



00346
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DIAGNÓSTICO
ESPECÍFICO PARA IDENTIFICAR LA FASE ADULTA
DE *T. solium* MEDIANTE EL USO DE ANTICUERPOS
MONOCLONALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

RICARDO GARCÍA RODEA

DIRECTOR(A) DE TESIS:

DRA. MARIA DOLORES CORREA BELTRÁN.

México, D.F.

OCTUBRE DE 2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Por el cariño, comprensión y apoyo que siempre me han mostrado.

A MIS HERMANOS

Alejandro, Reyna, Chucho, Felipe, Martín y Elena.

A LUPITA

Por su amor, apoyo y comprensión en las buenas y en las malas.

A MIS HIJOS ANGÉLICA Y RICARDO

Por el amor que les tengo y con el deseo de que se sigan superando.

A LOLA Y A YOLA

Que con sus puntos de vista siempre optimistas me han motivado a seguir adelante.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA.

Que de forma directa o indirecta, contribuyeron a realizar este trabajo.



AGRADECIMIENTOS

A MIS TUTORES:

Dra. Ma. Dolores Correa, Dra. Ana Flisser y al Dr. Juan Pedro Laclette por sus acertados comentarios durante la realización de este trabajo.

A TODOS MIS COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA:

En especial al Químico Antonio Meza Lucas, al Biólogo Juan Carlos Carpio Pedroza, al Químico Roberto Carlos García y al Técnico Santiago Benítez Roura del departamento de Histopatología.

A YOLA

Un especial agradecimiento a Yolanda Medina Flores jefa del Laboratorio de Producción de Anticuerpos Monoclonales del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos por su apoyo y enseñanza en la obtención de los anticuerpos monoclonales utilizados en este trabajo.

A TOÑO MEZA

Un especial agradecimiento a Toño Meza jefe del Laboratorio de Pruebas Rápidas Departamento de Investigaciones Inmunológicas del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos por su apoyo constante en la realización de este trabajo.

EL CONACYT

Por la beca otorgada durante los estudios de Maestría.



CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Historia del estudio de la cisticercosis y de la teniosis.....	7
Morfología y Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	8
Epidemiología de la cisticercosis.....	11
Epidemiología de la teniosis.....	14
Modelos experimentales de teniosis.....	15
Aspectos clínicos de la cisticercosis.....	16
Aspectos clínicos de la teniosis.....	17
Diagnóstico de la cisticercosis.....	18
Diagnóstico de teniosis.....	21
Anticuerpos monoclonales y el diagnóstico.....	22
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Identificación del parásito adulto de <i>Taenia solium</i> y <i>Taenia saginata</i>	26
Obtención de Antígenos.....	26
Electroforesis en geles de acrilamida-SDS en gradiente de 5 al 22.5%.....	29
Inmunización de ratones.....	29
Mantenimiento de células de mieloma Ag8 e hibridomas.....	29
Obtención de células del bazo del ratón inmunizado y fusión celular.....	30
Clonación celular.....	31
Congelación y descongelación de células.....	31
Fortalecimiento celular por inducción de tumor ascítico.....	31
Determinación de anticuerpos por ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	32
Cultivo de hibridomas en medio libre de proteínas.....	33
Purificación de AcMo F6.64.....	33
Inmunoelectrotransferencia.....	34
Obtención del adulto de <i>Taenia solium</i> por medio del modelo de hamster dorado.....	34
Obtención del ESTsol y del ESCist.....	35
Inmunohistoquímica.....	35
ELISA de captura de antígenos para determinar reacciones cruzadas del AcMo F6.64 con otros antígenos de parásitos y bacterias intestinales.....	36
ELISA de proporciones para determinar las concentraciones de trabajo del AcMo F6.64.....	37
ELISA de captura de coproantígenos en muestras de heces creadas (adicionadas con ESTsol).....	38
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	56
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFÍA	61
APÉNDICE A. ABREVIATURAS	72
APÉNDICE B. INDICE DE FIGURAS	74
APÉNDICE C. SOLUCIONES	76

