

00346



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Análisis del tipo de respuesta celular contra  
antígenos de *Taenia solium***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

*(Biología celular)*

**P R E S E N T A**

**MARIA EDITH MEDINA ESCUTIA**

MÉXICO, D.F.

2001.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**Análisis del tipo de respuesta celular contra  
antígenos de *Taenia solium***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

*(Biología celular)*

**P R E S E N T A**

**MARIA EDITH MEDINA ESCUTIA**

**DIRECTOR(A) DE TESIS:**

**DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRÁN.**

## *Dedicatoria*

*A Joaquín, Joaquín Enrique y Rodrigo*

*Tonatiuh, por ustedes tratare de ser mejor*

*cada día*

*¡Los amo!*

*A mis padres, gracias por ser un ejemplo*

*para todos sus hijos, los quiero mucho.*

*A mis hermanos: Julian, Guadalupe,*

*Javier, Adolfo, Edmundo y Arturo, que*

*siempre me han hecho más agradable la*

*vida*

*De manera especial a Rosy, gracias por*

*todo su apoyo*

*A Dios, que me ha dado tantas cosas maravillosas*

*María Edith Medina Escutia*

## *Agradecimientos*

*A mis amigas Yola Lola y Ame, gracias por su apoyo y amistad*

*A mis amigos y compañeros del laboratorio Lola, Yola, Amé, Chelo, Zoila, Ara, Olga, Juan Carlos C, Juan Carlos del M. Lolita T, Toño, Roberto, Ricardo, Ernesto, Armando y Mario, que siempre me apoyaron*

*A mis asesores: Dr. Rolando Javier Ambrosio Hernández,  
Dr. Alejandro Escobar Gutiérrez  
M en C. América del Pilar Mandujano Martínez  
Dra. Patricia Margarita Fato Zaldivar  
Dr. Hiram Olivera Díaz  
M. En C. Guillermina Avila, por su valiosa colaboración*

*A toda persona que de alguna manera colaboro para la realización de este trabajo*

*Esta tesis se realizó en el laboratorio de Citoensayos del Departamento de Biotecnología en el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, y fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 1387-PM y 28967M)*

## ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
ACF	Adyuvante completo de Freund
AcMo	Anticuerpo monoclonal
AgB	Antígeno B o paramiosina del metacésto de <i>Taenia solium</i>
ASB	Albúmina sérica bovina
CD3, CD4, CD8	Co-receptores de los linfocitos T
cDNA	Cadena complementaria de ácido desoxirribonucleico
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
Con A	Concanavalina A
CP	Célula plasmática
CPA	Célula presentadora de antígeno
cpm	Cuentas por minuto
Da	Daltones
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Extracto crudo del metacésto de <i>Taenia solium</i>
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático (Enzyme Linked-Immunsorbent Assay)
ES	Productos de excreción-secreción del metacésto de <i>Taenia solium</i>
F1, F2, F3	Fragmentos amino, central y carboxilo de la paramiosina
Fab	Fragmento de la inmunoglobulina que se une al antígeno
Fc	Fracción cristalizabile de la inmunoglobulina
g	gravedades
Gps	Glicoproteínas
IEF	Inmunolectroforesis
IET	Inmunolectrotransferencia (Western blot)
IFN- $\gamma$	Interferón gama
Ig (s)	Inmunoglobulina (s)
IL	Interleucina

# CONTENIDO

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	2
I. INTRODUCCION	4
Aspectos históricos de la cisticercosis	4
Ciclo biológico y morfología de <i>Taenia solium</i>	5
Relación huésped-parásito en cisticercosis	8
Sintomatología, tratamiento y diagnóstico	12
Datos epidemiológicos	13
Control de la cisticercosis	14
Respuesta inmunológica	14
Respuesta inmune humoral en la cisticercosis	16
Respuesta inmune celular en la cisticercosis	16
II. JUSTIFICACION	19
III. OBJETIVOS	21
IV. HIPOTESIS	22
V. MATERIALES Y METODOS	23
Grupo de estudio	24
Técnicas de laboratorio	24
1. Extracto crudo de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	24
2. Antígeno B recombinante	25
3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica	26
4. Búsqueda de anticuerpos específicos	26
5. Biometría hemática y conteo de células CD3+/CD4+ y CD8+	27
6. Ensayos de proliferación celular	27
7. Análisis del tipo de citocinas producidas	28
7.1. Extracción del RNA total	28
7.2. Síntesis de cDNA	29
7.3. Amplificación del fragmento de interés por PCR	29
7.4. Identificación de productos de PCR en geles de acrilamida	31
Métodos estadísticos	31
VI. RESULTADOS	32
Análisis electroforético de los antígenos del cisticerco de <i>Taenia solium</i>	32
Características generales	33
Estado inmunológico	35
Ensayos de proliferación celular con antígenos de <i>Taenia solium</i>	35
Determinación de citocinas	38
Asociaciones encontradas	42
VII. DISCUSION	45
Ensayos de proliferación celular	45
El perfil de citocinas	48
VIII. BIBLIOGRAFIA	52

## RESUMEN

La cisticercosis es un problema de salud en México. Se conocen diversos aspectos de la respuesta inmune humoral en esta parasitosis, pero los trabajos enfocados a conocer la respuesta inmune celular son pocos. Algunos reportes sobre la respuesta inmune de individuos con cisticercosis, sugieren que el parásito induce un estado de inmunosupresión. En este trabajo de tesis se presentan los resultados obtenidos de un estudio de individuos con cisticercosis activa que no se les había tratado con medicamento cestocida o inmunodepresor y un grupo control. Se determinaron los valores de biometría hemática y la proporción de linfocitos CD3, CD4 y CD8, en los cuales no se observaron diferencias entre los grupos. Se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular y los datos mostraron que ambos grupos respondieron con altos índices de proliferación a la concanavalina A, este hallazgo sugiere que la capacidad de los linfocitos a responder a mitógenos inespecíficos es similar en ambos grupos. No obstante, los pacientes respondieron en mayor proporción e intensidad a un extracto crudo del parásito en comparación con el grupo testigo, y ambos grupos respondieron a un antígeno purificado del cisticerco (AgB). Se evaluó la respuesta proliferativa hacia tres fragmentos del AgB y se observó que fue igual hacia las regiones amino y carboxilo terminal en los pacientes, por el contrario el grupo control respondió preferentemente a la región amino y en este grupo la menor respuesta se observó hacia la región carboxilo. Se llevó a cabo también un análisis de mRNA para IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-4 en células mononucleares de sangre periférica y se encontró IL-2 en más del 60% de los pacientes y del grupo control; IL-10 e IL-4 se detectaron en baja frecuencia en ambos grupos; no obstante, se observó un incremento del IFN- $\gamma$  en el grupo de pacientes comparado con el grupo control. Se llevó a cabo un análisis de los datos y se observó que existe una asociación entre la producción de IFN- $\gamma$  en los pacientes y la respuesta proliferativa mayor de 2 IP al fragmento amino de la paramiosina, estos datos sugieren un perfil del tipo Th0/Th1 en los individuos con cisticercosis activa. Se pretende continuar con el estudio con el propósito de identificar epítomos relacionados con la respuesta celular.



IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IP	Indice de proliferación
kDa	Kilo daltones
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Macrófago
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
NC	Neurocisticercosis
pb	Pares de bases
PB10x	Solución de fosfatos de sodio 0.1M, pH 7.2
PBS	Solución de NaCl 0.15 M, amortiguada con fosfatos de sodio 0.01M, pH 7.2
PBS-T	PBS con tween-20 al 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHMB	p-hidroxi-mercuri-benzoato de sodio (inhibidor de proteasas)
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro (inhibidor de proteasas)
PSA	Persulfato de amonio
RM	Resonancia Magnética
RPMIc	Medio RPMI complementado
RT-PCR	Reversotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa
SBH	Solución balanceada de Hanks
SNC	Sistema nervioso central
TBE	Trisma-base EDTA
TC	Linfocitos T citotóxicos
TCo	Tomografía computada
TCR	Receptor de linfocitos T (T cell-receptor)
TH	Linfocitos cooperadores
TLCK	N- $\alpha$ -p-tonsil-lisina cloro-metil-cetona (inhibidor de proteasas)
TPCK	L-1-tonsilamida 2-feniletil-cloro-metil-cetona (inhibidor de proteasas)
VEB	Virus de Epstein Bar

## I. INTRODUCCION

### *ASPECTOS HISTORICOS DE LA CISTICERCOSIS*

En 1948, Dionisio Nieto hizo una descripción de la historia del conocimiento de la cisticercosis. Los siguientes párrafos contienen algunos datos.

La cisticercosis fue reconocida desde la antigüedad, probablemente los primeros testimonios que la relacionan con el hombre sean de la época de Moisés, que por instrucciones médicas dictó leyes sanitarias de protección contra la carne de animales infectados con "piedras" perjudiciales para la salud; también los antiguos griegos, en los tiempos de Aristóteles (384-332 a.C.) en el documento titulado "Historia de los animales" por primera vez describe la enfermedad en cerdos; sin embargo no se entiende la naturaleza de la parasitosis.

Rumler, en 1558, describió la neurocisticercosis (NC) humana como un tumor en la duramadre del cerebro de una persona epiléptica. Posteriormente, Panarolus observó cisticercos en el cuerpo calloso del cerebro de un sacerdote y Wharton, los describe como glándulas en el tejido adiposo y muscular de algunos soldados. Esta enfermedad era ya considerada como una parasitosis en 1697, cuando Malpighi descubrió su naturaleza; Goeze ignorante de estos reportes, examinó cerdos con cisticercosis y lo identificó como un helminto.

La cisticercosis en cerdos fue asociada a la teniosis humana por Van Beneden en 1853, cuando le dio huevos de *Taenia solium* a un cerdo y después logró identificar numerosos cisticercos en su cuerpo. Kuchenmeister en 1855 demostró la asociación entre el cisticerco y el desarrollo de la solitaria, cuando dio de comer carne parasitada a reos condenados a muerte y observó la forma adulta en el intestino después de la autopsia. Yoshino, en 1933, describió el desarrollo de la cisticercosis en cerdos.

La clasificación genérica de "*Cysticercus cellulosae*" fue dada por Zeder y por Rudolphi, pero después se descubrió que se trataba del metacéstodo de *Taenia solium*; sin embargo, el término de cisticerco tipo celuloso continua siendo usado.

Otra aportación provino del seguimiento de soldados que adquirieron neurocisticercosis. El hallazgo principal fue conocer que el tiempo que transcurre entre la infección y la aparición

de síntomas es de aproximadamente 7 años, pudiendo ser hasta de 30 (Dixon y Lipscomb, 1961).

### ***CICLO BIOLÓGICO Y MORFOLOGÍA DE Taenia solium***

*Taenia solium* es un céstodo de la familia Cyclophyllidae conocido comúnmente como “solitaria”, en su forma de gusano adulto (Fig. 1 A) y como “cisticerco” (Fig. 1 C), en la forma de metacéstodo. Este parásito es hermafrodita, con 3 estadios de desarrollo, dos de ellos parasitarios (adulto y metacéstodo) y uno de vida libre (huevo). La figura 1 esquematiza el ciclo de vida, que inicia con la forma adulta (Fig. 1 A), que vive en el intestino delgado del ser humano (huésped definitivo), el cual la adquiere al consumir carne de cerdo con cisticercos viables. La masticación, las sales biliares y las enzimas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la salida o evaginación del cisticerco, que permite que se ancle en la pared del intestino por medio del escólex que le sirve como órgano de fijación (Fig. 1 A) (revisado en Cañedo y col., 1982). Este órgano cuenta con un ganglio nervioso, 4 ventosas y una doble corona de ganchos llamada rostelo; después, continúa una parte delgada y alargada denominada cuello, a partir del cual se desarrolla el estróbilo, constituido por segmentos llamados proglótidos, los cuales pueden identificarse en tres tipos: inmaduros, maduros y grávidos. Los más cercanos al cuello son los inmaduros, continúan los maduros, los cuales pueden considerarse como órganos de reproducción independientes pues ahí ocurren la fecundación y la producción de embriones. Los proglótidos más lejanos al escólex son los grávidos, los cuales contienen miles de huevos que son expulsados del intestino con las heces, generalmente dentro de los mismos proglótidos. Los huevos (Fig. 1 B), al salir al medio pueden estar maduros o inmaduros; estos últimos, terminan su maduración en el medio ambiente y permanecen viables e infectantes por semanas o meses (Aluja y col., 1987).

El parásito adulto alcanza a medir entre 2 y 6 metros en aproximadamente 4 meses. Su alimentación es a través del tegumento, la capa más superficial del gusano, ya que carece de sistema digestivo.

El ciclo biológico continúa cuando los huevos que están en las heces de individuos teniásicos son consumidos por el cerdo, huésped intermediario natural. Esos huevos miden aproximadamente 30µm de diámetro; están rodeados de una capa celular llamada vitelo, la cual, a su vez, rodea una estructura denominada embrióforo, que consiste en una serie de bloques proteínicos que se encuentran unidos entre sí por una proteína cementante (Fig. 1 B).

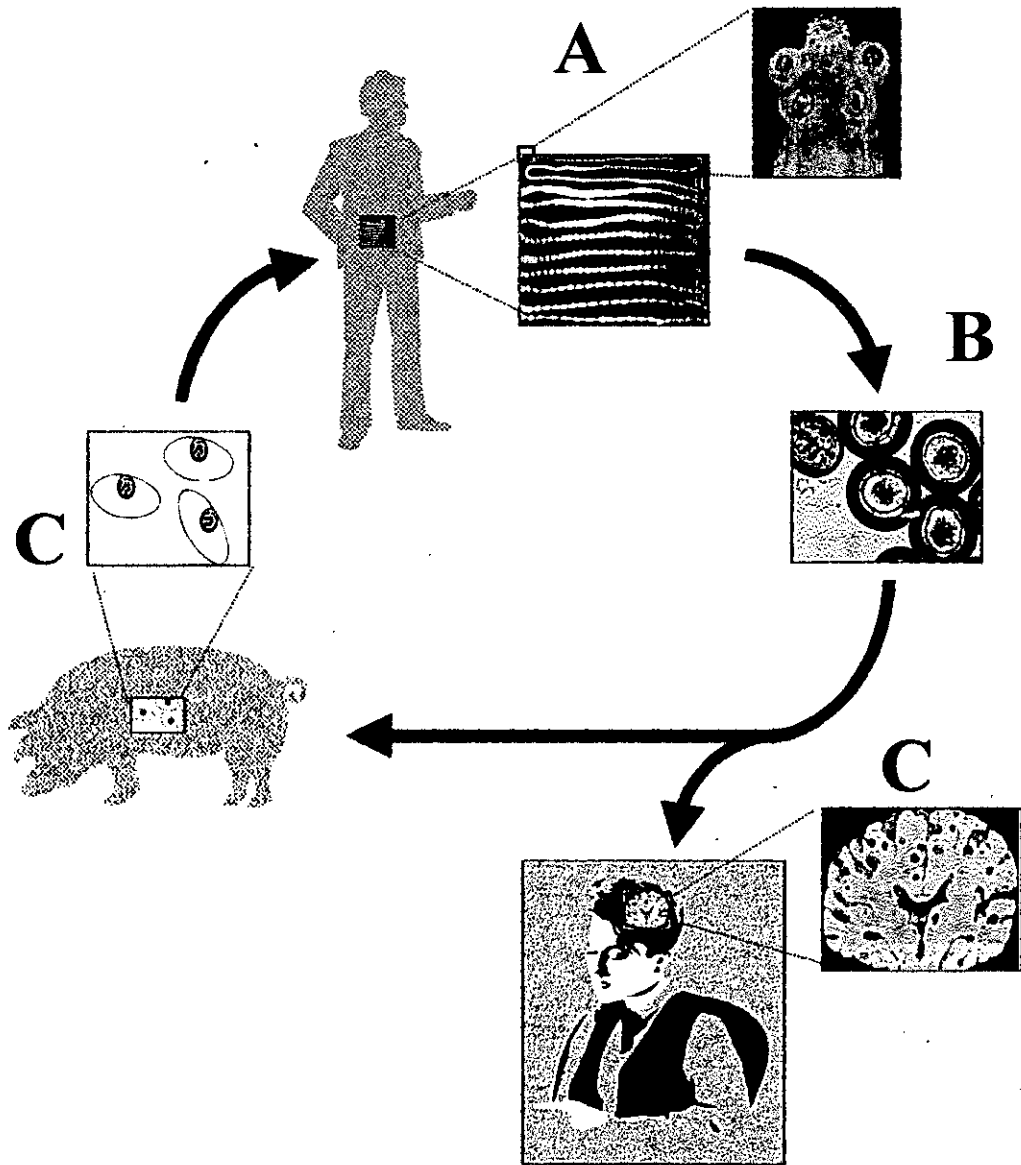


Figura 1. Ciclo de vida de *T. solium*. La tenia (A), se hospeda en el intestino delgado del ser humano, y produce huevos (B), que se liberan al ambiente junto con las heces. El cerdo, o el ser humano, se infectan por la ingestión de los huevos, los que se desarrollan para formar los cisticercos (C). El ciclo se completa cuando el hombre ingiere carne de cerdo contaminada con cisticercos viables, que al entrar en el aparato digestivo evaginan y se anclan en la pared intestinal para desarrollarse en parásito adulto (A).

Hacia adentro se encuentra la membrana oncosferal que cubre a la oncosfera o embrión hexacanto llamado así porque tiene tres pares de ganchos (Laclette y col., 1982). Cuando los huevos entran al estómago del cerdo, las enzimas gástricas e intestinales destruyen los bloques embriofórales liberando al embrión (Laclette y col., 1982).

