se usaron los AcM conjugados a fosfatasa alcalina (AcM-FA). La reacción y lectura de la actividad enzimática se hicieron tal y como fue descrito para la Figura 8. Como antígeno se usaron los sobrenadantes de heces en todos los casos. **A. Hamsters.** a: animales no infestados sin AcM-FA, b: animales no infestados sin miosina y c: Heces de un sólo animal infestado durante 7 semanas y positivo con tenias a la necropsia, **B Humanos.** a': humano no infestado sin AcM-FA, b': humano no infestado, c': humano infestado y positivo, por análisis coproparasitológico, a teniosis

**6.5.2. Cinética de aparición de miosina en heces de hámster.** Con el sistema de captura de miosina estandarizado, fue determinada su presencia en materia fecal durante diferentes tiempos de la infestación experimental (Figura 11). Se observó que a partir de la segunda semana de infestación, en el grupo de animales infestados, hubo un aumento de la concentración de la proteína en comparación con los animales del grupo control y que esta concentración de miosina fue incrementándose a lo largo de la infestación. Aparentemente, la determinación basal de miosina en los animales del grupo control no mostró variación alguna a lo largo de la infestación. En el caso de los animales del grupo infestado pero tratado con praziquantel se observó que luego del tratamiento hay un ligero aumento en la concentración de miosina luego de una semana, aunque los niveles de la proteína antes del tratamiento se mantuvieron en un intervalo semejante al de los animales del grupo control. Los niveles de miosina más altos, determinados en el experimento, correspondieron a los animales del grupo infestado. En este grupo, luego de la necropsia de los animales a la 6a. semana postinfestación, se encontraron 4 animales parasitados con tenias ( $\bar{x} = 3.75$  parásitos/animal). En el caso del grupo de animales infestados y tratados, uno de los animales murió luego de 17 días de infestación y se le encontraron 3 tenias en su intestino; los demás animales del grupo, luego de ser sacrificados a la 6a. semana no tuvieron parásitos en sus intestinos.



**Figura 11: Cinética de aparición de miosina durante la infestación experimental.** Para la captura de miosina se utilizaron anticuerpos policlonales (10 µg/ml) y para el revelado se usaron AcM 4B3 conjugados a fosfatasa alcalina (18 µg/ml). Previo a los ensayos los anticuerpos fueron absorbidos con heces de animales no infestados. La miosina fue capturada desde sobrenadantes de materia fecal solubilizada SSAF-Tween 20 (100µl). La actividad enzimática (1 h, 37°C) fue determinada por microensayos utilizando 4-Nitrofenilfosfato como sustrato y las lecturas de la reacción fueron leídas a 405 nm. Grupo 1. Animales sin infestación (◆). Grupo 2 Animales infestados y tratados (▲). Grupo 3. Animales infestados (■). La flecha indica el día en que los animales del grupo 2 fueron tratados con praziquantel (2.4 mg/animal).

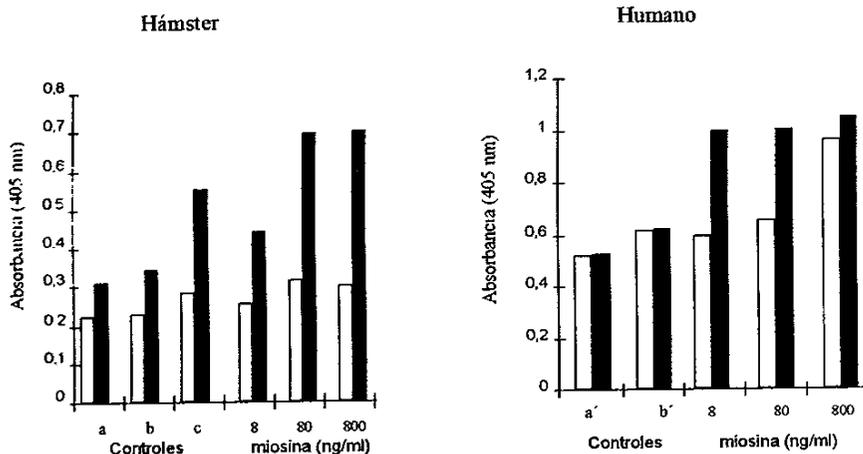
**6.5.3. Detección de miosina en heces de humano:** La captura de miosina en personas infestadas, diagnosticadas por análisis coproparasitológicos de Kato-Katz <sup>51</sup>, se hizo como ya se ha descrito mediante la utilización de anticuerpos antimiosina y AcM 4B3-FA (Figura 12). Aparentemente, luego de cinco ensayos efectuados, se obtuvieron en general mayores absorbancias para los casos de teniosis. Aunque se observó que había un elevado fondo de reacción en todos los casos y en uno de los casos negativos, al coproparasitológico, los valores de absorbancia también fueron altos. Dos de los 4 casos diagnosticados como positivos por coproparasitológicos, tuvieron proglótidos del parásito en su materia fecal (\*). Las muestras evaluadas para determinar si el sistema funcionaba en la captura de miosina, utilizando materia fecal de un hámster infestado con tenia (positivo a la necropsia a la sexta semana postinfestación), en comparación con una muestra de hámster negativa, mostró que cuando hay tenia se aumenta la cantidad de miosina secretada por el parásito.



**Figura 12: Detección de miosina en heces de humanos.** Como sistema de captura se usaron Ac pol antimiosina purificados y para el revelado los AcM conjugados a FA. La reacción y lecturas de la actividad enzimática se hicieron como fue descrito en la Fig 8 Como antígeno se usaron los sobrenadantes de heces en todos los casos 1: heces de un sólo animal infestado durante 6 semanas y positivo con tenias a la necropsia, 2: animales no infestados, 3: heces de humano negativo por coproparasitológico (CPS), 4: heces de humano negativo por CPS, 5: humano infestado y positivo por CPS, 6: humano infestado y positivo por CPS, 7: humano infestado y positivo CPS, 8: humano infestado y positivo CPS.

## 6.6. Captura de miosina en suero.

**6.6.1. Estandarización.** La medición de miosina adicionada tanto en sueros del modelo experimental, como en los de seres humanos, fue posible mediante su captura por anticuerpos policlonales (Figura 13) tal y como se logró con la miosina adicionada a materia fecal. También se observó que la cantidad de miosina capturada era directamente relacionada con la cantidad adicionada y que no había interferencia del suero. En ambos casos de análisis de la captura de la miosina, los sueros tuvieron que ser tratados con ácido tricloroacético al 2% <sup>57</sup>, con la finalidad de romper los complejos miosina-proteínas séricas y aumentar la cantidad de miosina capturada.



**Figura 13. Análisis de la miosina adicionada a suero.** Diferentes concentraciones de miosina de *T. solum* semipurificada en KCl 0.6 M fueron adicionadas (8, 80, 800 ng/ml) a suero sanguíneo. Como sistema de captura se usaron los AcPol antimiosina purificados y para el revelado, los AcM-FA. La reacción y las lecturas de la actividad enzimática, se hicieron como fue descrito en la Figura 8, excepto que las lecturas fueron a los 30 minutos. Como antígeno se usaron sueros diluidos (1:100) más miosina (en los casos respectivos). Todas las muestras fueron analizadas en ausencia (barras blancas) o en presencia de ATAcO al 2% (barras negras). **A. Hámster** a. Ac. policlonal y AcM-FA; b. Ac. policlonal, suero de hámster no infestado y AcM-FA, c. Control positivo de infestación experimental (6a. semana de infestación). **B. Humano:** a'. Ac. policlonal y AcM-FA, b'. Ac. Policlonal, suero de humano no infestado y AcM-FA.