RESUMEN

Taenia solium es un parásito que en su estado adulto se aloja en el intestino delgado del ser humano y provoca la teniosis, esta enfermedad por si sola no ocasiona trastornos graves en el individuo parasitado, sin embargo, su importancia radica en que el individuo parasitado actúa como foco de infección de un estado patológico denominado cisticercosis donde esta involucrado el metacéstodo de *T. solium* y que en su variante de neurocisticercosis puede provocar trastornos que van desde los leves hasta los fatales. Tomando en cuenta el papel tan importante que juega el individuo teniásico en el ciclo de vida de *T. solium*, en este trabajo se abordó como objetivo principal, producir un anticuerpo monoclonal que reconociera específicamente el gusano adulto de *T. solium* para elaborar con él un método de diagnóstico de este parásito. Como resultado de este trabajo, se presenta la producción y caracterización del anticuerpo monoclonal (AcMo) F6.64, el cual reconoce específicamente antígenos de *T. solium* por inmunoelectrotransferencia (IET) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). Este anticuerpo reconoce particularmente a *T. solium* de entre otros agentes infecciosos estrechamente relacionados y en especial la distingue de *Taenia saginata*, que al igual que *T. solium* puede llegar a alojarse en el intestino delgado del ser humano pero con la diferencia de que sus huevos no le provocan cisticercosis. En los primeros ensayos de reconocimiento de *T. solium* por ELISA, se utilizó el sobrenadante del medio de cultivo del hibridoma productor y se encontró que el anticuerpo solo reconocía a *T. solium*; sin embargo al utilizar el AcMo puro, se observó un reconocimiento de *T. saginata*, aunque de menor intensidad. En IET se encontraron bandas antigénicas compartidas entre *T. solium* y *T. saginata* pero también distintivas entre ambas especies. Así mismo, en IFI se encontraron diferencias entre ambas especies en cuanto a la distribución del epítipo reconocido, ya que en *T. solium* el antígeno se encuentra ampliamente distribuido hacia el interior del proglótido exceptuando el área de las ramas uterinas y el tegumento y en cambio en *Taenia saginata* el antígeno parece encontrarse en la superficie de fibras musculares. Este anticuerpo no reconoce a la miosina ni al antígeno B de *T. solium*, a pesar de que este último es considerado como un antígeno inmunodominante. El AcMo F6 64 reconoce un purificado de glicoproteínas del cisticerco de *T. solium* en IET y ELISA, lo cual concuerda con la distribución del antígeno en IFI y abre la posibilidad de diagnosticar cisticercosis

activa por detección de antígenos específicos en suero de pacientes con cisticercosis. De la misma forma el AcMo F6.64 reconoce en ELISA de coproantígenos con muestras creadas, antígenos de excreción-secreción del parásito adulto desarrollado en hamster y abre la posibilidad de diagnosticar *T. solium* en individuos con teniosis.

INTRODUCCIÓN

Historia del estudio de la cisticercosis y de la teniosis.

En una revisión reciente sobre la historia del conocimiento acerca de este parásito, Flisser, Madrazo y Delgado (1997) hacen una reseña muy completa, que empieza con las "Notas históricas de cisticercosis", publicadas por Nieto en 1948. En estas notas menciona que la enfermedad es conocida desde la antigüedad y que probablemente los primeros testimonios que la relacionan con el hombre existan desde la época de Moisés, que por instrucciones médicas dictó leyes sanitarias de protección contra el consumo de carne de animales infectados con "piedras" perjudiciales para la salud; Aristófanes (380 y 375 a.C.) menciona en una de sus comedias la presencia de vesículas en la lengua de cerdos, a las que describe con una apariencia de "granizo", incluso llegó a sugerir que el hombre podía ser examinado como los cerdos, obligándolo a mantener la boca abierta para exponer la lengua y detectar la presencia de algún cisticerco, técnica que se sigue aplicando hasta nuestros días pero para los cerdos. Aristóteles (384-332 a.C.) en su "Historia de los animales" por primera vez describe la enfermedad en cerdos, aunque sin entender la naturaleza de la misma. Paranoli en 1550 describe por primera vez al cisticerco en el cuerpo caloso del cerebro de un sacerdote; Gesner y Rumler en 1558 reportan el primer caso de vesículas en la dura madre de un epiléptico. La descripción de la naturaleza de esta enfermedad la da Malpighi en 1697, donde la considera como una parasitosis, Goeze por su parte, desconociendo estos reportes, examina cerdos con cisticercosis y determina que la enfermedad la causa un helminto. Van Beneden en 1853 da de comer huevos de *T. solium* a cerdos y recupera posteriormente numerosos cisticercos, con lo cual encuentra la asociación entre la cisticercosis porcina y la teniosis humana. Dando un paso más y utilizando métodos poco éticos para nuestra época, Kückenmeister en 1855 infecta con cisticercos de *T. solium* a "voluntarios humanos" (los cuales eran presos condenados a muerte) y confirma el desarrollo de la forma adulta en el intestino de los mismos al momento de la autopsia, con lo cual el investigador describe esta parte del ciclo biológico, al relacionar el desarrollo de la tenia adulta en el humano con el cisticerco del cerdo. Ochenta años después, Yoshino (1933), al inocular cerdos con huevos de *T. solium* describe esta parte del ciclo y su evolución hasta cisticerco en el cerdo y define que se expulsan de 1 a 5 proglótidos grávidos por día después de

ingerir cisticercos y seguir su propia infección durante dos años. Un seguimiento de la enfermedad en soldados ingleses que habían prestado servicio en la India, y que habían estado en contacto con la enfermedad, permitió conocer el tiempo que transcurre entre la infección y la aparición de síntomas de la cisticercosis, el cual es de aproximadamente 7 años, pudiéndose extender hasta 30 (Dixon y Lipscomb, 1961).