Se sugiere que los embriones ya liberados, con la ayuda de sus ganchos y su actividad enzimática, pueden adherirse a la pared intestinal y atravesarla hasta llegar al torrente circulatorio o linfático, y ser transportados a diversos órganos y tejidos como músculo, SNC, ojo o tejido subcutáneo. Ya establecidos, aumentan de tamaño y se desarrollan hasta formar los cisticercos (Flisser, 1994). El ciclo se completa por el consumo de la carne de cerdo contaminada con cisticercos viables por el ser humano hasta desarrollar una nueva tenia.

El cisticerco tipo celuloso mide de 0.5 a 1.5 cm, y consta de una vesícula traslúcida, ovoide o circular que contiene fluido vesicular y al escólex invaginado. La pared vesicular es un tejido sincicial, cuya superficie externa muestra un epitelio cubierto de microvellosidades o microtricas, a través de esta superficie ocurre el intercambio metabólico e inmunológico entre el huésped y el parásito y se le conoce como tegumento, este se conecta con los citones tegumentales a través de puentes citoplásmicos llamados procesos internunciales, mientras que por debajo del tegumento se encuentran varias capas de músculo liso, bolsas de almacenamiento de glucógeno y grasas y un sistema protonefridial constituido por varios tipos celulares como las células flama y las células de los canales (Ramírez-Bon y col., 1982).

El hombre o el cerdo adquieren la cisticercosis al ingerir huevos de *T. solium*, las fuentes de infección pueden ser varias; el consumo de alimentos o agua contaminados, por autoinfección, ya que es posible que el individuo con teniosis se infecte a sí mismo; por cohabitación con un individuo con teniasis, lo que significa que la transmisión puede ocurrir directamente (Díaz-Camacho y col., 1989)

Una variedad morfológica diferente de cisticerco, identificada únicamente en el encéfalo de los seres humanos, es el denominado "cisticerco racemoso" el cual tiene una forma lobulada semejante a un racimo de uvas, no tiene escólex y sólo consta de una pared vesicular muy desarrollada (Rabiela-Cervantes, 1989). Se cree que es una transformación del cisticerco celuloso, pues se han descrito formas intermedias entre ambos tipos (Rabiela y Flisser, 1990). Las causas de que el cisticerco cambie a esta forma se desconocen, pero sólo se han encontrado este tipo de cisticercos en las cavidades o en el espacio subaracnoideo y se les

asocia con una patología más grave y una reacción inflamatoria mayor (Macías y Hernández Peniche, 1966; Rabiela-Cervantes, 1989).

### ***RELACION HUESPED-PARÁSITO EN CISTICERCOSIS***

El cisticerco es un parásito tisular del cerdo y el ser humano que carece de sistema digestivo, debido a esto los fenómenos metabólicos e inmunológicos entre su huésped y él ocurren en el sitio donde se desarrolla el metacéstodo, por ello a este nivel se ha estudiado la presencia de componentes de la respuesta inmune tanto humoral como celular. Por lo anterior, es posible que el parásito haya desarrollado mecanismos de evasión inmunológica que permitan que la relación huésped-parásito se mantenga "pacíficamente" hasta por periodos de tiempo prolongados. Se han sugerido varios mecanismos que pueden estar ocurriendo en el sitio donde se localiza el cisticerco, en la figura 2 se esquematizan.

Respecto a la respuesta humoral, Willms y Arcos en 1977 demostraron la presencia de IgG porcina en la superficie de los cisticercos y a mediados de los ochentas, Correa y col., (1985), encontraron varias clases de Ig y C3b en la superficie del cisticerco sin que hubiera evidencia de daño al parásito, esto sugería la presencia de receptores para el Fc de las inmunoglobulinas en la superficie del cisticerco, que podrían estar capturando a los anticuerpos como una forma de bloqueo de la respuesta humoral. Se planteo la hipótesis de la existencia de un receptor y en este sentido, tanto los trabajos realizados en cerdos, como en seres humanos hacen suponer que las Ig adsorbidas a la superficie parasitaria pueden estar unidas a través de esta fracción (Willms y Arcos, 1977; Correa y col., 1985). Mandujano y col., (1990), observaron que en un extracto crudo de *T. solium*, existe un componente que une Ig y fragmentos Fc con 100 veces mayor avidez que los Fab y que no une albúmina. Por otro lado, los estudios realizados por Hayunga y col., (1989), con el metacéstodo de *T. taeniaeformis*, y por Ambrosio y col., (1994), con *T. crassiceps* indican que los cisticercos endocitan Ig, aunque no existe evidencia de que este proceso sea mediado por un receptor. Respecto a la hipótesis de que el cisticerco endocita anticuerpos, algunos autores además sostienen la idea de que el cisticerco podría estar estimulando la producción de anticuerpos en su huésped para utilizarlos como una fuente de proteína (White y col., 1997).

Por otro lado, se ha observado que los cisticercos son susceptibles al ataque del complemento *in vitro* (Correa y col., 1987). También se observo *in vitro*, que las oncosferas de

*T. solium* se mueren en presencia de suero de pacientes con cisticercosis inactivado por calor y reconstituido posteriormente con complemento (Molinari y col., 1993). La resistencia de ratones a la infección con oncosferas de *Taenia taeniaeformis* requiere también de complemento (Davis y Hammerberg, 1988). El cisticerco de *T. taeniaeformis* también es capaz de evadir la destrucción mediada por el complemento a través de la teniaestatina que inhibe tanto la vía clásica como la alterna, a través de polisacáridos sulfatados que son liberados hacia la interfase huésped-parásito y activan al complemento lejos de él (Leid y col., 1987). Por lo anterior es posible que el cisticerco produzca algunas sustancias que actúan sobre el complemento.

Existe una molécula del cisticerco que ha sido objeto de varios trabajos, el denominado antígeno B (AgB), esta proteína es un antígeno inmunodominante en cisticercosis porcina y humana (Flisser y col., 1980). Estudios de inmunolocalización indican que este antígeno se encuentra presente en el músculo y en el tegumento del cisticerco (Laclette y col., 1987, 1995). También pudo ser identificada *in vitro*, al cultivar cisticercos por lo que se sugiere es una proteína que se libera hacia los tejidos del huésped (Laclette y col., 1987). El AgB se puede unir a colágena (Plancarte y col., 1983), esto llevó a preguntarse si existe otra molécula con estructura colagénica que pudiera unirse al AgB; con este fin se estudió al C1q (subcomponente del C1, que forma parte del primer componente de la vía clásica de activación del complemento), al unírsele al C1q el AgB es capaz de inhibirlo (Laclette y col., 1987, 1991, 1992). Es posible que el cisticerco produzca varias sustancias que inhiben al complemento, pues en ensayos de hemólisis tradicionales con un extracto carente de AgB, hubo inhibición de la actividad del complemento (Gómez García, 1993). Hammemberg y Williams (1978) identificaron hace varios años un factor anti-complementario en extractos del metacéstodo de *T. taeniaeformis*, cuya composición química estaba relacionada con el ácido siálico.

Respecto a los componentes de la respuesta celular, se ha observado que aunque el cisticerco logra mantener una relación en equilibrio con su huésped, éste es capaz de producir un infiltrado inflamatorio alrededor del parásito, compuesto por varios tipos celulares que puede eventualmente eliminar al parásito, entre los tipos celulares presentes se encuentran eosinófilos y macrófagos. Se observó que después de que los cerdos parasitados son tratados con praziquantel, los eosinófilos pueden ocasionar daño al metacéstodo iniciando su destrucción y los macrófagos se asocian a la limpieza de *debris* celulares. En la reacción

inflamatoria también se pueden observar células epitelioides, células gigantes multinucleadas, linfocitos y células plasmáticas (Aluja y Vargas, 1988; Aluja, 1989; Flisser y col., 1990 a). Al llevar a cabo un análisis ultraestructural de cisticercosis porcina, cuando se observan los metacéstodos sin alteraciones aparentes, los eosinófilos cercanos a la superficie tegumentaria se observan “degranulandos” (Willms y Merchant, 1980); otra interpretación podría ser que estén siendo dañados por productos parasitarios, como mecanismo de evasión inmunológica. Con el propósito de evaluar si el cisticercos produce sustancias con efecto sobre los eosinófilos, se llevaron a cabo experimentos de incubación de eosinófilos y macrófagos con productos de excreción y secreción (ES) del parásito *in vitro* o con extracto crudo (EC) del mismo, se observó que solamente los productos ES frescos afectaron la viabilidad de eosinófilos, mientras que no tuvieron efecto sobre su viabilidad los mismos productos que se habían conservado en congelación, ni el EC (Medina Escutia, 1992). Por otro lado, no se observó efecto sobre la viabilidad de los macrófagos con alguno de los productos mencionados (Alvarado Rodríguez, 1995). Esto sugiere que los cisticercos liberan una sustancia lábil que afecta la viabilidad de los eosinófilos cercanos, lo que les permite mantenerse libres de su ataque y cuando el equilibrio de la relación huésped-parásito se rompe, por efecto de tratamiento o envejecimiento de los cisticercos, éstos dejan de producir la sustancia lítica, y entonces son atacados por los eosinófilos. Como se mencionó anteriormente existen otros tipos celulares cercanos al parásito como linfocitos y células plasmáticas, que sugieren que además de producción de anticuerpos también puede producirse citocinas a nivel local, los cisticercos tal vez cuenten con algún mecanismo evasivo contra estos componentes del sistema inmunológico del huésped.

Otro mecanismo de evasión propuesto es la producción de sustancias inmunosupresoras, tal como la molécula rica en RNA de bajo peso molecular que afecta la proliferación de linfocitos estimulados con concanavalina A *in vitro* (Molinari y col., 1990) y la reacción inflamatoria alrededor de cisticercos implantados de manera subcutánea en ratones (Tato y col., 1995). Esta molécula también afecta la producción de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  (Arechavaleta y col., 1998). Por otro lado, se ha observado que la frecuencia de linfocitos poliploides en los cerdos con cisticercosis es mayor a la de los normales (Flisser y col., 1990b). En un estudio Correa y col., (1989), encontraron que los pacientes con cisticercosis tenían una menor respuesta proliferativa a mitógenos *in vitro*, comparada con personas sanas.



Otro mecanismo de evasión inmunológica podría ser que el cisticerco se aloja en sitios que se denominan inmunoprivilegiados como el SNC y ojo; ésto ayuda a que los parásitos puedan sobrevivir por más tiempo que aquellos localizados en otros órganos, debido a que no se activa una respuesta inmunológica que pueda causarles daño (Barker y Billingham, 1977). Dixon y Lipscomb (1961), encontraron que los parásitos pueden sobrevivir hasta 30 años en el SNC.

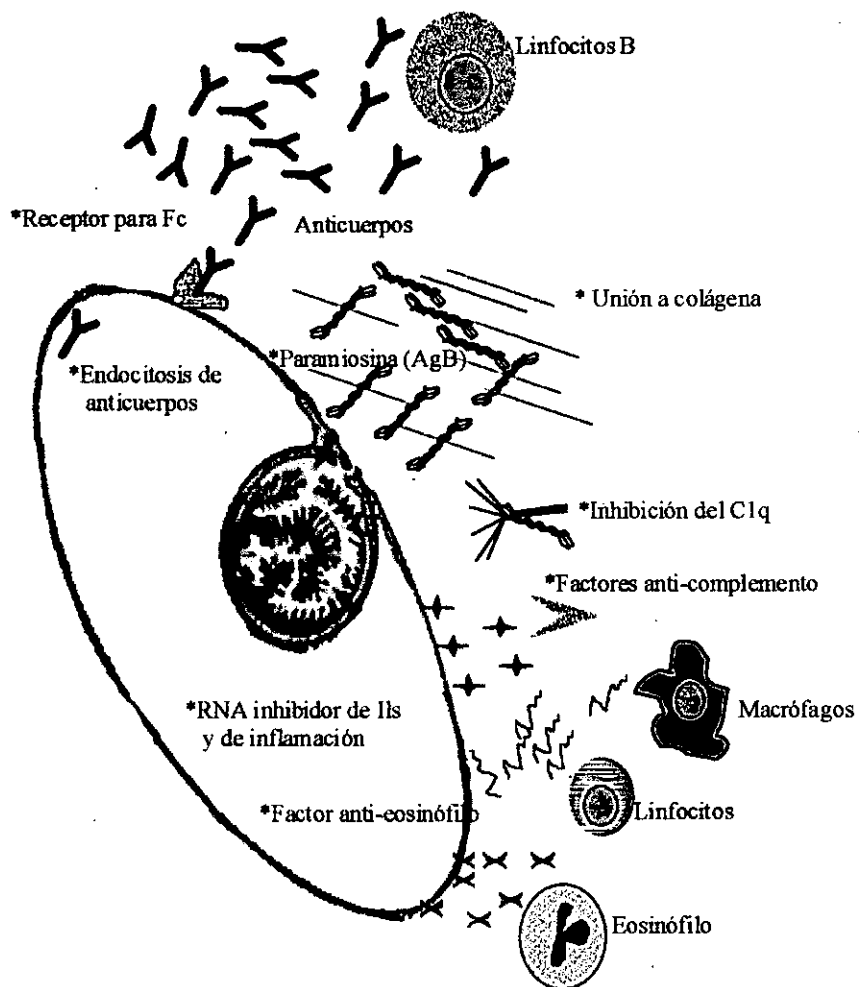


Figura 2. Mecanismos de evasión inmunológica propuestos para el metacéstodo de *Taenia solium* (modificada de Correa y col., 1994).

## **Sintomatología, tratamiento y diagnóstico**

Cierta proporción de los casos de NC humana son asintomáticos y sólo son identificados en estudios de autopsia (Macías y Hernández-Peniche, 1966; Rabiela-Cervantes, 1989). Se ha reportado una enorme heterogeneidad en la sintomatología clínica, perturbaciones sensoriales o motoras leves, crisis convulsivas, cefalea y cuadro de hipertensión endocraneana debido a la obstrucción de la circulación de LCR, que puede provocar la muerte (revisado en Flisser y col., 1997). Cuando el cisticerco se establece en el ojo puede ocasionar ceguera (Cárdenas, 1992).

Con relación a la cisticercosis porcina, poco se conoce pues aunque aparentemente no induce alteraciones o éstas son muy leves, la infección en el cerdo es frecuentemente masiva y también afecta al SNC (González y col., 1987).

Algunos años atrás, la única opción de tratamiento contra la neurocisticercosis humana era la quirúrgica y pocas veces se lograba la extracción del cisticerco (Escobedo, 1988). Actualmente, existen medicamentos con efecto cestocida, como el prazicuantel y el albendazol (Sotelo y col., 1989); su uso ha sido de gran ayuda, principalmente en casos con cisticercosis parenquimatosa y subaracnoidea. Existe la polémica en relación al tratamiento, ya que mientras algunos opinan que el medicamento ayuda a los pacientes, pues evita la calcificación del parásito y por ende, que se generen crisis convulsivas (Vázquez y Sotelo, 1992), otros proponen, que el tratamiento acelera una reacción inflamatoria muy severa, la cual es más benigna si se deja que ocurra de manera natural (Miller y col., 1983). En algunos casos se ha propuesto que deben ser vigilados pero no tratados, ya que han observado la desaparición espontánea de las lesiones.

La tomografía computarizada (TCo) también es utilizada para el diagnóstico de la neurocisticercosis (Rodríguez Carbajal y Boleaga-Durán, 1982), gracias a este método se logró identificar casos con lesiones quísticas sin necesidad de intervención quirúrgica, este método mostró tener alta sensibilidad para casos con cisticercosis subaracnoidea y parenquimatosa. Más recientemente, se empezó a utilizar la resonancia magnética (RM) (Ramos y col., 1986), esta técnica tiene una mejor resolución y proporciona una imagen comparable a un corte anatomopatológico con lo que se puede determinar la etiología de los pacientes con alta sensibilidad. A pesar de lo preciso y sensible que son estos métodos de

diagnóstico, resultan inaccesibles para gran parte de los pacientes por su alto costo, y prácticamente no se utilizan en estudios epidemiológicos.

Desde hace varias décadas se desarrollaron métodos para la determinación de anticuerpos anticisticercos en el LCR o en el suero de los pacientes (Nieto, 1948; Flisser y col., 1980; Diwan y col., 1982; Espinoza y col., 1986; Sotelo, 1987, Tsang y col., 1989). Algunas pruebas de detección de anticuerpos ya se utilizan como rutina en el diagnóstico clínico de cisticercosis, de éstos, la técnica de inmunoelectrotransferencia (IET), utilizando como antígeno una fracción purificada de glicoproteínas, ha sido reproducida con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100% y pueden emplearse también para el diagnóstico de cisticercosis en cerdos vivos (Tsang y col., 1989; 1991). En general, se considera que la presencia de anticuerpos en el LCR confirma el diagnóstico de pacientes con síntomas o imágenes de TCo o de RM compatibles con NC. Sin embargo, estos métodos no nos indican si existe una infección activa, por lo que se ha propuesto la búsqueda de antígenos como un indicador de infección activa, ya que los anticuerpos persisten en ausencia de parásitos vivos durante varias semanas (Correa, 1998). Para el diagnóstico de la cisticercosis en cerdos, la única manera de identificar a los animales parasitados, es la observación directa del cisticercos en lengua o en cortes de los músculos tríceps y ancóneo. Sin embargo, no todos los cerdos son sacrificados en rastros y frecuentemente se hace de manera clandestina.

### **Datos epidemiológicos**

La cisticercosis humana es una enfermedad importante para la salud pública de varios países en vías de desarrollo. Afecta a países de Asia, Europa Oriental y América Latina (revisado en Flisser y col., 1997). Sin embargo, también se han detectado casos en países desarrollados como Estados Unidos de Norteamérica, aunque su ocurrencia es esporádica y local (Earnest y col., 1987; Schantz y col., 1992).