6.6.2. Cinética de captura de Miosina de *Taenia solium* en suero de hamsters infestados experimentalmente. Con el sistema de captura estandarizado, fue determinada la presencia de miosina en el suero, durante diferentes tiempos de la infestación experimental (Figura 14). Se observó que a partir de la primera semana de infestación, en el grupo de animales del grupo controles y que esta concentración de miosina disminuye en las semanas siguientes (de la segunda a la cuarta semana) a lo largo de la infestación. Aparentemente, la determinación basal de miosina en los animales del grupo control mostró un aumento en la primer semana de infestación. En el caso de los animales del grupo infestado pero tratado con praziquantel se observó que en un inicio no se determinaba miosina en el suero luego del tratamiento hay un ligero aumento en la concentración de miosina luego de una semana, aunque los niveles de la proteína antes del tratamiento se mantuvieron en un intervalo semejante al de los animales del grupo control. Los niveles de miosina mas altos, determinados en el experimento, correspondieron a los animales del grupo infestado. Sin embargo durante la cuarta semana, en el grupo infestado hubo una disminución en la determinación de la miosina.

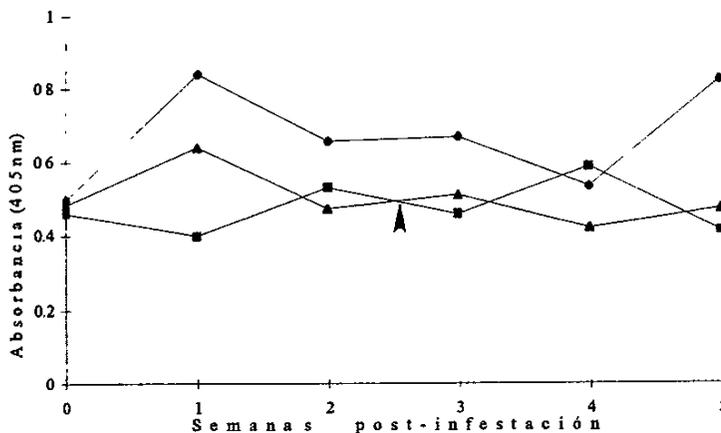
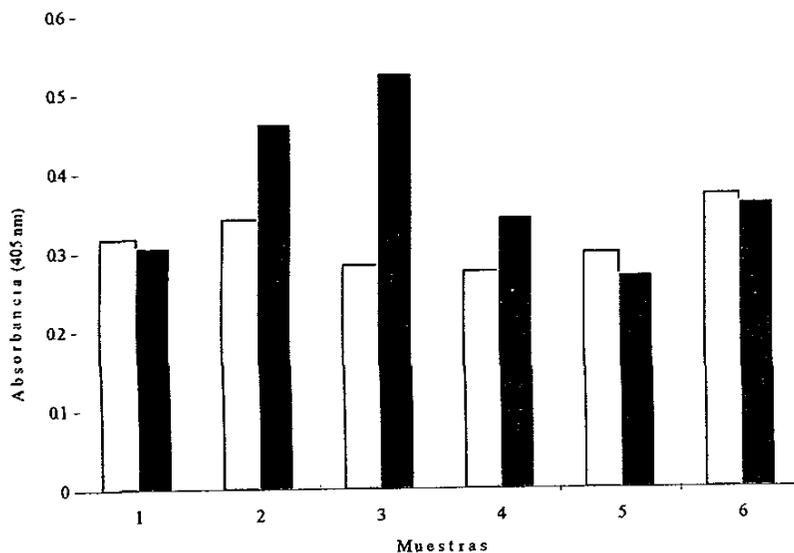


Figura 14. Cinética de aparición de miosina en suero durante la infestación experimental. Para el sistema de captura se utilizaron los Ac Pol (10 µg/ml) y para el revelado los AcM 4B3 conjugados a FA (0.5 µg/ml) Previo a los ensayos los anticuerpos fueron adsorbidos con de suero de animales no infestados. La miosina fue capturada desde suero (1:100, 100µl). La actividad enzimática (30 minutos, 37°C) fue determinada por microensayos utilizando 4NN como sustrato y las lecturas de la reacción fueron a 405 nm. Grupo 1. Animales sin infestación (▲). Grupo 2. Animales infestados y tratados (■). Grupo 3. Animales infestados (◆) La flecha indica el día en que los animales fueron tratados con PZQ (2.4 mg/animal).

**6.6.3. Detección de miosina en suero de humano.** Una vez estandarizada la captura de miosina exógena, se procedió a capturar a la miosina de los parásitos liberada durante las infecciones naturales. Observaciones de tres experimentos muestran (Figura 15) que aparentemente no hay diferencia entre la captura de miosina de individuos sanos o no infestados por el método empleado.



**Figura 15:** Detección de miosina en suero de humanos. Como sistema de captura se usaron anticuerpos policlonales antimiosina purificados y para el revelado, se usaron los AcM conjugados a fosfatasa alcalina (AcM-FA). La reacción y lecturas de la actividad enzimática se hicieron tal y como fue descrito en la Figura 8. Como antígeno se usaron los sueros (1:100). Todas las determinaciones fueron analizadas en ausencia (barras blancas) o en presencia de ATAcO al 2% (barras negras): 1: Ac's policlonales más AcM-FA, 2: suero de humano negativo por CPS, 3: suero de humano positivo por CPS, 4: suero de humano positivo por CPS, 5: suero de humano positivo por CPS, 6: suero de humano positivo por CPS.

## VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

La eficiencia de la infección medida por el número de parásitos recuperados durante el presente trabajo de tesis, analizada con los datos de los animales infestados en ausencia de tratamiento con praziquantel, fue de un 40 % de infestación real aunque los animales restantes a pesar de que fueron negativos a la necropsia pudieron haber estado infestados y también, pudieron haber eliminado a los parásitos antes de que fueran sacrificados. En estudios de este tipo de infestaciones experimentales, monitoreados mediante ensayos de captura de coproantígenos, se ha visto que entre el 80 y 100% de animales se infestan y que depende de las condiciones de control de la infestación; el tiempo y la longitud que alcancen las tenias en el intestino de los hamsters <sup>50</sup>. De acuerdo a esto, en el caso del grupo infestado y tratado con PZQ, es posible que los animales hayan perdido los parásitos por el tratamiento administrado y que cuando se intentó su búsqueda en el intestino no fueron encontrados. Un ejemplo de ello es el hecho de que uno de los animales, que murió antes del fin del tratamiento, después de haberle practicado la necropsia tenía 3 tenias. En este sentido se sabe que luego del tratamiento con PZQ, parásitos como *E. multilocularis* detectados por coproantígenos <sup>58</sup>, aparentemente son eliminados a los dos días posteriores al tratamiento y esto podría presentarse también para el caso de los hamsters analizados, por lo que una semana después del tratamiento, no tuvieron parásito alguno.

Fue exitosa la recuperación de miosina desde los geles y su utilización para la obtención de suero hiperinmune, ya que a pesar de que se requirieron 3 dosis de inmunógeno, los títulos de anticuerpos antimiosina obtenidos fueron muy elevados en comparación con los títulos obtenidos para el suero recuperado antes de la inmunización (Fig. 6B). Aparentemente, los anticuerpos contenidos en el antisuero producido son específicos para la miosina contra la cual se prepararon,

ya que fueron inducidos por la fracción correspondiente separada del gel (Fig. 5) y utilizada con este fin. Con relación a la evaluación de los anticuerpos policlonales antimiosina nativa purificados por cromatografía de afinidad, luego del tratamiento de los sueros hiperinmunes con precipitaciones con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 33%, se observó que los anticuerpos no pierden su reconocimiento luego del tratamiento por precipitación ni por su paso a través de la columna de afinidad (fig. 7C). El análisis de estos anticuerpos purificados mediante GELPOLI al 12.5 % (Fig. 7B) mostró que se encuentran puros ya que solamente se observan las bandas correspondientes a la cadena pesada (50 kDa) y la ligera (25 kDa). De la misma forma cuando se analizó la purificación de los AcM 4B3, desde líquido de ascitis, tanto por precipitación con sales y su paso a través de una cromatografía de afinidad de MAPS II (fig's. 8 A y B), se encontró que estos AcM mantenían su reconocimiento a miosina (fig.8 C) y que también los anticuerpos estaban puros de acuerdo a GELPOLI al 12.5 % en condiciones reductoras (fig. 8B). Estos AcM purificados, una vez que fueron conjugados a fosfatasa alcalina y analizados tanto para proteínas como para la actividad enzimática (Fig.9A) mostraron que casi todos los AcM fueron marcados enzimáticamente. El análisis de titulación del AcM marcado enzimáticamente *mostró que no había* pérdida del reconocimiento antigénico a miosina (Fig. 9B) y que incluso se mantenía el reconocimiento a determinadas diluciones (1 320) como lo visto con AcM sin marcar (datos no mostrados).