Morfología y Ciclo de vida de *Taenia solium*.

T. solium es un organismo que parasita al ser humano y al cerdo. Este parásito produce en el ser humano dos tipos de enfermedad: la teniosis, en la cual el ser humano aloja en su intestino delgado al gusano adulto y actúa como hospedero definitivo y la cisticercosis en la cual el metacéstodo produce una infección tisular en el ser humano y el cerdo. La relación entre el metacéstodo y su hospedero ha sido más estudiada que la del adulto (ya que el ser humano es su único hospedero definitivo); además los problemas que puede ocasionar el cisticercoson son más graves que los que pueda ocasionar el parásito adulto, por lo que ha sido objeto de mayor interés científico.

T. solium pertenece al Phylum Platyhelminthes; clase Cestoda; subclase Eucestoda; orden Cyclophyllidea; familia Taenidae; género *Taenia*; y especie *Taenia solium*, (Verster, 1969). Es un gusano hermafrodita con un cuerpo alargado y aplanado, de color blanco lechoso, con una longitud variable entre 2 y 7 metros y se le conoce comúnmente como "solitaria". *T. solium* carece de tracto digestivo, y se alimenta a través del sincicio celular en la superficie tegumentaria, absorbiendo moléculas orgánicas de bajo peso molecular directamente del contenido intestinal por difusión pasiva o transporte activo (Smyth *et al.*, 1989). *T. solium* parasita de forma natural el intestino delgado del ser humano (hospedero definitivo) al cual se adhiere por medio del escólex y permanece en él alimentándose de su contenido. Su cuerpo se subdivide en tres partes principales: escólex, cuello y estróbilo. El escólex mide de 1 a 2 mm y está constituido por un ganglio nervioso, cuatro órganos musculosos de fijación (ventosas) y un rostelo formado por una doble corona de ganchos, de 22 a 32 y 0.11 a 0.12 mm de largo; en conjunto estas estructuras le sirven para fijarse a la pared del yeyuno. Como continuación del escólex se encuentra el cuello,

esta región es donde se generan segmentos rectangulares llamados proglótidos que dependiendo de su estado de madurez pueden ser denominados como: proglótidos inmaduros, son los más cercanos al cuello y se caracterizan por carecer de órganos sexuales diferenciados; los proglótidos maduros, se localizan en la región media del estróbilo y contienen órganos reproductores masculino y femenino bien diferenciados lo cual le otorga el fenotipo de hermafrodita donde aparentemente ocurre la autofecundación por lo que cada segmento es una unidad de reproducción independiente, capaz de producir huevos con embriones infectantes y por último, los proglótidos grávidos, localizados en el último tercio del estróbilo, son los más grandes y presentan un útero ramificado con 7 a 13 ramas uterinas laterales bien diferenciadas y repletas de huevos en diferentes fases de desarrollo. En conjunto, cerca de 800 a 1000 proglótidos forman el estróbilo en la porción distal del gusano, (Aluja *et al.*, 1987; Flisser, Madrazo y Delgado 1997; Lamothe y García 1985; Malagón, 1989). Un individuo parasitado con el adulto de *T. solium* tiene una capacidad de infección enorme, ya que, puede liberar diariamente entre 3 y 5 proglótidos que contienen cada uno cerca de 50, 000 huevos infectivos, (Malagón, 1989). Los huevos al ser expulsados al medio pueden ser maduros o inmaduros, sin embargo estos últimos, pueden terminar su maduración en el ambiente y permanecer viables e infectantes por semanas o meses (Aluja *et al.*, 1987). El ciclo biológico continúa cuando los huevos de *T. solium* son eliminados con las heces del individuo con teniosis y tanto el cerdo (hospedero intermediario natural) como el ser humano (hospedero intermediario accidental) pueden ser infectados y adquirir la cisticercosis al ingerir los huevos de tenia. En el primer caso debido a sus hábitos coprofágicos y en el segundo de forma accidental al consumir alimentos contaminados con huevos de tenia, preparados por personas infectadas y con malos hábitos de higiene, que incluso pueden sufrir una auto infección por la vía ano-mano-boca. Existe también la posibilidad de infección por peristaltismo inverso. Los huevos están rodeados de una capa celular o vitelo, que a su vez rodea una estructura denominada embrióforo, constituido por una serie de tabiques unidos entre sí por una proteína cementante, dándole al huevo una apariencia radiada. Hacia el interior se encuentra la membrana oncosferal que cubre a la oncósfera o embrión hexacanto, llamado así por tener tres pares de ganchos. Es de suponer que el mecanismo de transformación de los huevos infectantes a