En México, hay regiones donde las condiciones socioeconómicas, biológicas y culturales propician la transmisión y el mantenimiento de la cisticercosis. La neurocisticercosis ocupa un lugar preponderante entre las enfermedades del SNC. Mediante el análisis de casos de autopsia, se ha reportado una prevalencia de alrededor del 2% (Villagran-Uribe y Olvera-Rabiela, 1989). En estudios recientes empleando la técnica de IET han reportado seroprevalencias de 4.9 a 22.6% en América Latina (Schantz y col., 1994; Sarti y

col., 1994; Tsang y col., 1995). En México a partir de 1979 la cisticercosis es una enfermedad de notificación obligatoria, lo que permite que el número de casos sea más cercano a la realidad, pese a que la subnotificación sigue siendo uno de los problemas principales para la valoración de la enfermedad (Sarti, 1989; Sarti y col., 1997).

### **Control de la cisticercosis**

La comprensión del ciclo de vida del parásito es importante para diseñar estrategias de control. Se han hecho intentos de erradicación de cisticercosis con la finalidad de evitar nuevos casos de teniosis (Schantz y col., 1993). La propuesta para el control de esta parasitosis se basa en aspectos como: mejorar la infraestructura sanitaria, desarrollar un programa de educación para la salud, involucrando en este proceso a los miembros de la comunidad y la identificación de casos de teniosis humana y de cisticercosis porcina, tratando a los teniasicos y eliminando a los cerdos cisticercosos (Sarti y col., 1997).

### ***RESPUESTA INMUNOLÓGICA***

La respuesta inmunológica consta básicamente de dos fases, el reconocimiento del agente patógeno o antígeno y la reacción que se desencadena para erradicarlo (figura 3). Los linfocitos juegan un papel importante en el reconocimiento y activación de la respuesta, hay varios tipos de linfocitos T, cada uno ejerce funciones diferentes, un tipo interacciona con los linfocitos B, y promueve su multiplicación, diferenciación y la síntesis de anticuerpos, por lo que se sugiere influye en la respuesta de tipo humoral. Otro tipo de linfocito T, interacciona con los fagocitos mononucleares, cooperando en la eliminación del agente patógeno, entre otras actividades a este tipo de linfocitos se les relaciona con la respuesta inmune de tipo celular; a ambos tipos se les conoce como linfocitos T colaboradores o TH, (del inglés T-helper). Los linfocitos T citotóxicos o TC (del inglés T-cytotoxic), se encargan de destruir células tumorales o infectadas por virus u otros agentes patógenos intracelulares. Para que los linfocitos T se activen, deben reconocer al antígeno en forma de pequeños polipéptidos unidos a moléculas del MHC (del inglés Major Histocompatibility Complex) y el reconocimiento se lleva a cabo con el TCR (del inglés T-cell receptor), posteriormente, los linfocitos T se activan y secretan interleucinas que funcionan como señales entre las células (Sprent, 1989; Male y col., 1991, revisado en Moreno 1996). Si los linfocitos TH producen IL-2 e interferón

gama (IFN- $\gamma$ ), entre otras citocinas, se denominan TH1, y si producen, IL-4, IL-5 e IL-10 característicamente son TH2 (Mosmann y col., 1986, Mosmann y Coffman 1989). Por otro lado, los linfocitos T expresan en su superficie marcadores CD (del inglés "Cluster of Differentiation"), los TH tienen CD4 y reconocen péptidos antigénicos exógenos asociados a moléculas del MHC clase II, y los TC tienen CD8 y reconocen péptidos antigénicos endógenos asociados a MHC clase I (Reinherz y col., 1979).

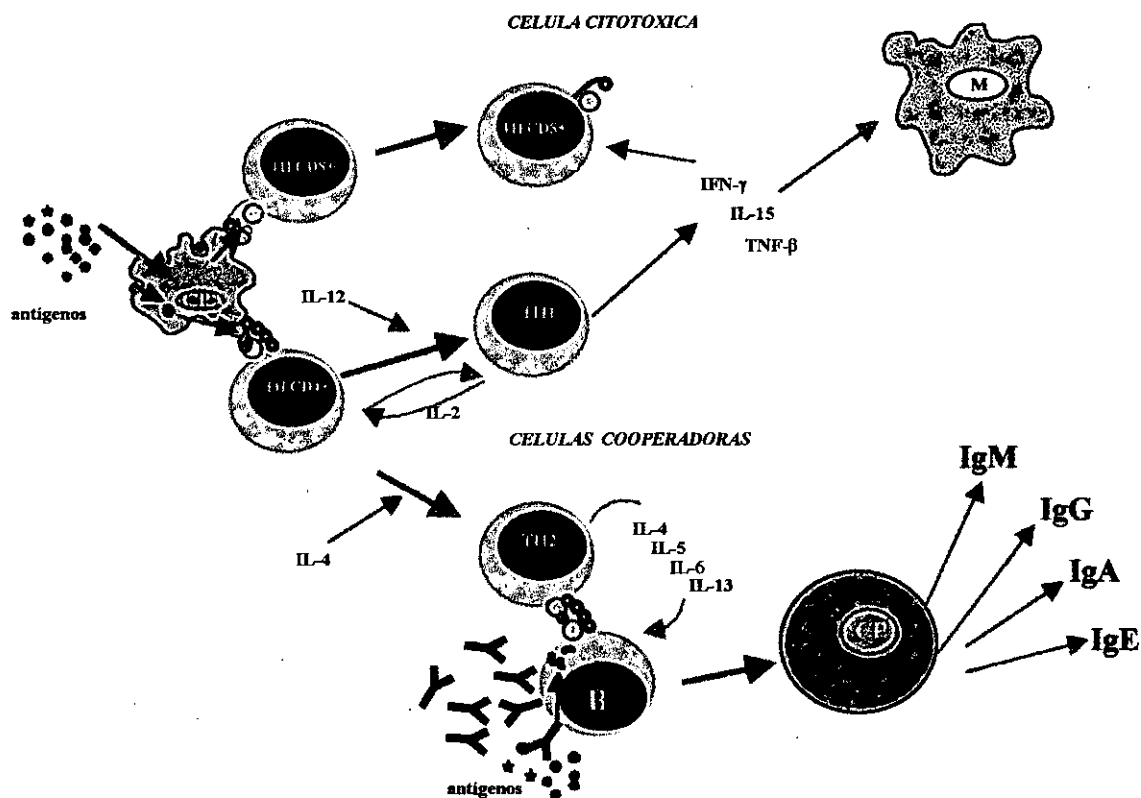


Figura 3. Activación de la respuesta inmunológica, rama celular y rama humoral

## **Respuesta inmune humoral en la cisticercosis**

La presencia del cisticerco en los tejidos del ser humano o del cerdo induce una respuesta inmune (Willms y Merchant 1980; Aluja y Vargas 1988; Molinari y col., 1993). En cuanto a la respuesta de tipo humoral, en el ser humano y en el cerdo se han detectado anticuerpos de clase IgG principalmente, otras clases de anticuerpos como IgM e IgA también se han encontrado en LCR del ser humano, interesantemente los de clase IgE específicos no se detectan aun cuando los niveles generales de IgE total son elevados (Gorodezky y col., 1987). Al analizar la respuesta por inmunolectroforesis (IEF) y posteriormente por inmunolectrotransferencia (IET), el patrón de reconocimiento antigénico varía entre los individuos con cisticercosis (Flisser y col., 1980; Larralde y col., 1989). No obstante, más del 80 % de los sueros de los pacientes con cisticercosis reconocen al AgB o paramiosina.

En cuanto a la respuesta humoral en modelos experimentales como ratones infectados con *T. taeniaeformis*, se analizó la cinética de aparición de anticuerpos y se observó que varía de acuerdo con la cepa del ratón, siendo más rápida en los animales resistentes (Mitchell, 1982). Además, los experimentos de transferencia pasiva mostraron que por lo menos en la rata, el complemento y los anticuerpos tipo IgG2a son los componentes protectores (Williams y col., 1982). Más aún, se demostró transferencia pasiva de protección a través del calostro, mediada principalmente por IgA e IgG2a (Lloyd y Soulsby, 1978; Williams y col., 1982).

Esta evidencia sugiere que los anticuerpos y el complemento son los factores protectores que operan durante los primeros días de infección, antes de que el metacéstodo desarrolle los mecanismos para evadirlos. Los anticuerpos IgG2a son los únicos relacionados a una respuesta de tipo TH1. En los seres humanos, por supuesto, no existe un estudio de cinética de aparición de anticuerpos, pero los mecanismos de evasión que se han sugerido indican que el parásito para sobrevivir, debe evadir tanto los anticuerpos y el complemento, como los componentes celulares de la respuesta inflamatoria.

## **La respuesta inmune celular en la cisticercosis**

En cuanto a la respuesta inmune celular los mecanismos inmunológicos y protectores en la resistencia contra la cisticercosis todavía no son muy claros, incluso la utilización de los modelos experimentales han proporcionado diferentes conclusiones. Por ejemplo, el mecanismo de protección contra *T. taeniaeformis* en ratones parece no depender de la

participación de los linfocitos T, ya que ratones atímicos pueden ser protegidos de la infección por el parásito tan sólo con suero inmune (Mitchell 1977). Por otro lado, se ha demostrado que poblaciones enriquecidas de linfocitos B y T pueden causar reducción significativa de la carga parasitaria en ratones con *T. taeniaeformis*, en menos tiempo del esperado para el mecanismo humoral (Williams y col., 1982, Asno y col., 1993). Además, se observó que larvas de *T. taeniaeformis* pueden sobrevivir por largos periodos en la cavidad peritoneal de ratas tratadas con grandes dosis de suero inmune protector (Williams y col., 1982) y finalmente, en la infección intraperitoneal de ratones con larvas de *T. crassiceps*, la resistencia se ha relacionado más claramente con la inmunidad celular que con los anticuerpos (Bojalil y col., 1993).

En el caso del metacestodo de *T. solium*, su destrucción está mediada por un proceso inflamatorio en el que están involucrados principalmente eosinófilos (Aluja 1989), se observó que la inmunización de cerdos con antígeno induce eosinofilia (Molinari y col., 1983 a,b, 1993). En el modelo de *T. taeniaeformis*, después de que la oncosfera llega al hígado, los eosinófilos también se convierten en elementos predominantes de la respuesta inflamatoria que las rodea y las elimina (Williams y col., 1982). Por otra parte, en otro estudio concluyeron que se debe revalorizar la participación de los eosinófilos en la defensa del huésped contra parásitos helmintos, aunque el estudio no descarta que estas células estén involucradas, si sugiere que no tienen una función predominante en la defensa del huésped (Weller, 1994). No obstante, en la cisticercosis humana, Evans y col., (1998), observaron que los niveles de IL5 y eotaxina están más elevados en el grupo de pacientes que en los testigos, por lo que no descartan la posibilidad de que los eosinófilos jueguen un papel en la respuesta inmune contra el parásito.

Se han llevado a cabo estudios del papel de las interleucinas en la cisticercosis humana, en casos muy específicos como el de pacientes con neurocisticercosis subaracnoidea (Ostrosky-Zeichner y col., 1996), en donde se encontró mayor nivel de IL-1 e IL-6 a diferencia del grupo control. Por otro lado, Restrepo y col., 1998, reportan haber identificado interleucinas que producen tanto los linfocitos TH1 como TH2 *in situ* en cortes histológicos de lesiones, aunque los cuatro casos analizados fueron tratados previamente con corticoesteroides, que alteran la respuesta inmune en especial la celular, por lo que los datos no reflejan lo que realmente pasa naturalmente. En el modelo murino de *T. crassiceps*

estudiaron la presencia de interleucinas *in situ* en los granulomas que se forma alrededor del metacéstodo y se encontró que en los granulomas “tempranos” en donde el parásito está intacto, el tipo de interleucinas presentes se asocian con una respuesta TH1, mientras que en los granulomas tardíos en los que la destrucción del parásito parece ser completa hay una mezcla de TH1 y TH2 (Robinson y col., 1997). Por lo anterior creemos que es importante llevar a cabo un estudio más detallado que permita conocer el estado inmunológico de los individuos con cisticercosis activa e identificar el perfil de interleucinas presente, ya que la información que podamos encontrar podría colaborar en diseñar estrategias de protección contra la enfermedad.



## II. JUSTIFICACION

Debido a que la cisticercosis es una parasitosis tisular, muchos de los fenómenos metabólicos e inmunológicos se llevan a cabo en la interfase huésped-parásito. Aparentemente, los cisticercos han desarrollado mecanismos eficientes para evadir la respuesta inmunológica del huésped y lograr con ello permanecer por meses o años sin provocar daño aparente. Aluja en 1989, propuso una secuencia de eventos que podrían conducir a la destrucción del parásito en la cisticercosis porcina, mediante un proceso inflamatorio en el que predominan los linfocitos, macrófagos y eosinófilos, estos últimos, sugiere son responsables de la destrucción inicial, al dañar estructuras tegumentarias, posteriormente se generan grupos extensos de células linfoides (no tipificadas) y plasmáticas más alejadas del parásito, además de macrófagos, que parecen tener una función más bien de eliminación de detritus celulares; finalmente, las estructuras parasitarias desaparecen y solamente queda una cicatriz. Estos datos sugieren que la destrucción del parásito está regulada por una respuesta celular y, por lo menos parcialmente, de linfocitos TH2 que sintetizan moléculas activadoras de eosinófilos, aunque existe poca evidencia de esto.

Desde que se empleaban técnicas como la inmunoelectroforesis, se identificó que el AgB era una molécula que reconocían más frecuentemente los anticuerpos de individuos con cisticercosis, esta proteína también conocida como paramiosina, es una molécula que puede inhibir la cascada del complemento al unirse al C1q y que al unirse también a colágena podría desviar la respuesta inmunológica en su contra. Estudios recientes han sugerido, que esta actividad inhibitoria se concentra en la porción amino terminal de la molécula, sitio por el cual se une al C1q (Landa, 1992; Vazquez-Talavera, 1996). Por otro lado, los anticuerpos de pacientes con cisticercosis, reconocen preferentemente al extremo carboxilo así como al central de la molécula pero no reconocen al fragmento amino. Ensayos de proliferación celular con linfocitos T y células adherentes de ratones inmunizados con el AgB, han mostrado que la mayor respuesta se presenta hacia uno de los tres tercios recombinantes de la paramiosina que corresponde a la región amino (Vazquez-Talavera, 1996).

Debido a los pocos datos que se conocen sobre la respuesta inmune celular y del balance TH1/TH2 en la cisticercosis por *T. solium*, en el presente estudio nos propusimos analizar la respuesta inmunológica de pacientes con neurocisticercosis activa, que no hubieran tomado

tratamiento inmunosupresor o antiparasitario previo al estudio, mediante la identificación de CD4/CD8, ya que estos datos nos podían ayudar a saber si realmente existe un estado de inmunosupresión en los individuos por la presencia del parásito, además se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular con concanavalina A, que indirectamente nos indica la capacidad de activación y respuesta de los linfocitos a un estímulo. Estos ensayos de proliferación también se llevaron a cabo con un extracto crudo de los cisticercos de *T. solium*, así como una proteína purificada (AgB) y tres proteínas recombinantes que corresponden a los fragmentos amino, central y carboxilo del AgB, para conocer la capacidad de respuesta de los pacientes al antígeno respecto a un grupo control. Por otro lado, se determinó la producción de interleucinas por células de sangre periférica de pacientes con neurocisticercosis, clasificados estos últimos cuidadosamente de acuerdo al tipo y localización de los parásitos en el cerebro, ya que los datos nos podían dar una idea de si existe una correlación entre la presencia de interleucinas proinflamatorias y el tipo de lesión o la ubicación del cisticerco.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el tipo de respuesta inmune celular en pacientes con neurocisticercosis activa hacia componentes del cisticerco de *Taenia solium*.

#### ***OBJETIVOS PARTICULARES.***

Caracterizar fenotípicamente el tipo de linfocito T predominante (CD4+ ó CD8+) y determinar además si existen diferencias en la relación CD4/CD8 en los pacientes con respecto a un grupo de individuos sanos.

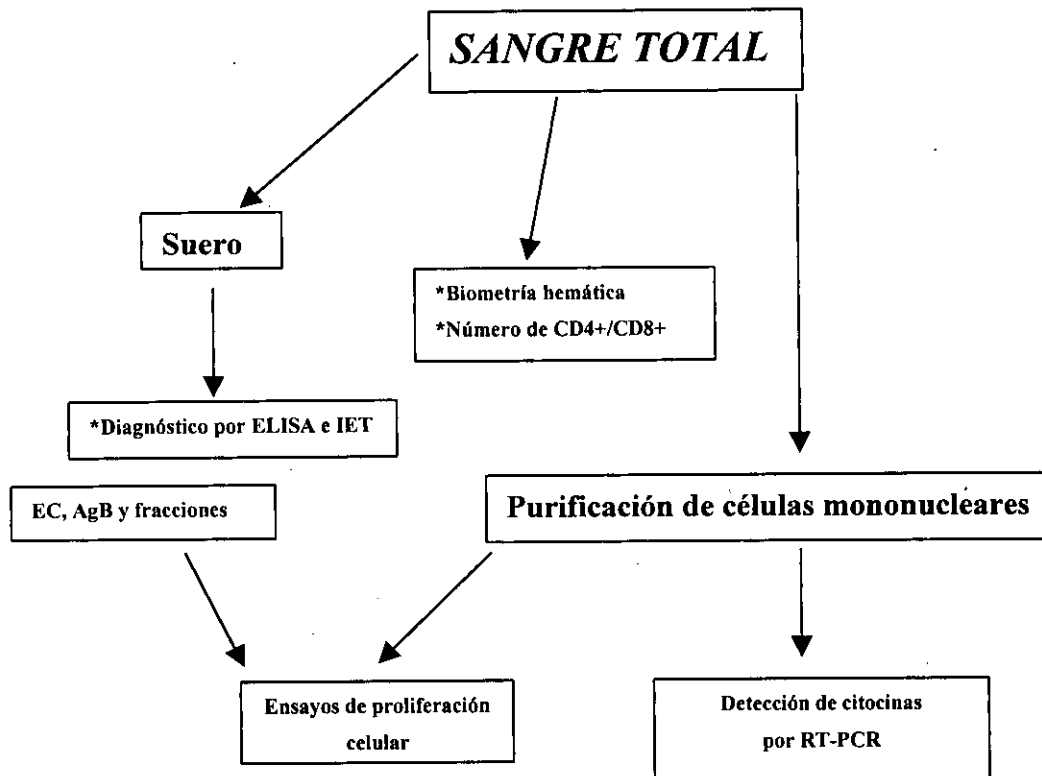
Evaluar la capacidad de respuesta de los linfocitos de pacientes hacia antígenos solubles del cisticerco de *Taenia solium*.