Con los anticuerpos puros y marcados se estandarizó la captura de miosina en sobrenadantes de heces de animales sanos, así como de humanos sanos (Fig. 10 A y B). Se encontró, que en ambos casos hay una relación directamente proporcional entre la cantidad de miosina adicionada a las muestras de heces con los valores de absorbancia medidos.

Según los resultados obtenidos, este sistema de captura es muy sensible lo cual podría ser aprovechado para encontrar concentraciones tan pequeñas como 8 ng/ml de miosina contenidos en un gramo de materia fecal solubilizada. Aparentemente en un gramo de materia fecal podrían haber como mínimo hasta 250 ng de proteínas de un parásito<sup>20</sup> medidos por captura de coproantígenos, en el caso de infestaciones experimentales y naturales por *T. solium* se ha encontrado que existen 75 y 35 ng/ml respectivamente de antígenos parasitarios<sup>22</sup>. Si se considera que la cantidad de materia fecal solubilizada, en el caso de teniosis por *T. solium*, corresponde a menos de 1 g, cabría la posibilidad de que se detectara toda la miosina que un solo parásito adulto libera en el hospedero humano o bien, la que más de dos parásitos adultos liberan en los hámsteres infestados.

Aparentemente, en comparación con el grupo de animales no infestados, la miosina de tenias de *T. solium* se incrementa en el grupo infestado desde los primeros días postinfestación. Este incremento gradual podría estar relacionado con el crecimiento de los parásitos dentro del intestino y no con su número, ya que hacia la cuarta semana post-infestación, en donde murió el 20% de los animales por el efecto de la inmunosupresión, se recuperaron 4 tenias y los niveles de miosina capturada disminuyeron. Sin embargo, hacia la quinta y sexta semanas estos niveles se incrementaron gradualmente. Un cálculo de la tendencia de la curva, hasta la cuarta semana post-infestación, muestra que en las semanas post-infestación posteriores podría haber un incremento gradual semejante a lo observado en las dos últimas semanas del experimento (Fig 11). Con relación al grupo 2 de animales infestados y tratados con PZQ, comparados con los animales sin infestar, cabría la posibilidad de que hasta antes de la administración del PZQ las concentraciones de miosina hayan sido tan bajas que no pudieron ser determinadas por el ensayo de captura o bien

que no hubiera sido liberada por los parásitos en esos momentos. Estos comentarios estarían basados en el hecho de que uno de los animales del grupo tratado que murió tuvo 3 tenias al momento de la necropsia y antes de que el animal fuera tratado con el PZQ. Si los demás animales de este grupo tenían al menos un parásito, entonces el método no permitió que se les detectara a través de la prueba para miosina y que podría ser verificado mediante la detección de coproantígenos como ya ha sido establecido <sup>50,58,59</sup> cuando se aplica este tipo de tratamiento. Cabe mencionar que tendrían que ser efectuados otros experimentos semejantes con la idea de clarificar los resultados obtenidos, ya que se sabe que luego de un tratamiento con PZQ los parásitos son eliminados de forma importante luego de cinco días posteriores al tratamiento <sup>58,59</sup> con lo que los coproantígenos desaparecen y, sin embargo, en el presente estudio se encontró que aumentaba la cantidad de miosina luego de tres semanas posteriores al tratamiento. Una de las posibles explicaciones es que podría no haber sido efectivo el tratamiento, por lo que algún parásito sobrevivió, creció (como en las tres primeras semanas observadas para el grupo infestado y no tratado) y ello estaría reflejado en el aumento de la absorbancia en los ensayos de captura. Los resultados obtenidos para el grupo 1 o control muestran que a lo largo del tiempo de experimentación no hubo incremento alguno de la absorbancia y que correlaciona con el hecho de que, a la necropsia, los animales no estaban infestados. Aparentemente, los valores de absorbancia considerados como fondo de reacción y comparados con los del grupo 2 de animales infestados no interfieren en la evaluación de la presencia de la infestación puesto que este fondo está por debajo de las lecturas presentada por los casos en estudio y esto permitiría la proposición de que la miosina podría ser un marcador de la infestación experimental parasitaria por tenias de *T. solium*

Con relación a la detección de miosina en las personas infectadas de forma natural, se encontró que los valores de absorbancia eran mayores que algunos casos de personas no infectadas según los análisis coproparasitoscópicos efectuados. Sin embargo, hubo un caso en donde el valor de absorbancia de una persona no infestada fue semejante a los de individuos infestados (fig. 12). Es claro que, al menos en los casos en que el CPS fue positivo a proglótidos o huevos de parásitos de *T. solium*, correspondieron a valores de absorbancia elevados y lo que sugeriría que los individuos infestados tienen miosina del parásito en sus heces. En uno de los casos negativos a la infestación, de acuerdo a los análisis CPS, los valores de absorbancia podrían estar tan altos como en los casos infestados ya que podría tratarse de un individuo infestado dentro de un periodo prepatente. Esto se menciona, ya que en los análisis CPS no hay eficiencia en la detección de la infestación <sup>20</sup>, mientras que en la determinación por coproantígenos <sup>50</sup> se ha demostrado que el individuo puede estar infestado y este fue el caso en discusión. De acuerdo a estas consideraciones es posible, al igual que en el modelo experimental, la miosina podría funcionar como un marcador de infestación; sin embargo, para llegar a una conclusión más concreta es necesario hacer repeticiones de estos ensayos de captura de miosina utilizando un banco de muestras fecales positivas bien establecido, así como una evaluación de la especificidad del sistema de captura frente a otras infestaciones parasitarias y no parasitarias gastrointestinales.

También, dado que los valores de absorbancia obtenidos en la evaluación de materia fecal de humanos son altos (por arriba de valores de absorbancia igual a 0.4), es necesario efectuar ensayos con tendencia a disminuir los fondos de reacción y que permitan diferenciar realmente entre un individuo sano y otro infestado como en el caso del uso de coproantígenos <sup>22</sup>, ya que se ha establecido que es común la reacción inespecífica de los anticuerpos de detección con los

componentes de la materia fecal<sup>20</sup> Es posible que reduciendo este fondo de reacción mediante la captura efectiva de miosina, el bloqueo de la inespecificidad y el uso de anticuerpos monoclonales específicos podría permitir el desarrollo de un método de diagnóstico de la teniosis por *T. solium* igual o mejor a la detección de coproantígenos.

En lo relativo al análisis de muestras séricas, tanto en el modelo animal como en las de pacientes infestados en forma natural, se encontró que durante estandarización del ELISA de captura se requería de un tratamiento previo del suero con ácido tricloroacético al 2%. Esto puede deberse a que, para la captura de miosina, se requiere disociar a los complejos inmunes presentes (fig 13) y como se observó en el estudio del modelo experimental (Fig. 14), el comportamiento para el grupo de animales infestados sin tratamiento es semejante a lo observado en el grupo de animales control con relación a la detección de miosina en la materia fecal. Esto implicaría que en el suero de los animales infestados, hay miosina del parásito adulto de localización intestinal, sólo que en el suero la miosina estaría acomplejada a anticuerpos como ya ha sido demostrado en el laboratorio (Cruz-Rivera M. en comunicación personal). Si la presencia de la miosina en suero llegara a ser confirmada utilizando este método para otros estudios, ello tendría relevancia en los aspectos de la relación hospedero-parásito en la teniosis tal y como ha sido propuesto en parasitosis como la producida por *Toxocara canis*<sup>60</sup>, ya que en esta parasitosis se detectan seroantígenos que están correlacionados con el inicio de la infestación y con el grado de infestación parasitarias. Esto implicaría que si se detectara la miosina de *T. solium* en suero nuevamente, tanto en el modelo animal como en los pacientes, esto podría ser relevante y novedoso dentro del campo y podría ser empleado con fines de diagnóstico. Sin embargo, cabe mencionar como lo indica Pritchard<sup>20</sup> que como la teniosis es intestinal y no sistémica, los

antígenos no tendrían un adecuado acceso a la circulación y ello podría disminuir mucho su utilidad para detección del parásito.