cisticercos es similar al descrito en el cerdo (Correa-Beltrán. *et al.* 1991; Díaz-Camacho *et al.*, 1989): una vez que los huevos entran al estómago, las enzimas gástricas e intestinales destruyen los bloques embriofóricos liberando al embrión (Laclette *et al.*, 1992). Una vez liberado el embrión hexacanto se adhiere con sus ganchos a la pared intestinal, y mediante la liberación de enzimas hidrolíticas atraviesa la barrera intestinal hasta llegar al torrente circulatorio o linfático y es transportado a diferentes tejidos y órganos como pueden ser el tejido muscular, nervioso o subcutáneo e incluso órganos como el ojo, corazón, hígado o pulmón. Una vez establecidos, los embriones aumentan de tamaño y se desarrollan hasta formar los cisticercos, (Cañedo *et al.*, 1982; Flisser *et al.*, 1994). Los cisticercos pueden alojarse en diferentes tejidos y órganos, sin embargo, los que se alojan en el sistema nervioso central (SNC) es posible que sobrevivan por periodos más prolongados que aquellos localizados en otros órganos, debido a que este órgano tiene cierto privilegio en cuanto a la respuesta inmunológica (Barker y Billingham, 1977) y posiblemente es la razón por la que los parásitos pueden sobrevivir por periodos de 7 a 30 años antes de ocasionar problemas neurológicos (Dixon y Lipscomb, 1961) y también que la interfase observada, desde el punto de vista inmunológico, sea muy heterogénea entre diferentes pacientes con cisticercosis (Correa *et al.*, 1985; Rabiela-Cervantes, 1989). Probablemente en los seres humanos, la relación hospedero parásito sea de mayor duración y de ahí derive la heterogeneidad encontrada.

La observación *ante mortem* de “granos” o nódulos en la base de la lengua del cerdo como método de diagnóstico revela esta parasitosis, la cual es denominada comúnmente como tomate, tomatillo, zahuate, grano, granillo, granizo, alfilerillo entre otras. Los cisticercos son vesículas ovaladas constituidas por un saco membranoso, hialino y translúcido de aproximadamente 10x5x5 mm, lleno de líquido y que alberga un escólex invaginado y suspendido en el mismo (Malagón, 1989). La pared vesicular es un tejido sincicial, que externamente muestra un epitelio cubierto de microtricas, a través del cual ocurre el intercambio metabólico entre el hospedero y el parásito y se le conoce como tegumento; este se conecta a su vez con los citones tegumentarios por medio de puentes citoplásmicos llamados procesos internunciales. Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de músculo liso, bolsas de almacenamiento de glucógeno, grasas y un sistema protonefridial constituido por varios tipos de células como las células flama y las células de los canales (Ramírez-

Bon *et al.*, 1982). Una variedad morfológica del cisticerco celuloso, encontrada únicamente en el sistema nervioso central del ser humano, 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 este cisticerco es una transformación del celuloso, ya que se han descrito formas intermedias entre ambos tipos (Rabiela *et al.*, 1990). Las causas de que el cisticerco cambie a esta forma se desconocen, sólo se les ha encontrado 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, 1966; Rabiela-Cervantes, 1989). Finalmente el ser humano adquiere la teniosis al ingerir carne de cerdo mal cocida o cruda infectada con cisticercos. Las sales biliares y las enzimas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la evaginación del cisticerco que se ancla a la pared intestinal por medio de su escólex; a partir de aquí inicia su crecimiento para llegar a la forma adulta después de 4 meses (Cañedo *et al.*, 1982).

Epidemiología de la cisticercosis.