Determinar el tipo de interleucinas que producen los linfocitos de pacientes y definir el perfil TH1/TH2.

#### **IV. HIPOTESIS**

El mayor porcentaje de linfocitos T que se activan en pacientes con neurocisticercosis son predominantemente del tipo CD4+CD3+ cooperador, que reconoce péptidos antigénicos presentados asociados a moléculas del MHC clase II, con aumento de linfocitos de tipo TH2 que producen activadores para eosinófilos de acuerdo a la magnitud de la inflamación que rodea al parásito.

## V. MATERIALES Y METODOS



*Figura 4. Diseño general del estudio. Se tomó una muestra de sangre total a los individuos, se hizo cuantificación de CD4+/CD8+, biometría hemática y determinación de anticuerpos por ELISA e IET. Del resto de la muestra se aislaron células mononucleares para los ensayos de proliferación celular y la identificación de interleucinas por el método de RT-PCR.*

## **GRUPOS DE ESTUDIO**

Se estudiaron en un periodo de tres años 37 individuos con neurocisticercosis procedentes de la Clínica de la Unidad de Investigación en Neurología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS los pacientes tenían las siguientes características: entre 18 y 73 años de edad, cisticercosis activa, no haber tomado tratamiento antiparasitario ni inmunosupresor y que aceptaron participar en el estudio que previamente ya había sido aceptado por el comité ético del mismo instituto. El diagnóstico confirmatorio se realizó por RM o TCo, además del diagnóstico inmunológico por ELISA e IET. En la RM o TCo se observó que los pacientes tenían quistes únicos o múltiples y la localización del parásito en el cerebro era parenquimatosa, subaracnoidea, intraventricular o mixta. Se estudió, además, un grupo de 37 individuos sanos, que tenían características similares en cuanto a sexo y edad.

## **TÉCNICAS DE LABORATORIO**

### **1. Extracto crudo de cisticercos de *Taenia solium***

Se preparó un extracto crudo (EC), similar al descrito por Espinoza y col., (1986), con algunas modificaciones. Los cisticercos recuperados del músculo de cerdos infectados recién sacrificados, fueron lavados con una solución amortiguadora de fosfatos 0.01M pH 7.2 (PBS), se pesaron y se maceraron en presencia de 0.5 ml de PBS/gramo de cisticercos, con inhibidores de proteasas: fenil-sulfonil-metil-fluoruro (PMSF) al 0.006%, parahidroxi-mercuri-benzoato (PHMB) al 0.04%, L-1-tonsilamida 2-fenietil-cloro-metil-cetona (TPCK) 1µg/ml, N-a-p-tonsil-lisina cloro-metil-cetona (TLCK) 1µg/ml, etilendiaminotetraacético (EDTA) 5 mM, leupeptina 4µg/ml. Se continuó la maceración hasta homogenizar la mezcla y se sometió a sonicación a 7 Hz durante 1 minuto sobre un baño de hielo, el proceso fue repetido varias veces hasta la destrucción del tejido. Posteriormente, se centrifugó a 20,000 g durante 1 hora a 4°C, al sobrenadante obtenido se le añadió solución de fosfatos de sodio 0.1M (PB10x), pH 7.2 en proporción 1:10 y se guardó momentáneamente a 4°C. El precipitado se resuspendió en solución de NaCl 0.15 M amortiguada con fosfato 0.01M, pH 7.2 (PBS), se sonicó dos veces durante un minuto y se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente. Los sobrenadantes se mezclaron y se les determinó la

concentración de proteínas por el microensayo de Bradford (1976), utilizando un reactivo comercial (Bio-Rad).

Se verificó la calidad del extracto crudo por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% en condiciones reductoras y no reductoras (Laemmli, 1970). El EC se fraccionó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

## 2. Antígeno B recombinante

El antígeno B fue gentilmente donado por el Dr. Juan Pedro Lacclette del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se contó con una colección de cepas de *E. coli* JM109 transformadas con construcciones plasmídicas de expresión bacteriana, que poseen la secuencia nucleotídica que codifica para el AgB y para 3 fracciones que corresponden a la parte amino (F1), la parte central (F2) y la parte carboxilo (F3) (figura 5).

Se verificó la pureza del AgB y las fracciones F1, F2, y F3, por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%, se fraccionaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

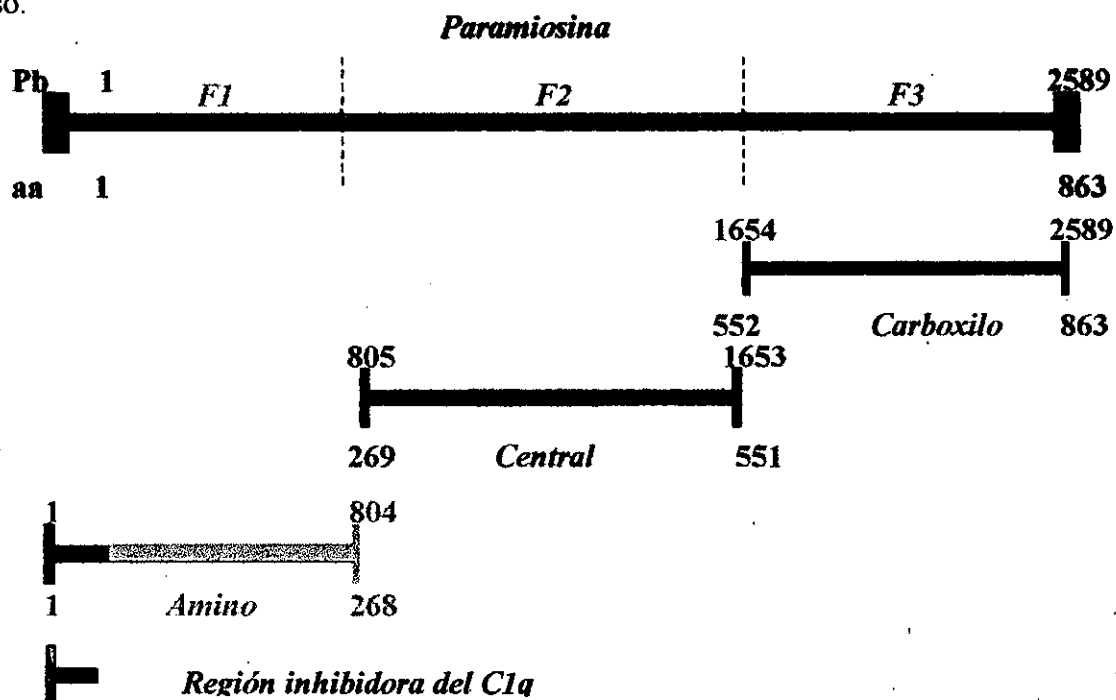


Figura 5. Fragmentos de paramiosina (AgB) expresados en un sistema bacteriano. Los fragmentos F1, F2 y F3 equivalen cada uno, a un tercio de la longitud total de la paramiosina. Se encuentra indicado el tamaño en pares de bases y el número de aminoácidos que limitan cada fragmento (aa).

### **3. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica**

A los individuos se les tomaron 35 ml de sangre venosa con heparina, la muestra se diluyó con un volumen igual de una solución balanceada de Hanks (SBH); 8 ml de la sangre diluida se estratificó cuidadosamente sobre 5 ml de Hystopaque-1077 (Sigma) y se centrifugaron a 400 g durante 35 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se colectaron las células blancas situadas en la parte superior del gradiente con ayuda de una pipeta, la suspensión celular se lavó 3 veces y el paquete final se resuspendió en medio RPMI-1640 (Gibco) adicionado con suero fetal de bovino al 15%, 200 mM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercaptoetanol, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomicina y 0.1 mM de aminoácidos no esenciales (RPMIc), se cuantificaron las células en un hemocitómetro y se verificó su viabilidad por exclusión de azul tripano.

### **4. Búsqueda de anticuerpos específicos**

#### **ELISA**

La presencia de anticuerpos en el suero de los individuos se determinó por ELISA según el método de Espinoza y col., 1986; para ello se sensibilizaron placas (Costar), durante toda la noche a 4° C con 100 µl de antígeno EC (1 µg/ml) previamente diluido en solución de carbonatos 0.01M, pH 9.6. Los pozos se lavaron tres veces con 200 µl de Tween 20 al 0.05% en PBS (PBS-T) y se incubaron durante 1 h con 200 µl/pozo de solución bloqueadora (leche descremada al 5% en PBS-T), al término del tiempo del boqueo se hicieron tres lavados con PBS-T, se colocan 100 µl del suero diluido en PBS-T (1:1000) y se incubaron las placas durante 2 h a 37° C. Posteriormente se lavaron los pozos 3 veces con PBS-T y se agregó anti-IgG de humano acoplado a fosfatasa previamente titulado, se incubó a 37° C durante 1 h. Se hicieron nuevamente 3 lavados con PBS-T y se agregó 1 mg/ml de p-nitro-fenil-fosfato diluido en una solución de dietanolamina al 10% pH 9.8 finalmente la lectura se realizó en un lector de ELISA (Bio Rad) a 502 nm.

#### **IET**

Se realizó también la búsqueda de anticuerpos específicos mediante la técnica descrita por Tsang y col., 1989; en la que se empleó una fracción de glicoproteínas (GPs) como fuente de antígeno. Las GPs se purifican a partir del EC por medio de una columna de lentil-lectin sepharosa 4B. Las GPs se titularon y se sometieron a electroforesis en geles



de gradiente (5-22% de poliacrilamida) utilizando 60 ng de antígeno por mm de gel, posteriormente se llevó a cabo la electrotransferencia en membranas de nitrocelulosa. La membrana se cortó en tiras de aproximadamente 3mm y se puso en contacto con los sueros de los pacientes diluidos 1:50, posteriormente se agregó un conjugado de anti-IgG de humano acoplado a peroxidasa y la reacción se evidenció utilizando  $H_2O_2/3,3'$ -diaminobencidina. Al finalizar la reacción se pudieron observar 7 bandas de diferentes pesos moleculares (13, 14, 18, 21, 24, 39-42 y 50 kDa), que reconocen específicamente los sueros de los pacientes con cisticercosis, el diagnóstico se considera positivo si existe al menos una de las 7 bandas.

### **5. Biometría hemática y conteo de células CD3+/CD4+ y CD8+**

La biometría hemática se realizó con la fracción de sangre total, con la ayuda de un equipo comercial Quantitative Buffy Coat, Becton Dickinson (QBC) de la siguiente manera: se colocó la muestra en tubos capilares cubiertos con anaranjado de acridina, y se centrifugaron el tiempo y la velocidad programada en el equipo, posteriormente se realizó la lectura en el mismo aparato.

La muestra de sangre con EDTA, se empleó para la cuantificación de linfocitos CD3+/CD4+; CD3+/CD8+, para ello se le agregó una solución fijadora y se pusieron en contacto con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8 marcados con fluoresceína, finalmente la lectura se llevó a cabo en un Fax Count (Becton Dickinson). El aparato proporcionó los valores del número total de células y del porcentaje de cada tipo celular presente en la muestra.

### **6. Ensayos de proliferación celular**

Se colocaron  $3 \times 10^5$  CMSP por pozo en placas de cultivo de 96 pozos. Todos los ensayos se hicieron por quintuplicado. Las CMSP se incubaron con tres concentraciones diferentes del EC: 10, 20 y 30  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  de Con A, 3.5  $\mu\text{g/ml}$  de AgB o 1.75  $\mu\text{g/ml}$  de F1, F2, ó F3 (basados en estudios previos de nuestro grupo). Como testigo negativo del ensayo se colocaron CMSP con medio solamente. Las células con antígeno se incubaron durante 96 h y las que tenían Con A durante 72 h; al término del tiempo se colocó timidina tritiada ( $H^3$ ) (1  $\mu\text{Ci/pozo}$ ) y se incubó durante 18 h más. Posteriormente, se cosecharon las células en un aparato automático, sobre filtros de fibra de vidrio (Wathman);

posteriormente los filtros se secaron a temperatura ambiente, cada pedazo de papel filtro correspondiente a las muestras se colocaron en viales de vidrio y se le agregaron 5 ml de líquido de centelleo. La radioactividad se midió en un contador de centelleo (Beckman). Los valores que se obtuvieron en el aparato fueron en cuentas por minuto (cpm), posteriormente se hizo una conversión de cpm a índices de proliferación (IP), utilizando la siguiente formula:

IP: promedio de cpm del problema/ promedio de cpm del testigo interno.

## **7. Análisis del tipo de citocinas producidas**

Se realizó el método de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para conocer las citocinas que sintetizan las CMSP. La técnica permitió identificar el mRNA de interés, con la ayuda de iniciadores específicos para cada fragmento de interés (INF- $\gamma$ , IL2, IL4, IL10), además se amplificó G3PDH o  $\beta$ -actina como control positivo de la técnica. Para desarrollar el procedimiento se extrajo RNA total de las CMSP, se sintetizó el DNA complementario (cDNA), se amplificó el fragmento de interés por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y finalmente se identificaron los productos de PCR en geles de acrilamida.

### **7.1 Extracción del RNA total.**

Las muestras se mantuvieron en hielo durante el procedimiento y se les adicionó 1 ml de Trizol (Gibco) por cada  $5 \times 10^6$  CMSP en tubos tipo Eppendorf, se homogenizó y se agregó 200  $\mu$ l de cloroformo. Posteriormente, se centrifugó a 2800 g durante 15 min. a 4° C, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo al que se le agregó 500  $\mu$ l de isopropanol y se incubó a -20° C durante 10 min; se centrifugó a 2800 g durante 15 min. a 4° C y se eliminó el sobrenadante; se le agregó 1 ml de etanol al 75% con agua/dietilpirocarbonato (agua/DEPC) al precipitado; nuevamente se centrifugó a 2000 g durante 10 min. 4° C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente; finalmente se resuspendió en 10  $\mu$ l de agua/DEPC, se cuantificó la cantidad de RNA de cada muestra en un Gene Quant (Amersham) y se conservó a -20°C hasta su uso.

## 7.2 Síntesis de cDNA.

Se colocaron 5 µg de RNA total en un tubo y se incubó a 72°C durante 5 min. Se agregaron 0.5 µg del oligo d(T)<sub>16</sub> y se completó un volumen de 10 µl con agua (Todos los reactivos para RT-PCR fueron de la marca Perkin Elmer). Se incubó a 72°C durante 10 min; se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se agregó la mezcla de: 1U/µl de inhibidores de RNAsas, 5x del amortiguador de la enzima RT M-MLV, 0.5 mM de dNTP's y 2.5 U/µl de RT (M-MLV) en un volumen de reacción de 20 µl de agua. Se homogenizó e incubó a 37°C durante 1 h y posteriormente se almacenó a -20° C hasta su uso.

## 7.3 Amplificación del fragmento de interés por PCR

Los iniciadores son secuencias específicas para cada gene (cuadro 1, Yamamura y col., 1991), la concentración utilizada por reacción fue de 30 picomolas por iniciador.

Cuadro 1. Características de los iniciadores.

<i>GENE</i>	<i>SECUENCIA DE LOS INICIADORES</i>	<i>TAMAÑO DEL PRODUCTO (pb)</i>
<i>β-actina</i>	5'GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3'CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC	540
<i>G3PDH</i>	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3' TCCACCACCCTGTTGCTGTCA	452
<i>IL-2</i>	5' CATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTC 3' CGTTGATAATTGCTGATTAAGTCCCTG	305
<i>IFN-γ</i>	5' GCATAGTTTIGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGC 3' CTCCTTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCTGCTGG	427
<i>IL-4</i>	5' ATGGGTCTCACCTCCCAACTGCT 3' 3' CGAACACTTTGAATATTTCTCTCTCAT 3'	456
<i>IL-10</i>	5' ATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGACCCA 3' 3' TCTCAAGGGGCTGGGTCAGCTATCCCA 3'	426

Se colocó el cDNA para cada muestra y se preparó la mezcla de reacción de PCR con el resto de los reactivos como se muestra en el cuadro 2. Se consideró un volumen final

de reacción de 25 µl; se homogenizó y se le agregó una gota de aceite mineral. Se centrifugó 30 seg. 750 g y se colocó en el termociclador. Los ciclos y las temperaturas que se requirieron para la amplificación de cada gene se muestran en el cuadro 3. Los productos del PCR finalmente se almacenaron a 4°C hasta su análisis en geles de acrilamida.