La determinación de miosina en suero de pacientes infestados muestra que un caso negativo a CPS (muestra No 2) tiene valores mayores de absorbancia que las de los casos positivos (Fig.15), esto necesita ser confirmado mediante otros análisis, para tener la certeza de que este paciente no se encuentra infestado o que alguna proteína diferente a miosina, pero con un epítopo semejante al que reconoce los anticuerpos sea el que se está determinando, así como el uso de un banco mayor de sueros de casos confirmados, ya que el empleo de pocas muestras podría dar resultados muy cargados hacia una parte con respecto a otra y en este caso no permiten hacer algún comentario al respecto, ya que es necesario utilizar como mínimo 30 muestras para poder realizar un análisis estadístico confiable.

Una vez que se hubiera podido adaptar y estandarizar la captura de la miosina mediante el empleo de actina o de anticuerpos específicos para miosina de parásitos adultos, ya que en el presente estudio se utilizaron los producidos contra miosina de cisticercos, así como su revelado por anticuerpos monoclonales, se podría buscar la estandarización de la técnica en un formato más sencillo para su aplicación en campo, tal y como se ha intentado para el desarrollo de captura de coproantígenos por membranas de nitrocelulosa (“dipsticks”) <sup>61</sup>.

La presencia de miosina de parásitos adultos, tanto en el modelo experimental como en humanos infestados naturalmente, podría tener alguna significancia biológica en la relación hospedero-parásito, la cual empleando el modelo experimental de teniosis podría ser abordada ampliamente. Al respecto varias dudas se plantean tales como: ¿De qué sirve al parásito liberar la miosina? ¿La liberación está acompañada con algún cambio morfológico o con algún proceso de

infectividad? ¿ El parásito durante su desarrollo estará sufriendo algún recambio tisular que conlleve a la salida de su proteína estructural? ¿Cómo alcanza la miosina del parásito intestinal el torrente circulatorio de los animales infestados? ¿Cuáles mecanismos de los parásitos están involucrados en la liberación de miosina?.

Otra utilidad que se podría aplicar, luego de la demostración de que la miosina de parásitos está en el suero y en las heces de los seres humanos, sería durante la evaluación de la quimioterapia empleada en estos casos. Esto se basaría en el hecho de que si como se observa en el empleo del modelo experimental, la miosina se incrementa de acuerdo al tiempo de infestación, luego de una quimioterapia se podría evaluar si el parásito aún está presente y creciendo, o bien, si ya desapareció por la efectividad del tratamiento.

Como ya fue indicado la estandarización de la captura de miosina de forma específica, sensible y con reactivos definidos podría tener una aplicación importante para el diagnóstico y ello sentaría las bases para su aplicación a nivel de campo. Además, el conocimiento de la real situación que se presenta por la liberación de miosina de los parásitos daría mayor información en lo concerniente a la relación hospedero-parásito en esta parasitosis.

## VIII. CONCLUSIONES.

- Es claro que la miosina de parásitos adultos de *T. solium* es liberada al medio intestinal a pesar de ser una proteína estructural como ha sido establecido anteriormente<sup>18</sup>.
- De acuerdo a los resultados obtenidos es posible la captura de la miosina de parásitos adultos de *T. solium* mediante la utilización del ELISA estandarizado utilizando anticuerpos específicos, tanto en las infestaciones experimentales y naturales, así como en las muestras en las cuales se adicionó la miosina en forma exógena (suero y heces).
- La combinación de los anticuerpos policlonales y el revelado con los AcM-4B3 facilita la detección de la miosina aparentemente específica, siendo sensible para cantidades como 8ng/ml en materia fecal y suero.
- En el suero se demuestra que la miosina se encuentra presente formando complejos inmunes, los cuales son posibles de disociar utilizando ATAcO al 2%.
- La demostración de que la miosina de parásitos adultos de *T. solium* está en el suero y las heces de los animales de la infestación experimental, apoyaría el empleo de esta prueba estandarizada para la evaluación de tratamientos cestodícos, así como la presencia o ausencia de los parásitos dentro del hospedero y por lo tanto la efectividad del tratamiento.
- Cuando los parásitos adultos infestan a los hamsters, liberan la miosina y su cantidad estaría relacionada con el crecimiento en tamaño de los parásitos, y por lo tanto al periodo de la infestación experimental, por lo que se puede hacer una diferenciación entre los animales infestados y los no infestados, lo que apoyaría el uso de la determinación de miosina como un

marcador de infestación que pueda ayudar al diagnóstico en humanos infestados en forma natural.

- Esta detección temprana de la miosina muestra lo específico del sistema, sin embargo es necesario comparar con otros parásitos o patógenos intestinales comunes en nuestro medio, así como el empleo de un banco de muestras bien establecido que permita a hacer estudios estadísticos confiables para poder tener la certeza de que este sistema pueda ser aplicado a estudios de diagnóstico y tratamiento,
- Finalmente el uso de la prueba de ELISA estandarizada en este estudio, tendría posibilidades de ser utilizada en estudios dirigidos a la relación hospedero-parásito, para profundizar en el conocimiento de esta parasitosis.

## IX. APÉNDICE.

### 9.1 Determinación de proteínas (micrométodo colorimétrico).

El método empleado consistió en la determinación de proteínas con base a lo descrito originalmente por Bradford<sup>43</sup>, y corresponde a una modificación recomendada por el fabricante del reactivo de reacción<sup>62</sup> esta técnica está basada en un microensayo en placa con el reactivo de reacción modificado (BIO RAD Protein Assay) al inicialmente propuesto. La base de la detección de las proteínas está determinado por el cambio de color del reactivo azul brillante de coomasie G-250 que está directamente relacionado con la concentración de proteínas. El colorante, para efectuar la reacción con las proteínas, inicialmente reacciona mediante fuerzas de Vander Walls e interacciones hidrofóbicas con los residuos de arginina y con menor intensidad, con los residuos de histidina, tirosina, triptófano, lisina y fenilalanina.

#### **Preparación de la curva de calibración con proteínas en concentraciones conocidas.**

Como proteínas estándares fueron utilizadas la albúmina sérica bovina fracción V (ASB) e inmunoglobulinas clase G de conejo. Ambas proteínas puras fueron adquiridas comercialmente (Sigma) y se utilizaron dependiendo de la proteína problema a ser cuantificada; ASB en el caso de miosina nativa e inmunoglobulinas en el caso de los anticuerpos antimiosina nativa producidos y AcM-4B3.

Para la curva de calibración, 40  $\mu\text{L}$  de la proteína estándar fueron adicionadas dependiendo de la concentración requerida y se emplearon intervalos de concentraciones de proteína (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 3.2  $\mu\text{g}$ ). Las proteínas fueron analizadas en una placa flexible de 96 micropozos (Micro test III, Becton Dickinson). Luego, las proteínas fueron puestas en contacto con 160  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (dilución 1: 5 con agua bidestilada). El reactivo de Bradford previamente fue filtrado, para eliminar los grumos formados que podrían interferir en el ensayo, a través de una membrana de acetato (Diámetro de poro igual a 0.22  $\mu\text{m}$ ; Cameo 25AS). Posterior a la adición del reactivo colorido, se permitió la reacción por un intervalo de 5 minutos y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. Esta reacción es estable durante 30 minutos. Todas las lecturas fueron tomadas de reacciones hechas por duplicado de las cuales se obtuvieron los valores promedio.

Se hicieron determinaciones de la absorbancia de la proteína en ausencia del reactivo colorido como blanco de reacción bajo las condiciones descritas. Todas las lecturas fueron hechas en un equipo DYNATECH MR 5000 utilizando un filtro de una longitud de onda de 570 nm.