La teniosis y la cisticercosis producida por *T. solium* son enfermedades ligadas al subdesarrollo y se presentan en regiones donde las condiciones físico-ambientales, económicas, sociales y culturales son deficientes y favorecen su transmisión, donde se carece de infraestructura sanitaria adecuada, con crianza de cerdos que tienen libre acceso a las heces de origen humano, hacinamiento, malas condiciones personales de higiene, además de pobreza e ignorancia. La cisticercosis es una enfermedad que es reconocida como un problema de salud pública en Latinoamérica, India, China, Sureste de Asia, Oceanía y Africa, donde ligada al subdesarrollo generalmente la enfermedad es endémica (Flisser *et al.*, 1997; OPS/OMS, 1994) y actualmente se considera como una enfermedad emergente en algunos países desarrollados como los Estados Unidos de Norteamérica (Earnest *et al.*, 1987; Schantz *et al.*, 1992). En México, esta zoonosis constituye un problema de salud pública, principalmente en lo que se refiere a la neurocisticercosis que puede provocar en el individuo incapacidad para desarrollar sus actividades normales, afecta a individuos en edad económicamente activa y como consecuencia daña la economía familiar y

social (Flisser, Madrazo, Delgado, 1997). Además, en el caso de la cisticercosis porcina ocurren pérdidas en la porcicultura, ya que la inspección sanitaria se hace *post mortem*, y al encontrar este parásito, la carne es decomisada e incinerada (Acevedo-Hernández, 1982). En México la neurocisticercosis es una enfermedad que ocupa un lugar preponderante entre las enfermedades del SNC, ya que entre los casos de autopsia, se ha reportado una prevaencia de alrededor del 2% (Villagran-Urbe y Olivera-Rabiela, 1989). Cabe señalar que en estos estudios, la cisticercosis fue la causa de muerte en alrededor del 20% de los casos (Rabiela-Cervantes, 1989). Sin embargo, los estudios hechos en soldados ingleses sugieren que los casos asintomáticos después de un tiempo que varía entre 1 mes y 30 años presentan problemas clínicos (Dixon y Lipscomb, 1961). Desgraciadamente no se tienen estudios más recientes de series de autopsias, por lo que la prevalencia de casos con NCC confirmada por patología se desconoce en la actualidad. A partir de 1979, la cisticercosis se convirtió en una enfermedad de notificación obligatoria en México (Sarti, 1989); sin embargo, la sub-notificación sigue haciendo difícil la valoración del problema. Los casos de cisticercosis son reportados a la Dirección General Adjunta de Epidemiología de la Secretaría de Salud donde se tienen registrados desde 1975. En México, los estudios seroepidemiológicos se comenzaron a realizar en los años 70; en 1971 Goldsmith y col. efectuaron el primero de ellos utilizando muestras de suero del Estado de Oaxaca; en este estudio se utilizó la prueba de hemaglutinación pasiva y se encontró 3.2% de individuos con anticuerpos anti-cisticercos. En 1976 en Chiapas se encontró que la prevalencia de anticuerpos por inmunoelectroforesis (IEF) era más alta en los asentamientos más pequeños (8%) que en comunidades más grandes (2 %), lo cual concuerda con un ciclo principalmente rural que mantiene la transmisión en forma endémica (Flisser *et al.*, 1976). Posteriormente Woodhouse, Flisser y Larralde en 1982 dieron a conocer los resultados de IEF realizada para el análisis de la primera Encuesta Nacional Seroepidemiológica (ENSE), basados en una muestra representativa de todas las entidades federativas del país, de todos los estratos socioeconómicos incluyendo los asentamientos rurales y urbanos. Esta encuesta fue elaborada en 1974 por el Instituto Mexicano del Seguro Social y se analizaron aproximadamente 20,000 sueros de los cuales el 1% resultaron positivos y donde la zona del Bajío resultó ser la de mayor prevalencia con poblaciones como la de Jolostotitlán, Jalisco con 6% de