Cuadro 2. Mezcla de reacción para la PCR

---

*Componentes para una muestra*

---

cDNA (5µg)

Amortiguador para Taq Poli. 10 x

MgCl 25 mM

dNTP 2.5 mM

iniciador 1 \*

iniciador 2 \*

Taq. polimerasa 5 U/µL

H<sub>2</sub>O (la cantidad necesaria para obtener un volumen final de 25 µl)

---

\* La concentración final fue de 30 pMolas

Cuadro 3. Ciclos y temperaturas para la PCR

<i>Proceso:</i>	<i>Condiciones</i>					
<b><i>Desnaturalización inicial</i></b>	94°C		300 s			
<i>No. ciclos</i>	β-actina	G3PDH	IL-2	IL-4	IL-10	INF-γ
	40	40	40	40	40	40
<b><i>Desnaturalización</i></b>	94°C 30 s	94°C 60 s	94°C 60 s	94°C 40 s	94°C 60 s	94°C 60 s
<b><i>Alineamiento</i></b>	52°C 45 s	55°C 60 s	68°C 60 s	58°C 40 s	55°C 60 s	60°C 60 s
<b><i>Extensión</i></b>	72°C 45 s	72°C 60 s	72°C 60 s	72°C 60 s	72°C 60 s	72°C 60 s
<b><i>Extensión final</i></b>	72°C 300					
<b><i>Incubación final</i></b>	4°C hasta su uso					

#### **7.4 Identificación de productos de PCR en geles de acrilamida**

Se prepararon geles de acrilamida al 7.5%, con 1M de Tris, 375 mM de ácido bórico, 50 mM de EDTA (TBE). La electroforesis se llevó a cabo a 150 V durante 1 h. El marcador de peso molecular que se empleó fue  $\phi$ X 174 que tiene un rango de 75 a 1350 pb, posteriormente el gel se tiñó con Bromuro de etidio al 0.001%. Finalmente, se llevo a cabo el análisis del gel en un transiluminador de luz ultravioleta donde se observaron los productos amplificados.

#### ***METODOS ESTADISTICOS***

Los resultados del presente estudio, se analizaron con un programa de computo estadístico EPI-INFO (CDC, USA/WHO), la distribución de los datos se comparó por las pruebas de T de Student (cuando los datos obtenidos tenían una distribución normal) o U de Mann Whitney (cuando los datos no tenían distribución normal), mientras que las asociaciones entre variables o diferencias en proporciones fueron analizadas por la prueba Exacta de Fisher (Fleiss 1983)

## VI. RESULTADOS

### Análisis electroforético de los antígenos del cisticerco de *Taenia solium*

En la figura 6, se muestra la separación electroforética del extracto crudo. Observamos que el antígeno está constituido por más de 40 proteínas con peso molecular desde 4 hasta más de 200 KDa. Se observaron proteínas con diferentes pesos moleculares en condiciones reductoras comparadas con las que se observaron en condiciones no reductoras.

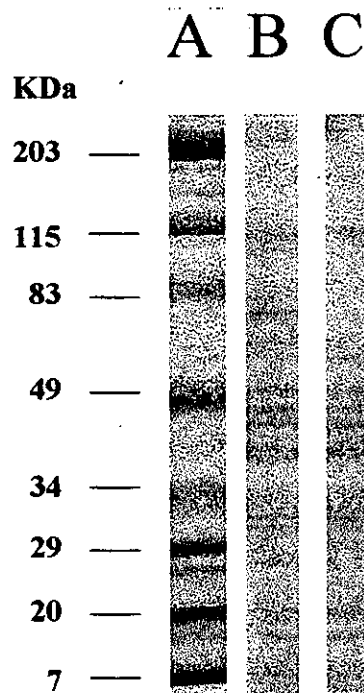
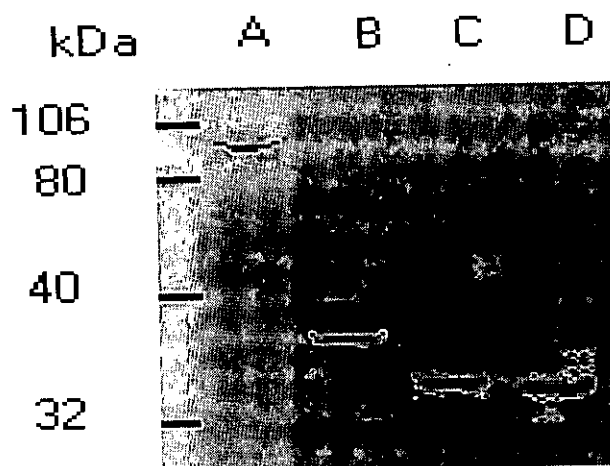


Figura 6. Análisis electroforético del extracto crudo de cisticercos de *Taenia solium* teñido con azul de Coomassie. Los carriles contienen muestras purificadas de extracto crudo sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida. A) Marcador de peso molecular; B) condiciones reductoras; C) condiciones no reductoras.

La figura 7 muestra el peso molecular de la paramiosina y los fragmentos amino, central y carboxilo de esta proteína, así como la calidad de la producción de cada una de las proteínas y como se pudo observar no existe contaminación con alguna otra proteína.



*Figura 7. Purificación de los péptidos recombinantes del AgB. Los carriles contienen muestras puras de los péptidos recombinantes sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. A: Proteína completa; B: Región carboxilo; C: Región central; D: Región amino.*

### **Características generales de los grupos de estudio**

Se elaboró una base de datos que incluyó 33 variables con características generales, clínicas y resultados experimentales de pacientes e individuos sanos. La base se seleccionó de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión del trabajo y contiene datos de 37 individuos de cada grupo. Al analizar los datos, se encontró que la edad entre los grupos fue similar ( $41 \pm 14$  para pacientes y  $38 \pm 14$  para sanos), la mayoría eran del sexo masculino (70 y 65% respectivamente).

Como podemos observar, los valores de la biometría hemática en ambos grupos fue similar (cuadro 4), aparentemente no tenían una alteración además del problema de la cisticercosis misma que se pudiera identificar diferente con respecto a los individuos sanos.

Cuadro 4. Biometría hemática de pacientes con NCC y sanos.

<i>Parámetro</i>	<i>Grupo</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación estándar</i>	<i>p*</i>
Hemoglobina (g/dl)	pacientes	15.21	2.00	0.537
	sanos	15.49	1.49	
Hematocrito (%)	pacientes	43.66	7.05	0.093
	sanos	46.73	7.01	
Plaquetas (x10 <sup>6</sup> /ml)	pacientes	208.95	86.95	0.267
	sanos	234.18	90.18	
Globulos blancos (x10 <sup>6</sup> /ml)	pacientes	6.63	4.72	0.859
	sanos	6.45	3.35	
Granulocitos (x10 <sup>6</sup> /ml)	pacientes	4.22	2.96	0.224
	sanos	3.47	1.73	
Linfocitos (x10 <sup>6</sup> /ml)	pacientes	35.33	12.90	0.685
	sanos	37.37	24.41	

\* t-student

Los pacientes tenían cisticercosis activa, el 86% de ellos con cisticercosis múltiple. Respecto a la localización del parásito el mayor porcentaje de los pacientes tenían cisticercos en el espacio subaracnoideo o en múltiples sitios (cuadro 5).

En 34 pacientes se confirmó la presencia de anticuerpos por ELISA/inmunoelctrotransferencia (IET), en los 3 restantes se corroboró posteriormente su diagnóstico por la respuesta al tratamiento antiparasitario o por cirugía; a ningún individuo del grupo testigo se le detectaron anticuerpos específicos utilizando las dos técnicas.

Cuadro 5. Tipo de lesiones y su localización (N= 37)

<i>Tipo de lesión</i>	<i>%</i>
Única	14
Múltiple	86
<i>Localización</i>	
Subaracnoidea	40
Parenquimatosa	11
Intraventricular	19
Mixta	30



### Estado inmunológico de los grupos

Los resultados del estado inmunológico de pacientes y sanos se presentan en el cuadro 6. Aunque se observó un mayor índice de proliferación a Con A en el grupo de pacientes, la diferencia no fue significativa ( $p=0.238$ ). Los valores absolutos y relativos de los subtipos de linfocitos T CD4+ y CD8+ tampoco fueron diferentes entre los grupos (tabla 7).

Cuadro 6. Respuesta proliferativa a Con A

	<i>Grupo</i>	<i>Mediana</i>	<i>p*</i>
<i>Índice de proliferación a ConA</i>	Pacientes	139.5	0.238
	sanos	66.1	

\* *U de Mann Whitney*

Cuadro 7. Número de células CD4+ y CD8+ en sangre total.

<i>Marcador</i>	<i>Grupo</i>	<i>Media</i>	<i>Desv. Est.</i>	<i>p*</i>
<b>CD4+</b> (No./ml)	Pacientes	742.00	289.72	0.196
	sanos	841.88	325.89	
<b>CD8+</b> (No./ml)	Pacientes	485.69	225.27	0.347
	sanos	539.58	233.34	
<b>CD4+/CD8+</b>	Pacientes	1.74	0.68	0.964
	sanos	1.75	0.84	
<b>CD4+/CD3+</b>	Pacientes	0.59	0.11	0.839
	sanos	0.59	0.11	
<b>CD8+/CD3+</b>	Pacientes	0.38	0.10	0.914
	sanos	0.38	0.10	

\* *t-student*

### Ensayos de proliferación celular con antígenos de *Taenia solium*

La respuesta proliferativa hacia el EC se muestra en la figura 8. Como podemos observar, los pacientes tuvieron en general una respuesta mayor comparada con los sanos,

tanto en el porcentaje de positivos ( $IP \geq 2$ ) como en el nivel de respuesta misma, la diferencia solamente fue significativa estadísticamente a la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  ( $*p=0.057$ ). Aunque se observó menor respuesta en los individuos sanos, algunos de ellos respondieron con  $IP \geq 2$ .

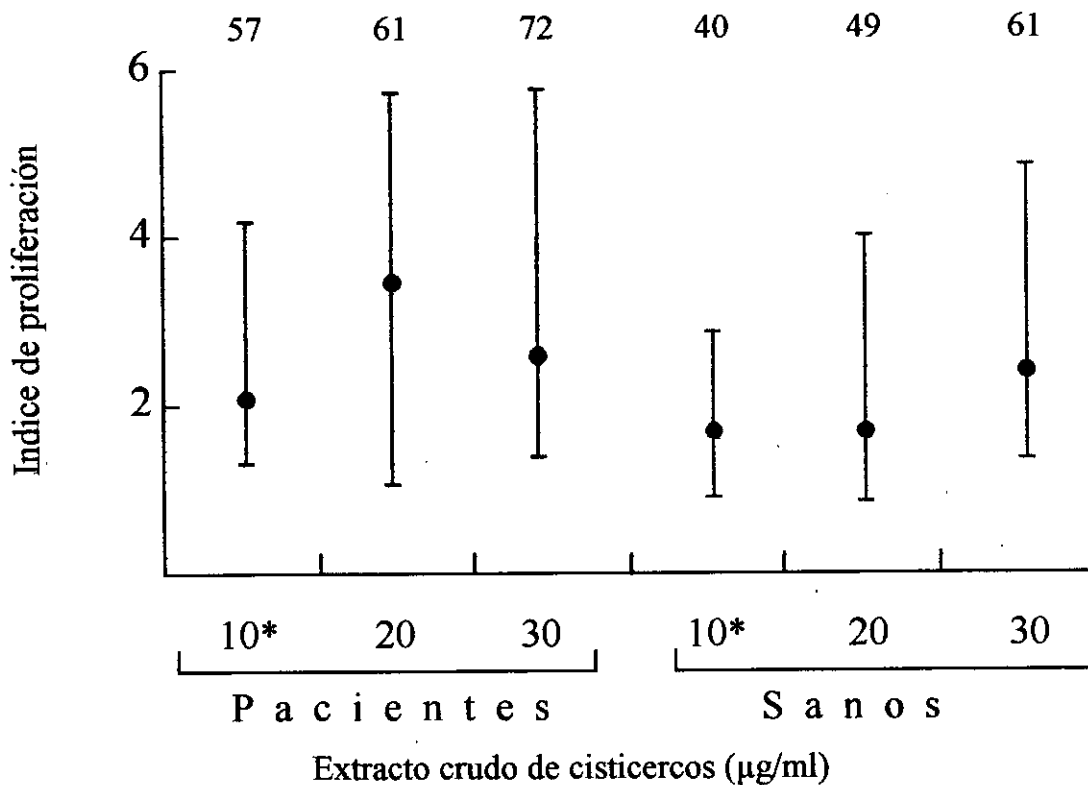


Figura 8. Proliferación celular hacia el extracto crudo del cisticerco de *Taenia solium*. Los datos representan la mediana de 37 individuos de cada grupo +/- el percentil a 75/25. El número de arriba representa el porciento de individuos con  $IP \geq 2$ . El número de abajo se refiere a la concentración de antígeno empleado.  $*p=0.057$  por la prueba de U de Mann Whitney

Se probaron 24 muestras de pacientes y 24 de individuos sanos con AgB y sus fracciones, la respuesta proliferativa fue similar en los grupos (38%) como se muestra en la figura 9. La mayor respuesta contra las fracciones del AgB se observó hacia la región

amino en 38% de los controles y 25% en los pacientes, aunque también el 25% de los pacientes respondieron a la fracción carboxilo. En el grupo de individuos sanos el 33% respondieron a la región central; en este grupo, la respuesta a la fracción carboxilo fue hacia la que menos respondieron (12%). En el cuadro 8 se resume el patrón de respuesta proliferativa contra el AgB y las diferentes regiones del antígeno. Nueve individuos de cada grupo respondieron a la proteína completa, pero el patrón de respuesta hacia cada fragmento fue distinto entre los grupos; los pacientes respondieron indistintamente hacia las tres fracciones aunque la mayor respuesta se observó hacia la región carboxilo de la molécula. En el grupo de individuos sanos hubo más respondedores al fragmento amino y menor porcentaje de respondedores al fragmento carboxilo.

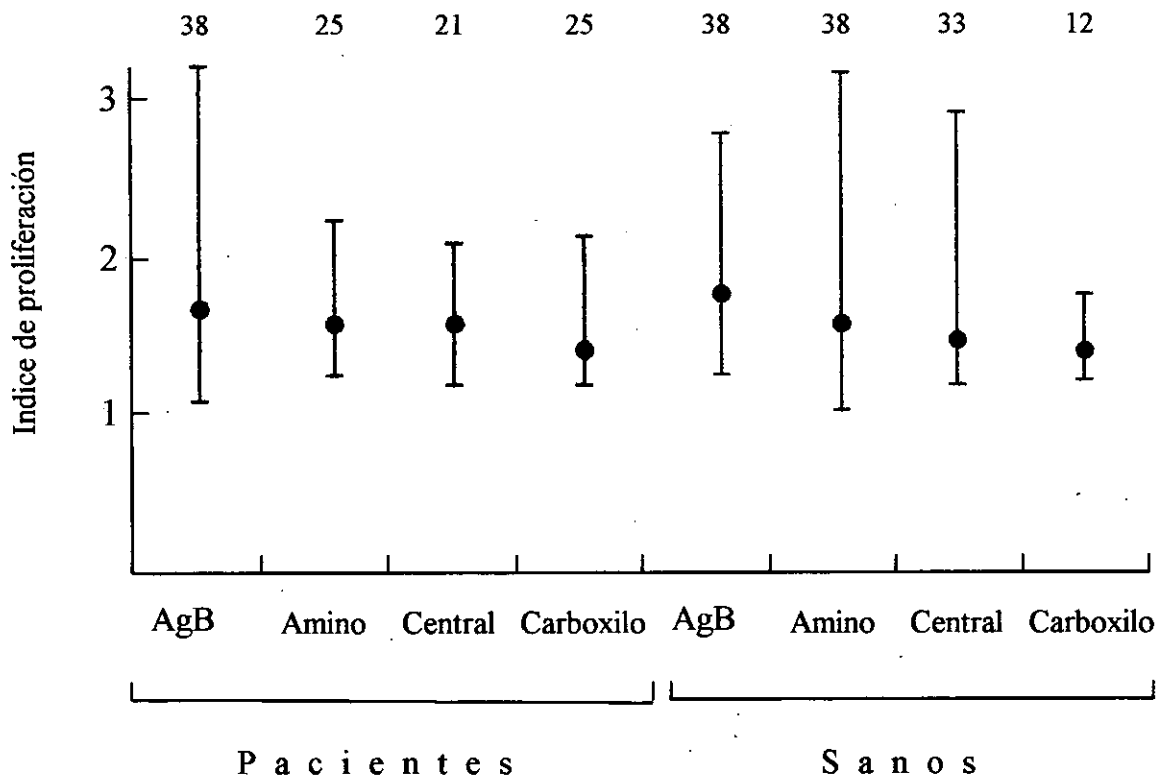


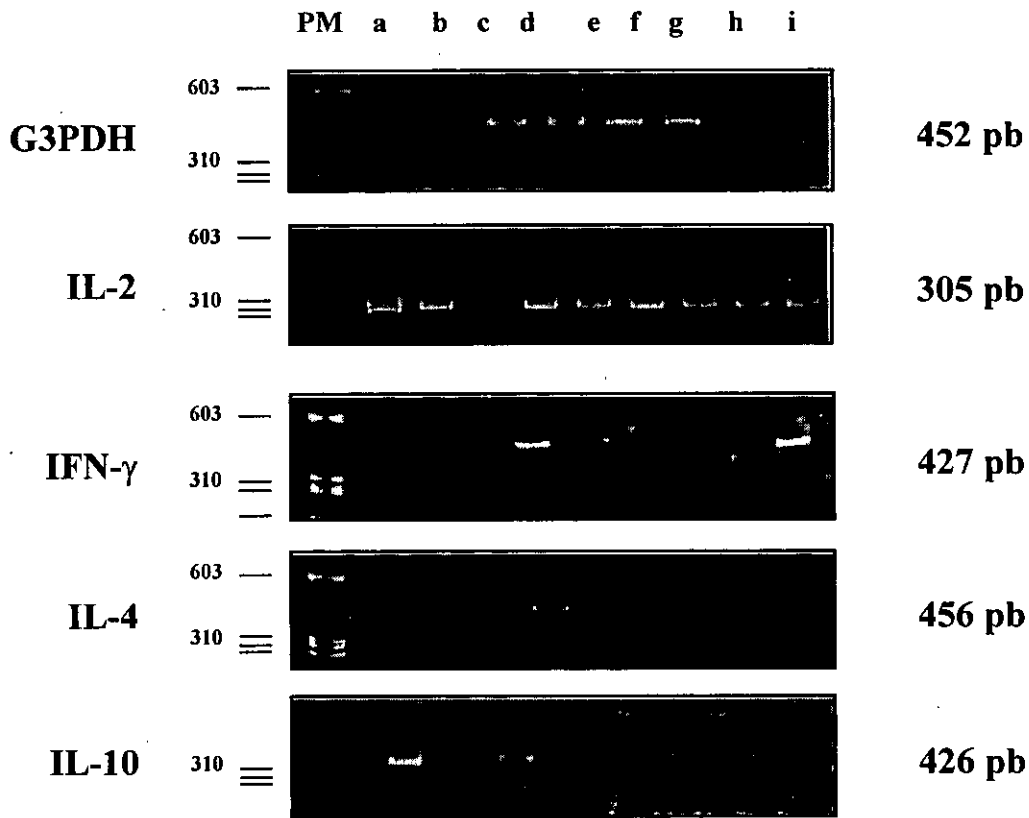
Figura 9. Proliferación celular hacia la paramiosina de cisticercos de *T. solium* a una concentración de 3.5  $\mu\text{g/ml}$  y tres fracciones de ésta: la amino; la parte central y la carboxilo, todas a una concentración de 1.75  $\mu\text{g/ml}$ . Los datos representan la mediana de 24 individuos de cada grupo +/- el percentil a 75/25. El número de arriba de cada columna representa el porcentaje de individuos con  $IP \geq 2$ .