#### **Determinación de la concentración de proteína a muestras problema.**

1  $\mu\text{A}$  de la muestra a analizar, fue aforada a un volumen final de 40  $\mu\text{A}$  utilizando SSAF pH 7.2. Posteriormente la muestra diluida fue tratada como se indicó con la curva de calibración. La determinación de la concentración real se hizo con base a los valores de absorbancia promedio de la muestra y mediante regresión lineal, para lo que se utilizaron los valores promedio de las proteínas estándares y sus concentraciones conocidas. Luego de interpolar estos valores de las muestras con sus correspondientes en la curva se obtuvieron los valores de concentración respectivos y los cuales fueron calculados con su valor real al considerar la dilución inicial de las muestras analizadas.

## 9.2 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.

La necesidad de lograr una separación de las proteínas contenidas en una mezcla de varias, con base a sus pesos moleculares y su migración en un campo eléctrico, hizo necesario el empleo de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida (GELPOLI) en ausencia o en presencia de condiciones desnaturizantes de proteínas. Para su análisis las proteínas fueron solubilizadas, previo a su separación por la electroforesis, en un medio denominado cóctel que contenía un detergente aniónico como el dodecil sulfato de sodio (DSS) con la finalidad de romper las interacciones no covalentes en las proteínas nativas, un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol con la finalidad de separar los puentes disulfuro y ayudar a la pérdida de estructuras secundarias y terciarias permitiendo la estructura primaria<sup>63</sup>. De esta forma, este tratamiento favoreció a que las proteínas más pequeñas se desplazaran más rápidamente que las grandes durante la electroforesis y las proteínas de mayor peso molecular se mantuvieron casi en el punto de aplicación de la muestra. Esta diferencia en la migración de las proteínas, se debe a que los poros formados por el entrelazamiento de la mezcla de acrilamida y bis-acrilamida tienen diferentes tamaños dependiendo de la concentración a la que hayan sido utilizados estos reactivos y esto favorece que las moléculas más pequeñas se desplacen más fácilmente que las moléculas mayores<sup>63</sup>. Las miosinas siempre permanecieron en la parte superior de los geles dado que tienen un peso molecular alto (igual o mayor a 200 kDa).

**Separación electroforética en GELPOLI.** Para estos fines se utilizó una minicámara de electroforesis vertical Hoefer (Mighty Small II, SE 260) con todos los implementos recomendados por el fabricante.

Los geles fueron preparados de acuerdo a como ha sido descrito por Hames<sup>64</sup>, para geles de gradiente continuo a diferentes concentraciones y con los componentes correspondientes para favorecer la gelificación (Ver tabla anexa). Se emplearon dos diferentes tipos de geles, uno inferior o separador para lograr la completa separación de las proteínas y uno superior o concentrador en donde todas las proteínas, previo a su separación, fueron concentradas. En los geles concentradores se utilizaron peines que generaron pozos de 5 a 10 carriles y en los cuales se podían colocar hasta 60 y 30  $\mu$ l de muestra respectivamente.

También se utilizaron peines denominados preparativos para el caso de requerir mayores cantidades de proteína por separar (300  $\mu$ l). Las mezclas de proteínas, luego de haber sido tratadas con el cóctel mencionado y después de someterlas a ebullición en baño María durante 5 minutos para favorecer mas la separación de agregados macromoleculares cuando fue requerido, se adicionaron a cada pozo y puestas a separar electroforéticamente.

Solución Stock	Gel concentrador	Gel separador		
		5%	10 %	12.5 %
	10 %	5 ml	10 ml	12.5 ml
Acrlamida-bisacrlamida	2.5	5 ml	10 ml	12.5 ml
Buffer pH 8.8 <sup>a</sup>	----	3.75 ml	3.75 ml	3.75 ml
Buffer pH 6.8 <sup>b</sup>	1.87	----	----	----
SDS 10%	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l
Persulfato de amonio 1.5 %	0.75	1.5 ml	1.5 ml	1.5 ml
Agua destilada	3.765	19.75 ml	14.45 ml	12.25 ml
TEMED	7.5 $\mu$ l	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l

<sup>a</sup> Solución de Tris-base(tris-hidroximetil aminometano) 2 M pH 8.8

<sup>b</sup> Solución de Tris-HCl (cloruro de tris-hidroximetil aminometano) 2 M pH 6.8

La electroforesis fue lograda mediante una corriente administrada por una fuente de poder GIBCO BRL (M250) bajo condiciones de voltaje de 100 v a 4°C. En el caso de miosinas se permitieron tiempos de separación de dos horas y en el caso de anticuerpos de aproximadamente 1 hora y media. Como marcador del corrimiento electroforético se empleó el azul de bromofenol. Los geles obtenidos luego de la separación electroforética fueron procesados para teñir a las proteínas e identificarlas o para hacer recuperaciones de las fracciones seleccionadas.

**Tinción de geles.** Para la tinción de las proteínas se empleó al azul de Coomassie brillante R-250 <sup>65</sup>. Luego de recuperar los geles de la electroforesis, éstos fueron colocados en una solución que contenía 300 mg de azul de coomasie, metanol al 30%, ácido acético al 10% y agua bidestilada c.b.p. 500ml durante 2 h en presencia de calor a ebullición en una campana de extracción y durante toda la noche a temperatura ambiente. El desteñido de los geles se hizo mediante el empleo de una mezcla de ácido acético al 10% en presencia de calor y en una campana de extracción. En algunos casos se agilizó el desteñido mediante el empleo de una mezcla de metanol-ácido acético (5:1).

Los geles desteñidos fueron fotografiados o digitalizados para su conservación antes de la aplicación de calor y vacío, para su secado mediante una aparato de deshidratación de geles BIORAD 224. Para la identificación de los fragmentos separados electroforéticamente y que correspondían a miosina, se empleó una tinción negativa con acetato de sodio 4 M.<sup>54, 66</sup>

Esta técnica fue empleada luego de que las proteínas fueron separadas por el método preparativo de electroforesis ya que su sensibilidad es muy alta (aproximadamente son detectados de 1 a 2  $\mu\text{g}$  de proteína por fragmento). Además, este método favorece la recuperación de la proteína seleccionada sin que ella haya sido previamente fijada como en el caso de la tinción con azul de Coomassie. Los fragmentos recuperados correspondientes a la miosina nativa (mayores a 200 kDa) fueron tratados para ser utilizados en la preparación de anticuerpos específicos tal y como es descrito en la materiales y métodos de la presente tesis correspondiente a la preparación de anticuerpos policlonales antimiosina.

### 9.3 Análisis, aislamiento, purificación y marcaje enzimático de anticuerpos.

**Titulación de anticuerpos policlonales por ELISA.** Todos los ensayos fueron realizados utilizando microplacas con pozos de poliestireno (MaxiSorp, NUNC) como soporte. Los ensayos fueron reacciones inmunológicas indirectas en las que se empleó la metodología siguiente: **A. Sensibilización.** A  $100 \mu\text{l}$ /pozo de miosina de cisticercos ( $25 \mu\text{g/ml}$ ) solubilizada en solución amortiguadora de carbonatos  $0.1 \text{ M}$  pH  $9.6$  se les permitió su adsorción durante  $2 \text{ h}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, para eliminar el exceso de antígeno no adsorbido, se aplicaron lavados de los pozos durante 3 ocasiones,  $5 \text{ minutos}$  de lavado en cada ocasión, y para los lavados se empleó una SSAF pH  $7.2$ -tween  $20$  al  $0.3\%$  (SSAF-tween) de la cual se adicionaron  $200 \mu\text{l}$  por pozo. **B. Bloqueo.** Para ello fueron adicionados, luego de los lavados,  $150 \mu\text{l}$ /pozo de una suspensión que contenía SSAF-tween  $20$  ( $0.3\%$ ) y leche descremada comercial (Sveltes) al  $5\%$ . El bloqueo fue permitido durante  $1.5 \text{ h}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Luego del tiempo de bloqueo, las placas fueron lavadas nuevamente para eliminar el exceso de solución de bloqueo como ya fue indicado anteriormente. **C. Adición de anticuerpo primario.**  $100 \mu\text{l}$ /pozo del suero hiperinmune antimiosina nativa diluido en SSAF fueron adicionados y se permitió la reacción antígeno-anticuerpo durante  $2 \text{ horas}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Con la finalidad de efectuar la titulación se hicieron determinaciones mediante diluciones dobles seriadas que variaron de  $1:200$  hasta  $1:248000$ . Como controles de los ensayos se empleó el suero del mismo conejo pero previo a su inmunización. Luego del tiempo de reacción se aplicaron lavados como ya ha sido indicado anteriormente. **D. Adición del anticuerpo secundario.**  $100 \mu\text{l}$ /pozo del anticuerpo anticonejo comercial conjugado a peroxidasa (Sigma) (dil.  $1:1000$ ) fueron adicionados y se permitió su reacción con los anticuerpos primarios durante  $2 \text{ horas}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Luego de la reacción, se eliminó el exceso de los anticuerpos secundarios mediante lavados y se procedió a realizar el revelado mediante la adición del sustrato específico. **E. Revelado de la actividad enzimática.** Con esta finalidad fueron adicionado  $100 \mu\text{l}$ /pozo de una solución que contenía o-fenilendiamina (OPD)  $0.4 \text{ mg/ml}$  (Sigma) disuelta en una mezcla ( $1:1$ ) de ácido cítrico  $0.1 \text{ M}$ , citrato de sodio  $0.1 \text{ M}$  y  $4 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al  $30 \%$ .