individuos seropositivos (Flisser *et al.*, 1994). Entre 1987 y 1988, se llevó a cabo la segunda ENSE con casi 70,000 sueros. La seropositividad global usando hemaglutinación indirecta fue del 1.2%, con diferencias significativas entre estados que variaron de 0.06% a 3.0%. (Laralde *et al.*, 1992) También se han estudiado factores de riesgo de tipo biológico, geográfico, social, económico, cultural y educativo, asociados a la presencia de anticuerpos anti-cisticerco en suero. En 1988 en "El Sótano", Hidalgo, se hizo una encuesta para investigar antecedentes de teniosis y padecimientos neurológicos compatibles con NCC. Además, se realizó la determinación de anticuerpos anti-cisticerco en suero por ELISA y análisis coproparasitoscópicos (CPS) para la búsqueda de huevos de tenia así como búsqueda de cisticercos en cerdos por palpación de lengua. Los resultados mostraron una seropositividad del 3.4%, observándose que en las familias donde había una persona seropositiva había un portador de tenia o alguien con sintomatología sugerente de NCC (Sarti *et al.*, 1988). Este fue el primer estudio donde se demostró que la transmisión de la teniosis-cisticercosis se da en conglomerados, esto es, que para estar en riesgo de adquirir cisticercosis se requiere del contacto cercano con una persona infectada con el parásito adulto. Esto fue muy importante ya que, si bien no se descarta la contaminación indirecta por consumo de aguas y alimentos contaminados con huevos de tenia, ésta puede contribuir a la infección, sin ser la causa principal. Dicha información ha tenido utilidad en la propuesta de estrategias de control. Otros estudios han confirmado estas primeras observaciones. En "El Salado" Sinaloa, se determinó la presencia de huevos de *Taenia* sp por CPS de Faust y la presencia de anticuerpos por ELISA, encontrándose huevos en el 3.3% de las muestras procesadas y seropositividad del 11%. En este estudio también se encontró que convivir con un individuo con teniosis representa un riesgo para tener anticuerpos en suero (Díaz-Camacho *et al.*, 1990). En La Curva, Navolato, Sinaloa, los resultados fueron similares, ya que la prevalencia de huevos de *Taenia* sp fue del 1.2% y la de anticuerpos por ELISA del 11%; cabe destacar que esta última cifra fue de 28% entre los convivientes de un individuo con teniosis (Díaz-Camacho *et al.*, 1991). Otro estudio de detección de anticuerpos por IET en 1005 muestras de sueros humanos, realizado en Angahuan, Michoacán, reveló una seroprevalencia de 4.9% y se observó que esta se ve incrementada con la edad y un pico en el grupo de entre 46 y 55 años (Sarti *et al.*, 1994). De lo

anterior se concluye que existen factores ambientales y de comportamiento humano que favorecen la transmisión de la cisticercosis. En la actualidad existen diversos trabajos en su mayoría realizados en comunidades rurales de México y otras partes de América Latina que confirman los hallazgos de los primeros estudios (García *et al.*, 1991; García-Noval *et al.*, 1996; Sarti *et al.*, 1988, 1992, 1994; Schantz *et al.*, 1992, 1994). Por ende, la transmisión de *T. solium* es un fenómeno que requiere contacto estrecho entre el hospedero definitivo y el intermediario. Cuando se comparan estos resultados con los datos oficiales, un aspecto importante que se observa, es que aparentemente la prevalencia de la cisticercosis y la teniosis están subestimadas, pues las prevalencias encontradas en estas comunidades siempre han resultado ser mucho mayores. Estos resultados han confirmado que los malos hábitos de higiene y las malas condiciones de vida favorecen la transmisión de la cisticercosis entre la población.

Sólo en una ocasión se ha evaluado el potencial del ELISA y la IET en el nivel de población abierta para la identificación de casos de NCC en el cual a los individuos seropositivos se les realizó una tomografía computarizada (TC) y se encontró que el valor predictivo positivo (VPP) del ELISA o la IET con GPs, fue menor al 30% cuando se tomaron en cuenta las lesiones compatibles con cisticercosis cerebral como "prueba de oro" (Schantz *et al.*, 1994). Si se desea identificar casos de cisticercosis este valor predictivo es bajo. Se puede concluir entonces que una prevalencia alta de anticuerpos en una comunidad dada indica que existe transmisión.

Epidemiología de la teniosis

En 1994 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que en el mundo había cerca de 50 millones de personas infectadas con *Taenia sp.* y que 50 000 habrían muerto a consecuencia de la neurocisticercosis provocada por *T. solium*. Un estudio realizado por García-Noval y col. (1996) en las comunidades de Quesada y el Jocote Guatemala, arrojó una seroprevalencia de 10 y 17% respectivamente en anticuerpos detectados por inmunoblot utilizando GPs del metacéstodo de *T. solium* y una prevalencia de teniosis de 1 y 2.8% respectivamente y la mayoría de los casos fueron debidos a *T. solium*. Con base en antecedentes de expulsión de proglótidos, en 1986 Colombia reportó 8.3 % de teniosis por *Taenia sp.* En contraste, Costa Rica de 1978 a 1987 fue el país que

reportó las tasas más bajas con frecuencias de 0.02 a 0.09 %. México por su parte presentó frecuencias intermedias de 0.2 a 1.1 % en el periodo de 1970 a 1971, de 1% en 1984, 3.4% para 1989 y una prevalencia de 1.1% para *T. solium* en el último año. Sin embargo las cifras anteriores fueron obtenidas de publicaciones científicas y no representan la realidad de cada país, pero dan una idea de lo que ocurre en Latinoamérica. La notificación oficial de la teniosis en México de 1986 a 1990 fue de alrededor de 13000 casos por año y para 1991 disminuyó a 8000 (anuarios de la Dirección General Adjunta de Epidemiología).