Cuadro 8. Patrón de respuesta de los individuos hacia la paramiosina y sus fracciones.

		Inducción de proliferación hacia:				
	No.	AgB	Amino	Central	Carboxilo	No. individuos
Pacientes	15	Negativo	-	-	-	14
			+	-	-	1
	9	Positivo	+	+	-	1
			+	-	+	1
			-	-	+	1
			-	+	+	1
			+	+	+	3
% positivos	22	55	55	66		
Sanos	15	Negativo	-	-	-	14
			+	+	+	1
	9	Positivo	+	+	-	6
			+	+	+	1
			+	-	+	1
			-	-	-	1
	% positivos	22	88	77	22	

### Determinación de citocinas

La figura 10 muestra ejemplos de los productos obtenidos de la reacción RT-PCR, para cada mRNA. En la figura 11, se observa que el 62% de pacientes y controles expresa IL-2. La IL-4 y la IL-10, se expresaron en menor proporción. Se observó un nivel mayor de expresión de IFN- $\gamma$  (12%) en pacientes, comparado con el grupo control (3%), aunque la diferencia no fue significativa estadísticamente ( $p=0.23$ ), y en el grupo de controles hubo mayor expresión de IL-10 e IL-4, pero sin significado estadístico ( $p=0.37$ ).



*Figura 10. Productos de RT-PCR de las muestras de los pacientes que fueron positivas a las diferentes citocinas (G3PDH se empleó como testigo positivo de la técnica) cada carril corresponde a diferente paciente (a-i) y el orden no siempre es el mismo.*

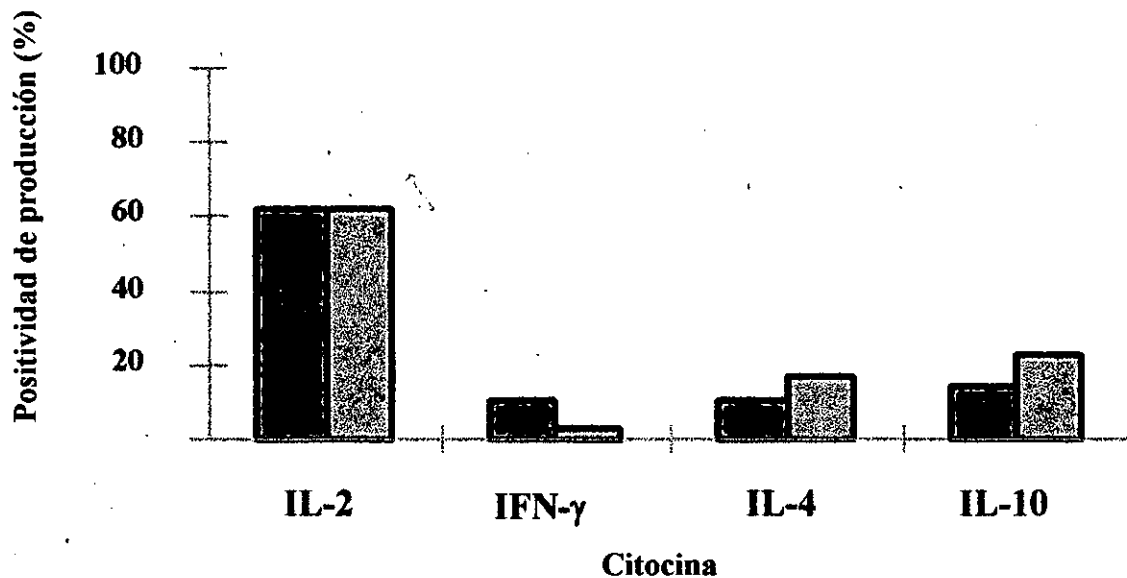


Figura 11. Producción de mRNA para citocinas por las CMSP de pacientes (barras rojas) e individuos sanos (barras azules).

Se buscaron posibles asociaciones entre la producción de citocinas, y el número de lesiones en el cerebro (únicas o múltiples) del grupo de pacientes y se observó que todos los individuos que tenían lesión única produjeron IL-2 y solamente el 58% de los pacientes con lesiones múltiples produjeron esa citocina. Se detectó IL-10 únicamente en los casos con cisticercosis múltiple (figura 12). Respecto a la localización de las lesiones se observó que los pacientes con cisticercosis subaracnoidea solamente produjeron IFN- $\gamma$ ; y los que tenían cisticercosis parenquimatosá produjeron IL-2 e IL-10. Un porcentaje bajo de los pacientes con lesiones intraventriculares o de localización mixta produjo IL-4 además de IL-2 (figura 13).

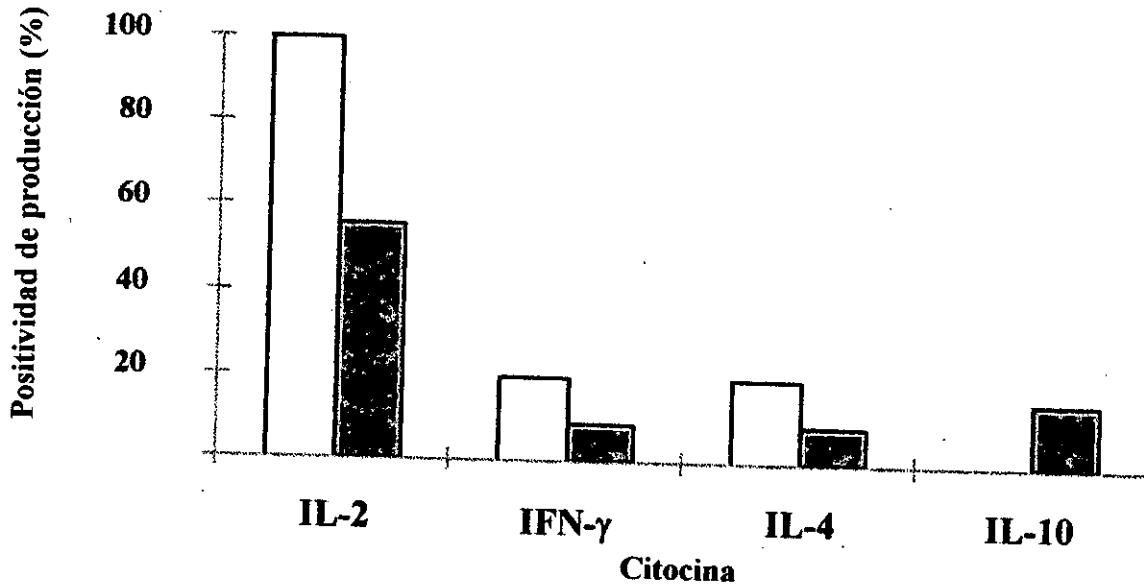


Figura 12. Producción de mRNA para interleucinas por las CMSP de pacientes con lesión única (barras amarillas) y múltiples (barras verdes).

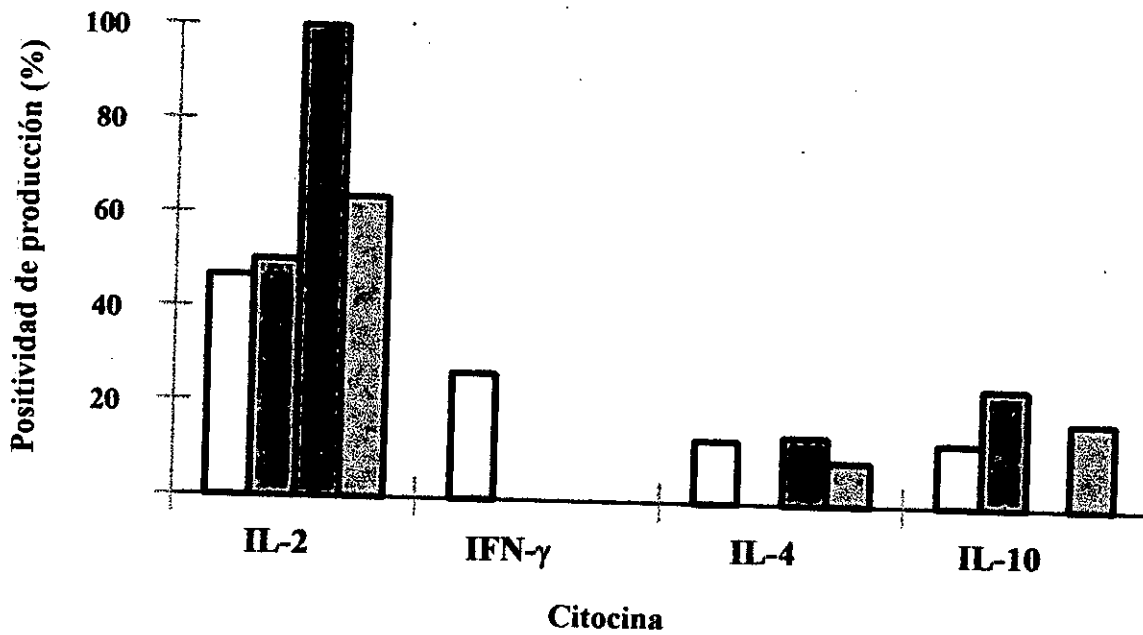


Figura 13. Producción de mRNA para interleucinas por las CMSP de pacientes de acuerdo a la localización del parásito en el cerebro: espacio subaracnoideo (barra amarilla); parenquimatoso (barra verde), espacio ventricular (barra roja) y localización mixta (barra azul).

### Asociaciones encontradas entre los grupos de estudio

Se realizó un análisis de la base de datos, con el propósito de detectar alguna asociación. El cuadro 9 muestra los resultados de esta búsqueda con respecto a la producción de IL-2 y los individuos que respondieron a los ensayos de proliferación hacia los antígenos probados. Como se observa, en ningún caso se demostró estadísticamente alguna asociación aunque en algunos casos el riesgo o Razón de Momios sea significativo. En el caso del IFN- $\gamma$  (cuadro 10), se encontró una asociación con respecto a la respuesta proliferativa hacia la fracción amino del AgB en el grupo de pacientes ( $p=0.05$ , Exacta de Fisher); no fue así en el grupo de sanos, también encontramos un riesgo hacia la región central de la molécula en el grupo de pacientes (RM= 4.5). En el cuadro 11, tampoco se encontraron asociaciones con la producción de IL-4 entre los grupos. Por otra parte, aunque no es significativo, existe una fuerte asociación entre la producción de IL-10 y la proliferación hacia el carboxilo terminal de la paramiosina en el grupo testigo (RM=7.0,  $p=0.29$  Exacta de Fisher, cuadro 12).

Cuadro 9. Asociación entre la producción de IL-2 y la respuesta proliferativa a diferentes estímulos.

<i>Respuesta a:</i>	PACIENTES					SANOS			
	%	<i>p</i> *	$\chi^2$	RM**	%	<i>p</i> *	$\chi^2$	RM**	
ConA	+ 72.2	0.37	0.38	-	61.1	-	-	-	
	- 0.0				0.0				
EC10 <sup>o</sup>	+ 57.1	-	0.47	0.61	64.3	-	0.89	1.11	
	- 68.8				61.9				
EC20 <sup>o</sup>	+ 63.6	-	0.97	0.97	76.5	-	0.05	<b>4.06</b>	
	- 64.3				44.4				
EC30 <sup>o</sup>	+ 65.4	0.53	0.76	1.26	72.7	-	0.07	<b>3.56</b>	
	- 60.0				42.9				
AgB	+ 55.6	0.32	0.37	0.45	77.8	0.37	0.43	<b>2.10</b>	
	- 73.3				62.5				
Amino	+ 66.7	0.63	0.88	1.17	66.7	0.63	0.92	1.09	
	-				64.7				
Central	+ 80.0	0.45	0.48	<b>2.33</b>	57.1	0.39	0.47	0.51	
	- 63.1				72.2				
Carboxilo	+ 66.7	0.66	0.94	1.08	100.1	0.41	0.28	-	
	-								

\* Exacta de Fisher; \*\*Razón de Momios, <sup>o</sup> Extracto crudo a 10, 20 y 30  $\mu\text{g/ml}$ .



Cuadro 10. Búsqueda de asociación entre la producción de IFN- $\gamma$  y la respuesta proliferativa a diferentes estímulos.

		PACIENTES				SANOS			
<i>Respuesta a:</i>		%	<i>p</i> *	$\chi^2$	<i>RM</i> **	%	<i>p</i> *	$\chi^2$	<i>RM</i> **
ConA	+	11.1	0.89	0.72	-	2.8	-	-	-
	-	0.0				0.0			
EC10 <sup>o</sup>	+	4.8	0.21	0.17	0.22	0.0	0.60	0.41	0.00
	-	18.8				4.8			
EC20 <sup>o</sup>	+	4.5	0.15	0.12	0.17	0.0	0.51	0.32	0.00
	-	21.4				5.6			
EC30 <sup>o</sup>	+	7.7	0.30	0.29	0.33	0.0	0.39	0.20	0.00
	-	20.0				7.1			
AgB	+	11.1	0.62	0.70	1.75	11.1	0.36	0.17	-
	-	6.7				0.0			
Amino	+	33.0	<b>0.05</b>	<b>0.01</b>	-	0.0	0.65	0.46	0.00
	-	0.0				5.9			
Central	+	20.0	0.38	0.29	<b>4.50</b>	0.0	0.72	0.52	0.00
	-	5.3				5.6			
Carboxilo	+	16.7	0.56	0.65	1.80	0.0	0.92	0.77	0.00
	-	10.0				4.2			

\* Exacta de Fisher; \*\*Razón de Momios, <sup>o</sup> Extracto crudo a 10, 20 y 30  $\mu\text{g/ml}$ .

Cuadro 11. Búsqueda de asociación entre la producción de IL-4 y la respuesta proliferativa a diferentes estímulos.

		PACIENTES				SANOS			
<i>Respuesta a:</i>		%	<i>p</i> *	$\chi^2$	<i>RM</i> **	%	<i>p</i> *	$\chi^2$	<i>RM</i> **
ConA	+	15.4	0.89	0.72	-	16.7	-	-	-
	-	0.0							
EC10 <sup>o</sup>	+	9.5	0.59	0.77	0.74	14.3	0.54	0.71	0.71
	-	12.5				23.5			
EC20 <sup>o</sup>	+	10.0	0.51	0.63	0.60	14.3	0.64	0.94	1.07
	-	14.3				16.7			
EC30 <sup>o</sup>	+	7.7	0.30	0.29	0.33	18.2	0.57	0.76	1.33
	-	20.0				14.3			
AgB	+	11.1	0.69	0.87	0.81	22.2	0.12	0.05	-
	-	13.3				0.0			
Amino	+	16.7	0.58	0.69	1.70	11.1	0.73	0.96	0.94
	-	10.5				11.8			
Central	+	0.0	0.48	0.34	0.00	14.3	0.64	0.83	1.33
	-	15.8				11.1			
Carboxilo	+	0.0	0.44	0.31	0.00	0.0	0.78	0.59	0.00
	-	15.0				12.5			

\* Exacta de Fisher; \*\*Razón de Momios, <sup>o</sup> Extracto crudo a 10, 20 y 30  $\mu\text{g/ml}$ .

Cuadro 12. Búsqueda de asociación entre la producción de IL-10 y la respuesta proliferativa a diferentes estímulos.