Luego de la adición se permitió que se efectuara la reacción enzimática durante 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de reacción, esta fue detenida mediante la adición de 100 µl/pozo de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. La reacción colorida obtenida fue medida por su absorbancia ( $\lambda = 490$  nm) en un lector de ELISA (BIO RAD 2550).

**Precipitación de inmunoglobulinas séricas con sulfato de amonio.** Una vez que se recuperaron los sueros hiperinmunes, como primer paso en el proceso de purificación de los anticuerpos, se hizo una precipitación en presencia de sulfato de amonio saturado al 33% (pH 7.8). A 50 ml de suero hiperinmune le fue adicionada, gota a gota y en agitación continua, 25 ml de la sal saturada. Una vez que se obtuvo la precipitación completa, el sedimento fue resuspendido con SSAF pH 7.2 y una vez más se repitió el proceso hasta completar tres precipitaciones. Durante cada proceso de precipitación y con la finalidad de hacer más efectiva la precipitación, la mezcla suero-sal saturada fueron colocadas en agitación continua durante 2 h a 4° C con la finalidad de evitar atrapamiento mecánico de componentes séricos diferentes a los anticuerpos, luego del proceso se aplicó una centrifugación a la suspensión resultante (30 min, 1400 g, temp. amb.). Como ya fue indicado, el precipitado fue resuspendido y utilizado.

Con la finalidad de evitar cualquier precipitación o alteración por la presencia de la alta concentración de sales en las proteínas precipitadas, se procedió a efectuar una diálisis exhaustiva en SSAF pH 7.2 hasta eliminar el exceso de sales. Esta proteína precipitada y dializada fue empleada para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

**Purificación de anticuerpos policlonales por columna de afinidad.** La purificación de los anticuerpos se paso a través de una columna de afinidad de proteína A-Sepharosa comercial (Sigma). Previo a la purificación la columna que contenía al gel fue lavada con 3 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8.0, luego se adicionó la solución que contenía a las proteínas y se permitió su interacción con la columna durante 2 horas a temperatura ambiente o, en su caso, durante toda la noche a 4°C. Luego, la columna fue lavada 5 veces con la misma solución amortiguada mencionada para eliminar aquellas proteínas que no se adsorbieron al gel.

Para separar los anticuerpos de la columna, se utilizó una solución con ácido acético 0.1 M (diluido en NaCl 0.15 M) y se obtuvieron alícuotas fraccionadas de 1 ml recuperadas en presencia de 100  $\mu$ A de solución amortiguada de fosfatos 0.5 M pH 8.0. La detección de la proteína purificada en cada una de las fracciones, se hizo por medición de su absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro (SPECTRONIC 21D). Aquellas fracciones seleccionadas fueron mezcladas, dializadas exhaustivamente contra SSAF a 4°C y luego, la mezcla fue concentrada por presión positiva con N<sub>2</sub> utilizando un equipo de concentración AMICON con una membrana DIAFLO (10 kDa de diámetro de poro). A la muestra concentrada se le hizo una determinación de su concentración de proteínas por el micrométodo de Bradford ya descrito. El criterio de pureza de la proteína se hizo mediante electroforesis en GELPOLI y su actividad biológica de reconocimiento hacia los antígenos contra los que fueron preparados, se hizo mediante inmunopunto (ver mas adelante). Finalmente la proteína pura fue fraccionada en alícuotas, las cuales fueron congeladas a -20 °C hasta su uso.

**Marcaje enzimático de anticuerpos monoclonales.** Estos anticuerpos fueron conjugados a fosfatasa alcalina comercial (Boehringer Mannheim) mediante el método de dos tiempos utilizando glutaraldehído <sup>11</sup>. El fundamento de la técnica está basado en que el glutaraldehído es un ligante bifuncional, el cual se utiliza para fijar la enzima al antígeno o anticuerpo a través de la porción de dialdehído de la molécula y de los grupos aminos de los reactivos y la técnica del marcaje se describe a continuación:

**A. Activación de la enzima.** 6 mg de FA fue solubilizada en 60  $\mu$ l de una solución de glutaraldehído al 1 % (PolySciences Inc.) diluida en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.8. La activación de la FA fue permitida durante 18 h a temperatura ambiente, tiempo después del cual se eliminó el exceso de glutaraldehído mediante filtración en columna (0.9 x 50 cm) de sephadex G25 equilibrada con NaCl 0.15 M. A cada fracción colectada (1 ml) se le determinó su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro (SPECTRONIC 21D), las fracciones con absorbancia que indicaban la presencia de proteína fueron recuperadas, mezcladas y concentradas hasta alcanzar la concentración de 1 mg/ml. El método de concentración utilizado fue mediante presión positiva con N<sub>2</sub>.

**B. Marcaje enzimático de los anticuerpos.** Los anticuerpos utilizados fueron previamente dializados exhaustivamente en presencia de NaCl 0.15 M, luego de la diálisis, la solución con 3 mg de anticuerpos fue mezclada con 60  $\mu$ l de la solución que contenía a la enzima activada en la solución reguladora de carbonato/ bicarbonato 1 M pH 9.5. Luego, se permitió que la mezcla se combinara durante 18 horas a 4°C. Pasado este tiempo, se añadieron 100  $\mu$ l de lisina 1 M, de tal manera que el volumen final de la solución total permitiera que la lisina alcanzara una concentración de 0.1 M (12 horas a 4°C). La adición de este reactivo se hizo con la finalidad de bloquear todos los sitios activados no ocupados por anticuerpos. Luego del bloqueo la solución fue sometida a diálisis exhaustiva con SSAF pH 8 con la finalidad de eliminar la lisina en exceso y equilibrar la solución con la solución amortiguadora. La eliminación del exceso de enzima se hizo mediante una cromatografía en columna de sepharosa G-25, para la cual se usó la SSAF como eluyente. Las fracciones recuperadas (1ml) fueron analizadas para determinar la presencia de la enzima mediante la adición del sustrato 4NFF y lecturas de la absorbancia a 570 nm. Además para determinar la presencia de todas las proteínas también se hizo determinación de la absorbancia de las fracciones a 280 nm. Luego de la selección de las fracciones que presentaran actividad enzimática y proteína, las fracciones fueron mezcladas y concentradas (concentración final 1 mg/ml) utilizando presión positiva con Nitrógeno gaseoso.

La evaluación de la actividad biológica de los AcM 4B3 marcados enzimáticamente se hizo mediante el análisis del reconocimiento hacia miosinas y los análisis que se hicieron fueron de ELISA e inmunopunto (ver mas adelante). Con los AcM 4B3 marcados enzimáticamente, evaluados y concentrados se determinó su concentración de proteína. La solución de los anticuerpos fue mezclada con glicerol (1:1) y la mezcla fue fraccionada en alícuotas y almacenada a -20 °C hasta su uso.