Los estudios epidemiológicos demuestran que *T. solium* se presenta en todas las edades, contrario a los reportes oficiales, en los que la frecuencia de *Taenia sp.* en 1994 fue más alta en los grupos de 5 a 14 años (35.3%) seguido del grupo de 1 a 4 años de edad y posteriormente el de los mayores de 15 años. Por otro lado con respecto al género, la estadística oficial no reporta diferencias, pero un estudio epidemiológico sugiere que el sexo femenino es más susceptible a este parásito (Sarti 1997). Aunque los datos oficiales indican que hay una disminución de la teniosis en México, no reflejan necesariamente la situación del país, ya que estos datos son tomados del sistema de vigilancia epidemiológica y representa solo a la población que asiste a los centros de atención, la cual es de alrededor del 50% de la población.

En otras regiones del mundo se han encontrado valores de prevalencia de teniosis que van de 0.72 a 5.0%, siendo más frecuente *T. solium* en América y menos en otras regiones como Indonesia (Allan *et al.*, 1997; Díaz *et al.*, 1992; García-Noval *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2002; Rodríguez Canul *et al.*, 1999; Sutisna *et al.*, 1999).

Modelos experimentales de teniosis

Varios mamíferos y roedores han sido utilizados como modelos experimentales para el desarrollo de la forma adulta de *T. solium*: cobayos, conejos, perros, gatos, cerdos, monos (*Maccacus rhesus*) ratones, ratas albinas, entre otros. Sin embargo, los mejores resultados se han obtenido en el gibón (*Hylobates lar*) (Cardigan *et al.*, 1967), en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (Allan *et al.*, 1991; Gnezdilov, 1957; Verster, 1971) en el jerbo y en la chinchilla (Maravilla *et al.*, 1998). El modelo experimental se puede desarrollar en hámsteres y gerbos inmunosuprimidos, sin embargo

en estos modelos la tenia tiene un desarrollo incompleto. Hasta el momento solo la chinchilla ha demostrado ser el modelo adecuado, ya que en ella se han obtenido gusanos con proglótidos grávidos y los huevos de estos proglótidos han producido la cisticercosis en un cerdo. Lo anterior confirma la reproducibilidad del ciclo de vida en un modelo experimental. Gracias a estos modelos experimentales la posibilidad de recuperación de huevos de *T. solium* incrementará en lo futuro la investigación en diversas áreas como la relación que guarda el hospedero con este parásito, mecanismos de evasión inmune y la producción de vacunas, entre otras (Maravilla *et al.* 1998).

Aspectos clínicos de la cisticercosis

El daño que produce el cisticerco en el ser humano cuando se establece en el SNC es variable ya que entre el 40 y el 80% de los casos de NCC humana son asintomáticos y sólo pueden ser identificados durante la necropsia (Macías y Hernández-Peniche, 1966; Rabiela-Cervantes; 1989).

Entre los casos sintomáticos hay una enorme heterogeneidad en las manifestaciones clínicas como pueden ser crisis convulsivas, perturbaciones sensoriales o motoras leves, cefalea o cuadro de hipertensión endocraneana, debido a la obstrucción de la circulación de LCR, lo que en ocasiones puede provocar la muerte (Flisser, Madrazo y Delgado, 1997).

El metacéstodo de *T. solium* puede alojarse en diferentes órganos y tejidos del cuerpo, sin embargo, la cisticercosis ocular ocasiona graves trastornos siguiéndole en importancia a la cerebral o neurocisticercosis (Cárdenas, 1992).

En contraste con la cisticercosis humana, la porcina ha sido objeto de escasas descripciones clínicas, debido a que no provoca alteraciones o si las hay, son muy leves, a pesar de que esta parasitosis se presenta en el cerdo frecuentemente de forma masiva afectando también el SNC (González *et al.*, 1987).

Hace algunas décadas la única opción de tratamiento de la neurocisticercosis humana era la quirúrgica, que a menudo era sólo un paliativo y pocas veces se lograba la extracción del cisticerco (Escobedo, 1988). Actualmente, el tratamiento está condicionado al diagnóstico preciso del tipo de cisticercosis tomando en cuenta los siguientes aspectos: variabilidad que presenta el parásito,

cuadro clínico, las diferentes etapas biológicas en la historia natural de la enfermedad y los cuadros patológicos secundarios.