		PACIENTES				SANOS			
<i>Respuesta a:</i>		%	<i>p</i> *	$\chi^2$	<i>RM</i> **	%	<i>p</i> *	$\chi^2$	<i>RM</i> **
ConA	+	13.9	0.86	0.69	-	19.4	-	-	-
	-	0.0							
EC10 <sup>o</sup>	+	9.5	0.37	0.42	0.46	14.3	0.41	0.49	0.53
	-	18.8				23.8			
EC20 <sup>o</sup>	+	13.6	0.65	0.96	0.95	17.6	0.64	0.94	1.07
	-	14.3				16.7			
EC30 <sup>o</sup>	+	11.5	0.43	0.51	0.52	13.6	0.25	0.27	0.39
	-	20.0				40.0			
AgB	+	11.1	0.36	0.36	0.34	11.1	0.54	0.62	0.54
	-	26.7				18.8			
Amino	+	16.7	0.66	0.81	0.75	11.1	0.57	0.66	0.58
	-	21.1				22.2			
Central	+	0.0	0.27	0.20	0.00	0.0	0.24	0.17	0.00
	-	26.3				22.2			
Carboxilo	+	16.7	0.67	0.86	0.80	50.0	0.29	0.16	7.00
	-	20.0				14.3			

\* Exacta de Fisher; \*\*Razón de Momios, <sup>o</sup> Extracto crudo a 10, 20 y 30 µg/ml.

Finalmente, se realizó una búsqueda exhaustiva de otras posibles asociaciones entre los valores de las diferentes variables que obtuvimos y no se encontró algún dato relevante.

## VII. DISCUSION

Los trabajos relacionados con el estudio de la respuesta inmune celular en la cisticercosis por *T. solium* son pocos, los primeros se desarrollaron en modelos experimentales de cisticercosis en rata (Rickard y Bell, 1971, Ayuya y Williams 1979), en ratón (Hinz, 1965, Lentoja y Hammerberg 1987) o en cabra (Meeusen E. y col., 1990) los cuales permitieron sugerir eventos inmunológicos en esta parasitosis, aun cuando las conclusiones deben considerarse con cautela ya que podrían revelar información diferente a la que sucede en la cisticercosis por *T. solium*.

### Ensayos de proliferación celular

En algunos estudios anteriores, se reportó que el cisticerco de *T. solium* producía moléculas que regulaban la respuesta celular, provocando una baja proliferación de linfocitos que responden a mitógenos (Arechavaleta y col., 1998; Tato y col., 1995; Correa y col., 1989). En otros estudios observaron la disminución de la respuesta proliferativa de células humanas en presencia del sobrenadante de cisticercos en cultivo (Molinari y col. 1990) y en 1996, Rakha y cols. identificaron un factor en los productos de secreción del "cisticerco" (coenurus) de *Taenia multiceps* que inhibía la proliferación de células T, los hallazgos anteriores sugerían un estado de inmunosupresión causada por la presencia del cisticerco en el huésped. Nuestros datos al igual que los reportados por Singh y col. (2000), revelan que los linfocitos de los pacientes tienen la misma capacidad de proliferación al estímulo con Con A que el grupo control. Es posible que al estudiar pacientes que no hubieran tomado tratamiento inmunosupresor o antiparasitario previo al estudio, la respuesta celular no este alterada y podamos observar datos más confiables, por el contrario los estudios previos no contemplaron ese aspecto o no lo describen. Por otro lado, al contar las células CD3+, CD4+ y CD8+, el número total y la relación encontrada fueron similares entre los grupos, sugiriendo que los pacientes son inmunocompetentes ya que sus células T fueron capaces de reconocer al mitógeno y proliferar y no se observaron disminuidas las células CD3+/CD4+, como en reportes previos de infecciones crónicas por helmintos (Kalinkovich y col., 1998). Los datos de la biometría hemática realizada a los individuos, reveló además que el estado general de ambos grupos es similar. Se buscaron posibles asociaciones entre la presencia de reacción inflamatoria alrededor de la lesión provocada

por el cisticerco en los pacientes y el número de granulocitos en sangre periférica y no se detectó ningún dato relevante. Esto sugiere que aunque en el sitio de la lesión existe un proceso inflamatorio no se reflejó detectó a nivel periférico ya que esperábamos que los valores de granulocitos en sangre fueran mayores en los pacientes comparados con el testigo.

Observamos una respuesta mayor en los pacientes hacia el EC al igual que los datos reportados por Singh y col., (2000), esa diferencia pudo haber sido más evidente aumentando el tiempo de incubación con el antígeno. La respuesta proliferativa mayor al EC en los pacientes es congruente con la presencia del parásito en los individuos; no obstante, existe un porcentaje considerable de individuos sanos que respondieron al estímulo con el antígeno. En este sentido, hay reportes de la respuesta mitogénica que presentan los linfocitos hacia extractos parasitarios (Rakha y col. 1991;1992;1997). Sealy y col. (1981), observaron que los linfocitos B de ratones sanos pueden estimular su división cuando los ponen en contacto con productos parasitarios de *T. solium*, pero no las células T. También se han identificado factores mitogénicos en extractos parasitarios de otros céstodos (Judson, y col. 1987). Un estudio reveló además, que el fluido del quiste de *T. multiceps* tiene capacidad de unirse a polisacáridos lo que sugiere una actividad similar a las lectinas (Rakha y col. 1991). Estudios posteriores demostraron que ese material estimula principalmente a células T (Rakha y col. 1992, Rakha y col. 1996). En 1997, White y col. proponen que la actividad mitogénica de productos del cisticerco, puede formar parte de un mecanismo homeostático para preservar un "equilibrio cordial" entre el huésped y el parásito, al producir activadores para linfocitos el cisticercos pueda favorecer también la producción de Igs ya que se ha observado estas moléculas del huésped en la superficie del cisticerco, y se ha postulado que pueden ser utilizadas como fuente de proteínas para el parásito. Por otro lado, la respuesta de los individuos sanos al EC sugiere también que pudieron haber tenido contacto con *T. solium* o con otro céstodo o helminto de reacción cruzada (Espinoza y col. 1986; Olivo y col. 1988). Aunque cabe señalar que por ELISA e IET no detectamos anticuerpos específicos en este grupo y no se buscaron anticuerpos específicos hacia otros parásitos.

La respuesta proliferativa hacia el AgB y sus fracciones reveló que ambos grupos respondieron de manera similar a la molécula completa. En cuanto a la respuesta hacia los

fragmentos del AgB, aunque fue heterogénea en los grupos se pudo observar mayor porcentaje de individuos en el grupo control que respondieron a la región amino y a la central, aunque estadísticamente la diferencia no es significativa. Tal vez se debieron dejar tiempos más largos en las incubaciones con el antígeno para observar diferencias entre los grupos, ya que en otro estudio si encontraron una mayor respuesta de los pacientes hacia el AgB (Singh y col., 2000). El interés por analizar la respuesta hacia el AgB, se basa en el hecho de que es un antígeno inmunodominante para la respuesta humoral (Flisser y col. 1980). Por otro lado, la detección del AgB en el medio de cultivo de cisticercos mantenidos *in vitro* sugiere, que se trata de una proteína que se libera hacia los tejidos del huésped (Laclette y col. 1987) Además, presenta otras características interesantes como son su afinidad por colágena (Laclette y col. 1990) y su capacidad de inhibir al C1q (Laclette y col. 1992). Estudios de secuencia de aminoácidos y antigenicidad mostraron que el AgB es la paramiosina (Laclette y col. 1991), molécula que mantiene secuencias repetidas a lo largo de su composición que la hacen una proteína muy homogénea (Landa y col. 1993), esta proteína también está presente en otros miembros del Phylum (Olivo y col., 1988); por lo tanto, la respuesta encontrada en el grupo control puede deberse a que los individuos pudieron haber tenido contacto con *Taenia solium* o con otros parásitos de reacción cruzada. Es interesante también que en el grupo control hubiera una mayor respuesta proliferativa hacia la región amino y central de la molécula, estudios anteriores revelaron que al inmunizar ratones con el fragmento amino y posteriormente infectarlos con cisticercos de *T. crassiceps*, los parásitos se desarrollaban menos (Solís, 1998), estos datos sugieren que la región amino de la molécula puede proteger contra la infección. Por otro lado, ensayos de proliferación con células de ratones inmunizados con el AgB y sus fragmentos sugieren que la protección inducida por el fragmento amino en contra de la cisticercosis murina puede ser mediada principalmente por una respuesta celular, en ese estudio los anticuerpos de los ratones reconocieron preferentemente al extremo carboxilo terminal de la proteína (Vázquez, 1996). Además la respuesta humoral de pacientes con cisticercosis también es más intensa contra el extremo carboxilo (Vázquez y col. en preparación). El mayor reconocimiento de los anticuerpos hacia el extremo carboxilo de la molécula sugiere que en ese sitio se localizan epítopos predominantemente activadores de linfocitos B. Interesantemente un análisis funcional indicó que el sitio de unión al C1q se localiza en el

extremo amino terminal de la molécula (Laclette y col. en preparación). Esto sugiere que el cisticerco al producir el AgB que libera hacia el tejido, activa la respuesta humoral de su huésped y se producen anticuerpos que reconocen preferentemente la región carboxilo de la proteína permitiendo que la región amino permanezca libre para unirse al C1q, bloqueando de esta manera la función del complemento. Al unirse los anticuerpos a la región carboxilo del AgB podría también ocultarse la región amino de la proteína y evitar que se active la respuesta celular del huésped. Además, al unirse a la colágena el AgB puede desviar la acción de los anticuerpos, como un mecanismo de evasión inmunológica, propuesto anteriormente (Correa y col. 1994).

### **El perfil de citocinas**

A finales de los años 80, se definió la dualidad Th1/Th2, de acuerdo al patrón de citocinas que producen los linfocitos (Mosmann y Coffman 1989), los estudios enfocados a conocer este aspecto en la cisticercosis apenas se están llevando a cabo y los datos todavía no son claros. Terrazas y col. 1998 encontraron que en los estadios tempranos de la cisticercosis experimental por *T. crassiceps*, la IgG 2a es la clase de inmunoglobulina más abundante en los ratones y la única relacionada a una respuesta del tipo Th1, que además se asocia con un bajo nivel de proliferación de los cisticercos, conforme transcurre la infección se establece una respuesta permanente de tipo Th2 que se caracteriza por un mayor nivel de anticuerpos de clase IgG2b, de IL-4, IL-6 e IL-10; esto a su vez se relaciona con la sobrevivencia del parásito. Por otro lado hay evidencia de que las oncosferas son susceptibles al ataque por anticuerpos y complemento *in vitro* (Molinari y col., 1993) aunque *in vivo* logran evadir e implantarse en su huésped y permanecer a pesar de que exista una respuesta de tipo Th1. Por otro lado en un estudio se observó que el patrón de interleucinas que presentan los ratones inmunizados con la región amino de la paramiosina y que además presentaron un alto grado de protección hacia la infección por *T. crassiceps* es consistente con una respuesta de tipo Th1, mientras que en los ratones no protegidos es del tipo Th2 (Solis, 1998). Nuestros datos apoyan la hipótesis de que la fracción amino de la molécula está relacionada a la activación de la respuesta de tipo Th1, ya que encontramos una fuerte asociación entre los pacientes que respondieron a esta fracción y la producción de IFN- $\gamma$ . Observamos también que en el grupo de individuos sanos hay una asociación

entre los individuos que responden a la fracción carboxilo y la producción de IL-10; este aspecto está relacionado a una respuesta humoral o del tipo Th2.

Los datos de producción de IL-2 en el presente estudio indican que la frecuencia es igual en ambos grupos; no obstante, al analizar la relación entre IL-2 producida en los pacientes con respecto al número de parásitos en el cerebro se encontró que el 100% de los pacientes con lesión única producen IL-2 y solamente el 58% de los que tienen múltiples parásitos. Singh y col. (2000), encontraron un aumento de la IL-2 en el grupo de pacientes con cisticercosis. Es probable que el parásito pueda mediar alguna clase de inmunosupresión o regulación por medio de moléculas que libera al entorno, este evento podría ser más evidente cuando hay muchos parásitos en el huésped como en la infección en el cerdo ya que la cantidad de moléculas liberadas de acuerdo a la cantidad de parásitos sean más, esto puede provocar que se active una respuesta de tipo Th2. En el ser humano, por el contrario, la infección suele ser menos masiva, incluso hay pacientes con un solo parásito por lo que la cantidad de moléculas que se liberan son en menor cantidad; en este sentido se llevo a cabo un estudio en el que se identificó un factor inmunosupresor para células humanas y murinas en el sobrenadante de cisticercos en cultivo, (Molinari y col. 1990, Arachavaleta y col., 1998, y Tato y col. 1995). Posteriormente se definió que era un pequeño RNA en el sobrenadante de cisticercos en cultivo que puede inhibir la producción de IL-2, IFN  $\gamma$  e IL-4, por células de ratón (Tato y col. 1995). Por otro lado, el sobrenadante de *T. taeniaeformis* puede disminuir la síntesis de IL-2 de células de bazo de rata (Burger y col., 1986). Estos eventos estarían relacionados por lo tanto a la cantidad de factor inhibitorio presente.

Los datos del presente estudio sugieren que la respuesta de tipo Th1 está presente en pacientes con neurocisticercosis, por lo que este tipo de respuesta aparentemente no permite que el huésped responda o controle la infección. Es posible que al igual que en cisticercosis murina, en la infección temprana podamos detectar interleucinas del tipo Th1 y en la infección avanzada se detecten interleucinas del tipo Th2 (Terrazas y col. 1998; Villa y Kuhn, 1996). La respuesta de tipo Th2 puede estar más relacionada a la destrucción, ya que Ostrosky-Zeichner y col. (1996), encontraron un nivel elevado de IL-6 en los LCR de pacientes con reacción inflamatoria en el sistema nervioso central, que estaría relacionado al proceso de eliminación del parásito. La aparente supresión de la respuesta puede estar

más relacionada a un delicado equilibrio del perfil Th1/Th2. En el modelo de *T. crassiceps* en ratón se detectó que un patrón de respuesta Th2 con presencia de IgG 1 e IgE previene la infección (Villa y Kuhn 1996; ZaKroff y col., 1989). El papel del equilibrio Th1/Th2 sobre la resolución de la cisticercosis en el ser humano no se ha dilucidado. Por otro lado, se analizó también la posible asociación entre las interleucinas encontradas y la presencia de reacción inflamatoria en los pacientes y no encontramos datos estadísticamente significativos.

Se sabe que los eventos celulares que intervienen en la destrucción del parásito involucran diversos tipos celulares. Los eosinófilos inician la destrucción al dañar el tegumento del cisticerco, seguido por macrófagos y linfocitos (Aluja 1989). Se observa en el grupo de pacientes con lesión múltiple que además de una menor producción de IL-2, solamente en este grupo se detectó IL-10. Esto sugiere que la respuesta Th2 también está presente cuando hay cisticercos vivos. Evans y col. (1998) encontraron que en algunos casos de pacientes con cisticercosis la IL-5 y la eotaxina están aumentadas en comparación con los testigos, aunque no definieron si los pacientes tomaron algún tratamiento o si existe reacción inflamatoria alrededor de los parásitos.

Existe la hipótesis de que cuando el cisticerco está en una relación en equilibrio con su huésped, ambas respuestas Th1 o Th2 pueden estar activas y que un ligero aumento de la respuesta Th2 (IL-4/IL-5), al menos en el sitio de la interfase huésped-parásito, es responsable de la destrucción del parásito, al inducir la llegada y la actividad de los eosinófilos que atacan y destruye al parásito. Posteriormente puede reactivarse la respuesta Th1, para permitir que los macrófagos intervengan. Relacionado a este aspecto, se llevó a cabo un estudio *in situ* de granulomas que rodean al cisticerco de *T. crassiceps* y se encontró que los granulomas tempranos (cuando los parásitos están intactos) están predominantemente asociados con una respuesta Th1, mientras los granulomas tardíos (en los que se observa la destrucción del parásito) hay una mezcla de Th1 y Th2; de ésta última solamente evaluaron IL-4 (Robinson y col. 1997). También se encontraron interleucinas de los dos tipos (Th1 y Th2) en las interfases del huésped-parásito que tenían un proceso inflamatorio dentro del cerebro de seres humanos (Restrepo y col. 1997).

Para tratar de comprender el tipo de respuesta inmune celular que desarrolla el huésped y que permite la eliminación o el establecimiento de la oncosfera, su desarrollo



hasta metacésto y su posible destrucción, consideramos que se debe identificar la fase de infección en la que se encuentra el paciente, ya que deben ocurrir diferentes eventos al menos en tres momentos de la infección con la oncosfera de *T. solium*. Al inicio, cuando se ingiere la oncosfera, una respuesta de tipo Th1 puede atacarla evitando su establecimiento, pero si el parásito logra desarrollar mecanismos de evasión con suficiente velocidad, se establece y se desarrolla hasta metacésto; posteriormente en esta fase el cisticerco puede activar una serie de mecanismos de evasión inmunológica para contrarrestar una respuesta de tipo Th1 que no protege al huésped o una respuesta de tipo Th2 con una elevada concentración de anticuerpos específicos y células como eosinófilos; durante la tercera fase o destrucción del cisticerco, inicialmente derivada de una respuesta de tipo Th2 con la presencia de anticuerpos, IL-4, IL-5, IL-6 y eotaxina, se forma la reacción inflamatoria en el sitio de la interfase, permite que los eosinófilos dañen al parásito y que los macrófagos y linfocitos inducidos por interleucinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  del tipo Th1 termine la destrucción del cisticerco y permitan la cicatrización de la lesión.

En conclusión creemos que en pacientes con neurocisticercosis activa que no presentan un proceso inflamatorio alrededor del parásito, no existe un estado de inmunosupresión, en estos pacientes se detectaron citocinas relacionadas a una respuesta del tipo Th1, un cambio de respuesta que active la síntesis de citocinas activadoras de eosinófilos puede ser responsable de la formación del proceso inflamatorio y la destrucción del parásito. Finalmente, este estudio sugiere que la respuesta inmune mediada por células especialmente células T y citocinas juega un papel importante en la cisticercosis por *T. solium* en humanos. Aunque se deben realizar más estudios para conocer otras moléculas involucradas.