**Titulación de anticuerpos monoclonales marcados enzimáticamente.** Para estas evaluaciones se siguieron algunos de los pasos descritos para el ELISA aplicado en la evaluación de los anticuerpos policlonales. La diferencia fue que los ensayos fueron directos, esto es: 100  $\mu$ l de miosina de cisticercos (25  $\mu$ g/ml) fueron adsorbidas a micropozos, luego se aplicó un bloqueo con SSAF-leche descremada y se adicionaron 100  $\mu$ l de AcM 4B3-FA en diluciones dobles en un intervalo de 1:20 a 1:5120.

Para el revelado de las reacciones se empleó como sustrato 20 mg 4-Nitrofenil fosfato (4NFF) solubilizado en 15 ml de una solución amortiguadora de dietanolamina 1.0 M pH 9.8 y 5 ml de agua destilada. De esta solución amortiguadora con el sustrato fueron adicionados 100  $\mu$ l por pozo y se permitió la reacción enzimática (1 h, 37°C). Luego del desarrollo del color, se determinó la absorbancia en un elisómetro (BIO RAD 2550) ajustado con un filtro para una longitud de onda de 405nm.

**9.4. Determinación de la actividad biológica de los anticuerpos.** El proceso se llevó a cabo empleando membranas de nitrocelulosa (NC) como soporte y un equipo de dotblot (BioRad). En cada pozo fueron adicionados 10  $\mu$ l de miosina semipurificada de cisticercos (10 $\mu$ g/ml), posteriormente se aplicó un bloqueo (2 h, 37°C) empleando ASB al 5% diluida en SSAF-tween 20 al 0.3 % y luego fueron adicionados los anticuerpos policlonales ó monoclonales (dil. 1:1000) (1 h, 37 °C). Posterior a la adición de estos anticuerpos, en el caso de los anticuerpos policlonales se adicionó un anticuerpo secundario (anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa de Sigma) (1:1000) (2 h a 37 °C). Para el caso de los AcM, se empleó como anticuerpo secundario un anticuerpo anti ratón conjugado a peroxidasa (Sigma) (1:1000) (2 h a 37 °C), para el revelado de la peroxidasa se empleó DAB (500 $\mu$ g /ml de SSAF y 6  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Cuando se desarrolló el color la reacción fue detenida con agua destilada.

## X. REFERENCIAS.

1. SARTI E; SCHANTZ P.M; LARA R; GOMEZ H; & FLISSER A. (1988) *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a mexican village. *Tropical Medical Parasitology*. 39. 194-198.
2. RICHARDS.& SCHANTZ, P.M. (1991). Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clinicals Laboratory Medical*. 11.1011-1028.
3. NOM-021-SSA-2-1994. Para la vigilancia, prevención y control del complejo teniasis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica. D.O.F. Tomo CDXCIV. No 9., 31, 58-67.
4. FLISSER A. (1994). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*; Progress in Clinical Parasitology editor i n Chief Tsieh sun, M.D. CRC Press. E:U: I 77-116.
5. DÍAZ-CAMACHO, S., CANDIL. A., SUATE, V., ZAZUETA, M.L., FÉLIX-MEDINA, M., LOZANO, R., & WILLMS, K. (1991). Epidemiological study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of México. *American Journal. Tropical Medicine and Hygiene*, 45,522-531.
6. SCHANTZ, P.M., MORRE, A., MUÑOZ, J.L., HARTMAN, B., SCHAEFER, J., ARON, A., PERSAUD, D., SARTI, E., WILSON, M. & FLISSER, A. (1992). Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *New England Journal of Medicine*. 327, 692-695
7. ALLAN, J.C., VELASQUEZ-TOHOM, M., FLETES, C., TORRES-ALVAREZ, R., LOPEZ-VIRULA, G., YURRITA, P., ALFARO, H. S. DE, RIVERA GARCIA-NOVAL, (1997). Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene*.91 (5), 595-598.
8. FLISSER, A., PLANCARTE, A., Y CORREA, D., (1989). La epidemiología de la cisticercosis humana. En "La cisticercosis en México" (simposio). *Gaceta.Médica.Mexicana*.124: 192-193.
9. SARTI,E.S.,CHANTZ,P.M.,PLANCARTE,A.,WILSON,M.GUTIERREZ,I.O.,LÓPEZ,A.S., ROBERTS,J.,& FLISSER,A.,(1992). Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cisticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, México, *American Journal. Tropical Medicine and Hygiene*.,46,677-684.
10. SCHANTZ, P.M., & SARTI, E. (1989). Diagnostic methods and epidemiological surveillance of *Taenia solium*, infection. *Acta Leidensia*,57,181-189.

11. ALUJA, A., ESCOBAR, A., ESCOBEDO, F., FLISSER, A., LACLETTE, J.P., LARRALDE, C., MADRAZO, Y., VELAZQUEZ, V. & 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 Salud Publica. Fondo de Cultura Económica. México. D.F., 529-539.
12. CORREA D; FLISSER A; SARTI E. (1994). Teniasis-cisticercosis. SSA/INDRE. México. 335-346.
13. FLISSER, A., SARTI, E., BROFMAN, M., Y SCHANTZ, P. (1994). Evaluación de dos medidas de intervención para el control de *Taenia solium* en México. XI Congreso Nacional de Parasitología. CONAPAR 94. 25-27.
14. FLISSER A; MADRAZO I; DELGADO H. (1997) Cisticercosis Humana. Ed Manual Moderno México. 1-64.
15. GEMMELL, M., MATYAS, Z., PAWLOWSKI, Z., SOULSBY, E., LARRALDE, C., NELSON, G.S., & ROSICKI, Z. (1983). Guidelines for surveillance, prevention and control of taeniosis/cysticercosis. VPH/ 83.49. *World Health Organization*, Geneva, 1-207.
16. MOORE, A., LUTWICK, L., SCHANTZ, P., PILCHER, J., WILSON, M., HIGHTOWER, A.M., CHAPNICK, E., ABTER, E., GROSSMAN, J., FRIED, J., WORE, D., HAICHOU, X., HYON, S., BARBOUR, R., ANTOR, R., HAKIN, A. (1995). Seroprevalence of cysticercosis in an orthodox Jewish community *American Journal. Tropical Medicine and Hygiene*, 53 (5). 439-442.
17. SARTI E; FLISSER A; SCHANTZ P.M; GLEIZER M, LOYA M; PLANCARTE A; AVILA G; ALLAN J; CRAIG P; BRONFMAN M; & WIJEYARATNE P.(1997) Developmet and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in rural community in México. *American Journal. Tropical Medicine and Hygiene*. 56 (2) 127-132.
18. AMBROSIO, J., CRUZ-RIVERA, M., ALLAN, J.C., MORAN, E., ERSFELD, K. & FLISSER, A. (1997). Identification and partial characterisation of a myosin-like protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody. *Parasitology*. 114,545-.553.
19. ALLAN, J.C., GARCIA-NOVAL, J., CRAIG, P.S., ROGAN, M., LOWE, B.S., & FLISSER, A. (1991). Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 85,573-576.