## BIBLIOGRAFIA

- Aluja A S, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette JP, Larralde C, Madrazo I, Velazquez V, Williams K. 1987. Cisticercosis: Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de Cultura Económica. México D.F. p. 20
- Aluja A y Vargas G 1988. The histopatology of porcine cisticercosis. Vet. Parasitol. 28:65-77
- Aluja A. 1989. La histopatología de la cisticercosis porcina e investigación en México. Limusa-Noriega, México DF, pp 147-156.
- Alvarado-Rodriguez A. 1995. Efecto de los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre macrófagos *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán. UNAM. 52 pp.
- Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP. 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. Arch. Med. Res. 25: 325-330.
- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. 1998. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. Parasit. Res. 84: 117-122.
- Asno K, Ito A, Okamoto K. 1993. The role of OX22-helper T cell in protective immunity to reinfection with *Taenia taeniaeformis* in rats. Parasite-Immunol. 12: 663-668.
- Ayuya JM, Williams JF, 1979. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. VII Immunization by oral and parenteral administration of antigens. Immunology. 36:825-834.
- Barker CF, Billingham RE. 1977. Immunologically privileged sites. En: Advances in Immunology. Kunkel HG, Dixon FJ (eds). Academic Press, N.Y, 25: 1-54.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C. 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cisticercosis (*Taenia crassiceps*) J.Parasitol. 79:384-389.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-252.
- Burger CJ, Rikihisa Y, Lin YC. 1986. *Taenia taeniaeformis* inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin-2 production in rat splenocytes by larval *in vitro* products. *Exp. Parasitol.* 62: 216-222.
- Cañedo L, Laclette JP, Morales E. 1982. Evagination of metacestode of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser A, Williams K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltrán F. (eds). Academic Press, New York pp 363-374.
- Cárdenas F. 1992. *Taenia solium* ocular cysticercosis: findings in 30 cases. *Ann. Ophthalmol.* 24: 25-28.
- Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodezky C, Flisser A. 1985. Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *J. Parasitol.* 71: 535-541.
- Correa D, Laclette JP, Rodríguez-Del-Rosal E, Merchant M, Flisser A. 1987. Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs. *J. Parasitol.* 73: 443-445.
- Correa D, Tovar A, Espinoza B, Plancarte A, Flisser A. 1989. Cisticercosis humana relación inmunológica huésped-parásito. En: *Cisticercosis humana y porcina su conocimiento e investigación en México*. Edit. LIMUSA. pp 31-43.
- Correa D, Medina-Escutia E, Morales-Lopez Z, Mandujano-Martínez A, Medina-Flores Y, Meza-Lucas A. 1994. Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos, Cuaderno Técnico del INDRE No. 3, Secretaría de Salud, México, D.F., 54 pp.
- Correa D. 1998 Los antígenos del cisticerco de *Taenia solium*: aspectos básicos y aplicación en el diagnóstico clínico y en estudios epidemiológicos. Tesis de doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM 110 pp.
- Davis SW, Hammerberg B. 1988. Activation of the alternative pathway of complement by larval *Taenia taeniaeformis* in resistant and susceptible strains of mice. *Int. J Parasitol.*, 18:591-597.

- Diaz –Camacho S, Candil-Ruiz A, Uribe-Beltrán M, Willms K. 1989 Epidemiología de teniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser A, Malagón S. (eds). Limusa. México. Pp243-250.
- Diwan AR, McCoker-Vann M, Brown M, Subianto DB, Yolken R, Desowitz R, Escobar A, Gibbs C, Gajdusek C. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. Am. J. Trop. Med. Hyg., **31**: 364-369.
- Dixon HBF, Lipscomb FM. 1961. Cysticercosis: an analysis and follow up of 450 cases. Priov Council Med Res Special Rep Ser. **229**: 1-58.
- Earnest MP, Reller LB, Filley CM, Grek AJ. 1987. Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review. Rev. Infect. Dis. **9**: 961-979.
- Escobedo F. 1988. Neurosurgical aspects of neurocysticercosis. En: Operative Neurosurgical Techiques. Schmidek and Sweet (eds). Grune and Stratton 2nd Edition. USA. pp. 93-102.
- Espinoza. B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval M, Plancarte A, Flisser A. 1986. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol. **24**: 536-541.
- Evans CAW, García HH, Hartnell A, Gilman RH, Jose PJ, Martínez M, Remick DG, Williams TJ, Friedland SJ. 1998. Elevated concentration of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. Infect. Immun. **66**: 4522-4525.
- Fleiss JL 1983 Statistical methods for rates and proportions. 3<sup>rd</sup> Edn. New York . pp 160.
- Flisser A, Gonzalez D, Skurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodriguez-Carbajal J, Cohen S, Rodriguez-del-Rosal E, Collado M, Fernandez B, Fernandez F, Aluja AS. 1990 (a). Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 1. Radiological, physiological and histopathological studies. Parasitol. Res. **76**: 263-269.

- Flisser A, Gonzalez D, Plancarte A, Ostrosky P, Montero R, Stephano A, Correa D. 1990 (b). Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. *Parasitol. Res.* **76**: 640-642.
- Flisser A, Gonzalez D, Rodriguez-Carbajal J 1989. Swine cysticercosis treated with praziquantel, a short report. *Acta Leidensia.* **57**: 255-259.
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1997. Cisticercosis humana. Ed. El Manual Moderno México DF 176 pp.
- Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non responders. *Clin. Exp. Immunol.*, **39**, 27-37.
- Flisser A. 1994. Taeniosis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog. Clin. Parasit.* **4**: 77-116
- Gómez-García MC. 1993. Efecto del extracto crudo y de los productos de excreción-secreción del cisticerco de *Taenia solium* sobre el sistema del complemento *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 68pp
- Gonzalez D, Rodriguez-Carbajal J, Aluja A, Flisser A. 1987. Cerebral cysticercosis in pigs studied by computed tomography and necropsy. *Vet. Parasitol.* **26**: 55-69.
- Gorodezky C, Diaz ML, Escobar A, Flisser A. 1987. IgE concentration in sera of patients with neurocysticercosis. *Arch. Invest. Med. (Mex).* **18**: 225-227.
- Hammemberg B, Williams JF. 1978. Physico-chemical characterization of complement-interacting factors from *Taenia taeniaeformis*. *J. Immunol.* **120**: 1039-1045.
- Hayunga EG, Sumner MP, Letonja T. 1989. Evidence of selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* **75**: 638-642.
- Hinz E. 1965 Contribution to the standarization of experimental cysticercosis of the mouse as a model experiment for testing of agents affective against cysticercosis. *J. Parasitol.* **16**: 322-331.
- Judson DG, Dixon JB, Skerritt GC 1987. Ocurrence and biochemical characteristics of cestode lymphocyte mitogens. *Parasitology.* **94**:151-160.
- Kalinkovich A, Weisman Z, Greenberg Z, Nahmias J, Eitan S, Stein M, Bentwich Z. 1998. Decreased CD4 and increased CD8 counts with T cell activation is associated with chronic helminth infection. *Clin. Exp. Immunol.* **114**:414-421.

- Laclette JP, Alagón A, Willms K, Torre-Blanco A. 1990. Purification of antigen B from *Taenia solium* Cysticerci by affinity to mammalian collagen. J. Parasitol. **76**:273-275.
- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker CB. 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). Mol. Biochem. Parasitol., **44**: 287-296.
- Laclette JP, Merchant MT, Willms K. 1987. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. J. Parasitol., **73**: 121-125.
- Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K. 1982. Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Williams K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltrán F. (eds). Academic Press, New York pp 375-387.
- Laclette JP, Shoemaker C, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. J. Immunol. **148**:124-128.
- Laclette JP, Skelly PJ, Merchant MT, Shoemaker CB, 1995. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. Exp. Parasitol. **81**:140-147.
- Laemmli V. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly at the head of bacteriophage T4. Nature, **227**: 680-685.
- Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker BC. 1993. *Taenia solium* paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity. Mol Biochem. Parasitol. **60**:343-347.
- Landa A. 1992 *Taenia solium*: Clonación, caracterización y expresión del gen para el antígeno B. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. 110 pp
- Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, Coltorti E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. **40**:282-290.
- Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L. 1987. Parasite defense mechanisms for evasion of host attack: A review. Vet. Parasitol. **25**:147-162.

- Lentoja T, Hammemberg C, Schurig G. 1987. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*. *Parasitol. Res.* **73**:265-270.
- Lloyd S, Soulsby E. 1978. The role of IgA immunoglobulin in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. *Immunology.* **34**: 939-945.
- Macías SR, Hernández Peniche J. 1966. Cisticercosis cerebral. *Prems. Méd. Mex.*, **5**: 147-152.
- Male, D., Champion, B., Cooke, A., Owen, M. 1991. *Advanced Immunology.* 2a. Edición. Ed. Gower. 1187 pp.
- Mandujano A, Vela M, Alcántara P, Correa D. 1990. Presence of a receptor for the Fc fraction of IgG in *Taenia solium*. [Abstract] *Bull Soc. Fr. Parasitol.*, **8** (Suppl. 1), 578.
- Medina Escutia ME. 1992. Efecto de productos de cisticercos de *Taenia solium* sobre eosinófilos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 53 pp.
- Meeusen E, Barcham GJ, Gorrell MD, Richard MD, Brandom MR. 1990. Cysticercosis: cellular immune response during primary and secondary infection. *Parasite Immunol.* **12**: 403-418.
- Miller B, Grinnell V, Goldberg MA, Heiner D. 1983. Spontaneous radiographic disappearance of cerebral cysticercosis: three cases. *Neurology*, **33**: 1377-1379.
- Mitchell GF, Goding JW, Richard MD. 1977. Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyroid mice to *Taenia taeniaeformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Austr J Exp Biol Med Sci* **55**:165-186.
- Mitchell GF. 1982. Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host-protective immunity and immune evasion. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. N.Y. pp. 575-584.
- Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tato P, Retana A. 1983 (a). *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasitol.* **55**: 340-357.
- Molinari JL, Meza R, Tato P. 1983 (b). *Taenia solium*: cell reaction to the larva *Cysticercus cellulosae* in natural parasitized, immunized hogs. *Exp. Parasitol.* **56**: 327-338.

- Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J Palet A. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 502-512.
- Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, White AC, Jr. 1993. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J. Parasitol.* **79**: 124-127.
- Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Cazares JM. 1990. Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **84**: 205-208.
- Moreno J, 1996. Respuesta Inmune y mecanismos de autoinmunidad. ED Noriega 111 pp.
- Mosmann TR, Coffman RL. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokines secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* **7**: 145-173.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* **136**: 2348-2357.
- Nieto D. 1948. Diagnóstico de la cisticercosis del sistema nervioso. *Prensa Méd. Méx.* **13**: 226-230.
- Olivo A, Plancarte A, Flisser A. 1988. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. *Intl. J. Parasitol.* **18**: 543-545.
- Ostrosky-Zeichner L, García-Mendoza E, Ríos C, Sotelo J. 1996. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Arch. Med. Res.* **27**: 513-517
- Plancarte A, Flisser A, Larralde C. 1983. Fibronectin-like properties in antigen B from cysticercus of *Taenia solium*. *Cytobios.* **36**: 83-93.
- Rabiela T, Flisser A. 1990. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol. Today*, **5**: 357-359.
- Rabiela-Cervantes M.T. 1989. Patología de la neurocisticercosis benigna y grave. En: Flisser, A. F. Malagón (eds). *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa-Noriega, México, D.F. pp. 107-126.



- Rakha NK, Dixon JB, Carter SD. 1996. *Taenia multiceps* (Cestoda): Ia antigen expression and prostaglandin secretion by parasite-modified, murine peritoneal macrophages. *Parasite*. **3**:135-141.
- Rakha NK, Dixon JB, Jenkins P, Carter SD, Skerrett GC, Marshall-Clarke S. 1991. Modification of cellular immunity by *Taenia multiceps* (Cestoda ): accessory macrophages and CD4+ lymphocytes are affected by two different coenurus factors. *Parasitology* **1**:139-147.
- Rakha NK, Dixon JB, Skerrett GC, Carter SD, Jenkins P. 1992. Modification of accessory activity of sheep monocytes *in vitro* by a coenurus antigen from *Taenia multiceps*. *Vet. Immunol Immunopatol.* **30**:293-304.
- Rakha NK, Dixon JB, Carter SD. 1997. Immunological activities of a lymphocyte mitogen isolated from coenurus fluid of *Taenia multiceps* (cestoda). *Parasite*. **4(1)**:9-16.
- Ramírez-Bon E, Merchant MT, Gonzalez- del Pliego M, Cañedo L. 1982. Ultrastructure of the bladder wall worm of the metacestode of *Taenia solium*. En: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser A, Williams K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltrán F. (eds). Academic Press, New York pp 261-280.
- Ramos OM, Stiebel-Chin G, Altman N, Duchowny M. 1986. Diagnosis of neurocysticercosis by magnetic resonance imaging. *Pediatr. Infect Dis.*, **5**: 470-473.
- Reinherz E L, Kung P C, Goldstein G, Schlossman S F. 1979. Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci.* **76**:8-12
- Restrepo B, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM. 1998. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol.* **89**:64-72.
- Rickard MD, Bell KJ. 1971. Immunity produced against *Taenia ovis* and *T. taeniaeformis* infection in lambs and rats following *in vivo* growth of their larvae in filtration membrane diffusion chamber. *J. Parasitol.* **57**:571-575.
- Robinson P, Altamar R, Lewis D, White C Jr. 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* **65**: 2925-2931
- Rodriguez-Carbajal J, Boleaga-Durán B 1982. Neuroradiology of human cysticercosis. En: *Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives*. Flisser A, Williams K,

- Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltrán F. (eds). Academic Press, New York pp 139-162.
- Sarti E. 1989. Epidemiología de la teniasis-cisticercosis. En: Flisser A y Malagón F, (eds.), Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México, 1a. ed., Limusa-Noriega México, , pp. 233-242.
  - Sarti EJ, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan JC, Craig PS, Bronfman M, Wijeyaratne P. 1997. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in México. Am. J. Trop. Med. Hyg., **556**: 127-132..
  - Sarti EJ, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez I, Aguilera J, Roberts J, Flisser A. 1994. Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico. Trans Soc Trop. Med. Hyg. **88**: 49-52.
  - Schantz P.M., Cruz M, Sarti E, Pawlowski Z. 1993. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. Bull Pan Am Health Organ. **71**:223-228.
  - Schantz P.M., Moore A.C., Muñoz JL, Hartman BJ, Schaenfer JA, Aaron AM, Perssand D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. 1992. Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in N.Y. city. N. Engl. J. Med. **327**:692-695.
  - Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A. 1994. Community-based epidemiological investigation of cysticercosis due to *Taenia solium*: Comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. Clin. Infect. Dis. **18**:879-885.
  - Sealy M, Ramos C, Willms K, Ortiz-Ortiz L. 1981. *Taenia solium*: mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes. Parasite Immunol **3**:299-307.
  - Singh GJ, Kaur S, Bhatti G, Singh SMI, Kumar GN, Chander MR, Malla N. 2000. Cellular immune response in human neurocysticercosis. Parasitol. Res. **86**:500-503.
  - Solís Aguirre C.F. 1998. Vacunación en contra de la cisticercosis murina con proteínas recombinantes de paramiosina de *Taenia solium*. Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM 45 pp.
  - Sotelo J, Escobedo F. Penagos P. 1989. Albendazole vs praziquantel for therapy of neurocysticercosis. A controlled trial. Arch Neurol., **46**: 1231-1236.

- Sotelo J. 1987. Use of enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of cysticercosis. *Arch. Neurol.*, **44**: 898-903.
- Sprent, J. 1989. *Fundamental Immunology*. 2a. Edición. William E. Paul Ed. Raven Press Ltd. New York. pp 69-87.
- Tato P, Castro AM, Rodriguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL. 1995. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasit. Res.* **81**: 181-187.
- Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* **84**: 74-81.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. 1989. An Enzyme linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infec. Dis.* **59**: 50-59.
- Tsang VCW, Pilcher JA, Zhou W, Boyer AE, Kamango-Sollo EIP, Rhoads ML, Murell KD, Schantz PM, Gilman RH. 1991. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM-IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **29**: 69-78.
- Tsang VCW, Wilson M. 1995. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitol Today.* **11**: 124-126.
- Vázquez Talavera J. 1993. Distribución de epitopes para células B de un antígeno inmunodominante en la cisticercosis humana. Tesis de Licenciatura. Instituto de Investigación Biomédicas, UNAM 41pp.
- Vázquez Talavera J. 1996. Distribución de epitopes para células T y B en el antígeno B de *Taenia solium*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigación Biomédicas, UNAM 48pp.
- Vázquez V, Sotelo J. 1992. The course of seizures after treatment of cerebral cysticercosis. *New Engl. J. Med.* **327**: 696-701.
- Villa OF, Kuhn RE. 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* **112**: 561-570.

- Villagran-Urbe J, Olvera-Rabiela JE. 1989. La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de Mexico, En: Flisser A, Malagon F (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigacion en Mexico, Mexico: Limusa-Noriega, pp. 97-105.
- Weller PF, 1994. Eosinophils: structure and functions. Current Opinion in Immunology. 6:85-90
- White AC Jr., Robinson P, Kuhn R. 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interaction and the immune response. Chem. Immunol. 66: 209-230.
- Williams JF, Engelkirk PG, Lindsay MC. 1982. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. N.Y. pp. 621-632
- Willms K, Arcos L 1977. *Taenia solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immuno-enzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396-401.
- Willms K, Merchant MT. 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol. 2: 261-275.
- Zakroff SGH, Beck L, Platzer EG, Spiegelberg HL. 1989. The IgE and IgG subclass responses of mice to four helminth parasites. Cell Immunol. 119: 103-201.