20. PRITCHARD; TIGHE & BILLET; (1995). Intestinal helminths-new approaches to diagnosis in Enteric infection 2. Intestinal helminths. Edit Farthing. M.J.G; Keusch G.J; and Dwakelia. E.U247-265
21. CHAPMAN A; VALLEJO, V; MOSSIE, K. G; ORTIZ, D; AGABIAN, N & 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. *Journal of clinical Microbiology*. 33 (5) 1283-1288.
22. ALLAN, J.C., AVILA, G., GARCIA-NOVAL, J., FLISSER, A. & CRAIG, P.S. (1990). Immunodiagnosis of Teniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 101, 473-477.
23. BROWN H.W. (1975). Basic Clinical Parasitology. Appleton-Century-Crofts. New York. 4º .172-177.
24. WHITE CLINTON A.(1997). Neurocysticercosis: A mayor cause of Neurological Disease world wide. *Clinical Infections Diseases*. 24 .101-115.
25. NIETO, D. (1982). Opening adress historical notes on cysticercosis in FLISSER, A., *et al.* (1982). Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perpectives. Academic Press. New York. 1-7
26. ALLAN J; VELASQUEZ M; NOVAL G. J; TORRES A.R; YURITA P; FLETES C; DE MATA F; SOTO H DE ALFARO; CRAIG P. (1996)Epidemiology of intestinal taeniasis in four, rural, Guatemalan communities. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 90 (2) 157-165.
27. SARTI,E.S.,CHANTZ,P.M.,PLANCARTE,A.,WILSON,M.GUTIERREZ,I.O.,ROBERTS,J., & FLISSER,A,(1994). Epidemiologic investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in rural village of Michoacán state, México. *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* . 88, 49-52.
28. ATIAS A; NEGHME A. (1984). Parasitología Clínica. Edit. Mediterráneo. Chile. 29-33.
29. BEAVER C. P; JUNG, C.R; LUPP, W. E.(1992). Parasitología Clínica. 2da Edición Edit. Salvat. México. 435-438.
30. CRAIG & FAUST'S. (1974). Clinical Parasitology. Lea and Febiger Philadelphia. Eight edition. London. Lea and Febinger Philadelphia. 529-539.
31. YOSHINO, K., (1933). Studies on the post-embryoral development of *Taenia solium* , Part III on the develoment of cysticercus cellulosae within the definite intermediate host. *Journal. Medical. Assn, Formasa*. 32,166-169.

32. RIDAURA, C., (1989). Cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México, FLISSER, A & MALAGON F., Eds. Limusa-Noriega, México. 125-127.
33. SCHENONE, H, VILLAROEL, F., ROJAS, A., & RAMÍREZ R., (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America, In Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press 25-38.
34. VIANNA, L.G., MACEDO, V., & COSTA, J.M., (1991). Cisticercose musculo cutanea e visceral - doen carara, *Revist.Institute.Tropical.*, (Sau Paulo). 33,129-136.
35. VILLAGRAN-URIBE, J., OLVERA-RABIELA (1989). La cisticercosis en el material de autopsia del hospital General de México, En Cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México, FLISSER, A & MALAGON F., Eds. Limusa-Noriega, México. 97-105.
36. ZENTENO-ALANIS, G. (1982). A classification of human cysticercosis in FLISSER, A., *et al.* (1982). Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York .107-126.
37. GEMMELL M.A., & LAWSON, J.R. (1989). The ovine cysticercosis as models for research in to epidemiology and control of the human and porcine cysticercosis *Taenia solium* Epidemiological considerations. *Acta Leidensia.* 57 (2) 165-172.
38. LACLETTE.J.P.(1982) Functional properties of antigens B; in FLISSER, A., *et al.* (Eds). Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. New York. (1982). 451-459.
39. PEARSE, V., PEARSE, J., BOCHSHAUM, M., & BUSCHSHAM, R., (1987). Living invertebrates. California. U.S.A. Blackwell Scientific, Publ. The Boxwoud Press, 242-246.
40. SCIUTTO E; ALUJA.A; FRAGOSO.G; RODARTE. L.F; HERNÁNDEZ M; VILLALOBOS M.N; PADILLA A; KEILBACHN; BACA M; GOVEZENSKY T., DÍAZ S; LARRALDE C., (1995). Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Veterinary parasitology* 60. 53-57.
41. LIGHTOWLERS M.W.(1996). Vaccination Against Cestode Parasites. *International Journal for Parasitology.* 6 (8/9) 819-824.
42. ALUJA A. S. ESCOBAR A., ESCOBEDO F., FLISSER A., LACLETTE J. P., LARRALDE C., MADRAZO Y. VELÁSQUEZ V., Y WILLMS K. (1989). Biología del parásito. en: Cisticercosis. Biblioteca de la salud, de SSA/FCE. 15-28.

43. BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive Method for the quantitation of microgran quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
44. CAÑEDO, L., LACLETTE, J.P., MORALES, E., (1982). Evaginación of the metacestode of *Taenia solium* in Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Academic Press. 363-373.
45. FLISSER, A., ESPINOZA, B., TOVAR, A., PLANCARTE, A., CORREA, D. (1986). Host-parasite relationship in cysticercosis. Immunologic study in different compartments of the host. *Vet. Parasitol.* 20:95-102.
46. MAIZELS RICHM; BUNDY DON A.P; SELKIR MURRAY E; SMITH DEBORA & ANDERSON R. M.(1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasitic in human populations. *Nature* 365 795-805.
47. SARKER, S.A., GYR, K. (1992). Non- immunological defence mechanisms of the gut. *Gut.* 33: 987-993.
48. LACLETTE J.P.(1989) The coexistence of *Taenia solium* cisticercosis and the pig: role of the antigen b. *Acta Leidensia* 57. (2).115-122.
49. MC MANUS, D.P. & SMYTH, J.D., (1989). The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press. Great Britain. Cap, 11. 283-304.
50. AVILA, R.G. (1995). 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.
51. LOPEZ,C.L. (1997). Estudio clínico para la detección de individuos con teniosis, por *Taenia solium* a partir de casos conocidos de cisticercosis en instituciones de salud Informe final de servicio social. Fac Med. UNAM. México. D.F.1-21
52. DOWBEN, R.M. (1969). General Physiology. An molecular approach. Harper & Row Publishers, Inc. USA
53. GIESE, A.C. (1973). *Cell Physiology*, 4th edn. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 227-231.
54. HARLOW, E. & LANE, D. (1988). *Antibodies a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. (CSH). USA. 64, 649.
55. AVRAMEAS S, TERNYINCK T. (1989). Técnicas inmunoenzimáticas, Grupo Editorial Iberoamericana. México. 23-25.

56. KATO,H;SUSUKI,T; YOKOMORI,K; SUSUKI,S;OHLAJI,Z; WALANABE,M; YAZAKI,Y; NAGAI,R.(1995). A novel immunoassay of smooth muscle myosin heavy chain in serum . *Journal of Immunological Methods*.185, 57-63.
57. DE JONGE, N; FILLIE, Y.E., DEELDER.A.M., (1987). A simple and rapid treatment (trichloroacetic acid precipitation ) of serum samples to prevent non-specific reactions in the immunoassay of proteoglycan. *Journal of Immunological Methods*. 99 .195-197.
58. SAKASHITA, M, SAKAI, H, KOHNO, H, OOI, H, OKU, Y., YAGI, K, ITO, M., & KAMIYA, M.(1995). Detection of *Echinococcus multicularis* Coproantigens in Experimentally infected Dogs Using Monoclonal Antybody Against Adult Worms *Japan.Journal Parasitology.*, 44,(5), 413-420.
59. DESPLAZES P; GOTTSTEIN B; STINGELIN Y, & ECKERT J. (1998). Detection of *Taenia hydatigena* copro-Antigens by ELISA in Dogs. *Veterinary Parasitology*. 39. 91-103.
60. MATSUMURA, A., KAZUTA.R., ENDO& TANAKA, K. (1984). Detection of circulanting toxocaral antigens in dogs by sandwich enzyme-immunoassay *Immunology*,51. 609-613.
61. ALLAN, J.C.,MENCOS,F, GARCIA-NOVAL, J., SARTLE., FLISSER, A., WANG,Y., LIU,D & CRAIG, P.S. (1993). Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans. *Parasitology* 107, 79-85.
62. BIO-RAD. (1981). Protein assay. Instruction manual. Bio-Rad Laboratories. E.U. 1, 9-10.
63. STRYER, L. (1988). Bioquímica. Tomo1 3a. ed. Reverté, Barcelona 43-47.
64. HAMES, B.& RICKWOOD,D. (1981). Gel electroforesis o Proteins. I.R.L. Press. Englan Oxford. 31-32.
65. MEYER, T.S, & LAMBERTS, B.L. (1965). Use of Coomassie brillant blue R-250 for electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide- gel strips. *Biophysical Acta* 107, 144-145.
66. HIGGINS, R. C. & DAHMUS. (1979). Rapid visualización of protein bands in preparative SDS-PAGE gels. *Analytical Biochemistry*. 93: 257-260.