Existen dos medicamentos con efecto cestocida: prazicuantel y albendazol (Sotelo *et al.*, 1989). El uso de estas drogas ha sido de gran ayuda, sobre todo en casos con cisticercosis parenquimatosa y subaracnoidea. Sin embargo, existe una polémica importante entre los clínicos, ya que una escuela opina que el tratamiento es de gran ayuda para los pacientes pues evita que las lesiones se calcifiquen y, por ende, se evita que se generen crisis convulsivas (Vázquez y Sotelo, 1992). Mientras que algunos autores refieren que los pacientes deben ser vigilados pero no tratados, ya que hay casos en los que se ha observado la desaparición espontánea de las lesiones, y aseguran que el tratamiento acelera una reacción inflamatoria severa, que es más benigna si se deja que ocurra de manera natural (Miller *et al.*, 1983).

Aspectos clínicos de la teniosis

La teniosis por lo general sigue un curso benigno y a menudo asintomático. Cuando se presentan síntomas estos pueden ser leves o moderados y el paciente afectado que no acude al médico, por lo que puede mantener la enfermedad por periodos prolongados. La principal manifestación clínica es la eliminación frecuente de proglótidos de forma espontáneamente o con las heces. En un estudio de 3,110 pacientes con teniosis, el 35% revelaron tener dolor abdominal, el 34% náusea, el 25% debilidad, el 21% pérdida de peso, el 17% incremento del apetito, el 15% cefalea, el 9% constipación, el 8% vértigo, el 6% diarrea y el 4% prurito anal (Flisser A, 1995).

Uno de los primeros remedios utilizados como vermífugo, fueron las semillas de calabaza en el tratamiento de la teniosis, también se han utilizado diversos compuestos como la paromicina, los derivados de acridina como la quinacrina, diclorofen, entre otros (Pawlowski, Schultz; 1972) El tratamiento farmacológico ya sea para *T. solium* o *T. saginata* es el mismo y los fármacos más utilizados hoy en día son el albendazol, el prazicuantel y la niclosamida (Harnet, 1988; Jagota *et al.*, 1986; Perera *et al.*, 1970).

Diagnóstico de la cisticercosis

En la neurocisticercosis, la inaccesibilidad de los cisticercos es el principal obstáculo para su diagnóstico. Desde hace varios años, se cuenta con la tomografía computada para el diagnóstico de la cisticercosis (Rodríguez-Carbajal y Boleaga-Durán, 1982). Este método revolucionó el diagnóstico de la neurocisticercosis pues permitió identificar casos quísticos sin necesidad de intervenir quirúrgicamente al paciente y mostró ser muy sensible en casos de localización subaracnoidea y parenquimatosa, ya que los pacientes con cisticercosis quística en los ventrículos pueden ser diagnosticados por este método. En ocasiones esta técnica permite observar al escólex del parásito. La resonancia magnética (RM) (Ramos *et al.*, 1986) tiene una mejor resolución con lo que se puede localizar una lesión y determinar su etiología con alta precisión. Desgraciadamente, estos dos métodos son inaccesibles para algunos sectores de la población debido a su alto costo, incluso para su uso en estudios epidemiológicos.

Desde hace varias décadas se han estandarizado métodos inmunológicos para la determinación de anticuerpos en LCR o suero de pacientes (Diwan *et al.*, 1982; Espinoza *et al.*, 1986; Flisser *et al.*, 1980; Nieto, 1948; Sotelo, 1987). A partir de entonces se han desarrollado múltiples pruebas inmunológicas para determinar la presencia de anticuerpos (Flisser y Larralde, 1986. Flisser, Madrazo y Delgado, 1997). Algunas pruebas ya se utilizan como métodos de rutina para el apoyo del diagnóstico clínico. En general, se considera que la presencia de anticuerpos en el LCR confirma el diagnóstico de pacientes con síntomas o imágenes de TC o de RM compatibles con NCC (Del Bruto *et al.*, 2001). La mayoría de las pruebas inmunológicas que se realizan, utilizan un extracto crudo de los metacéstodos obtenidos de carne de cerdo infectada, pero se ha encontrado reacción cruzada con otros parásitos (Espinoza *et al.*, 1986; Larralde *et al.*, 1989; Vaz *et al.*, 1997). También se han usado algunas fracciones puras o enriquecidas que disminuyen las reacciones cruzadas con otros parásitos, como es el caso de Tsang y col (1989) quienes estandarizaron la IET que utiliza glicoproteínas (GP) purificadas del metacéstodo, siete de las cuales son específicas para el diagnóstico de cisticercosis. Una ventaja especial de este método es que es más sensible en suero que en LCR, además este método se ha probado con muestras de saliva con bastante éxito (Feldman *et al.*, 1990). La IET-GPs ha sido reproducida por diferentes grupos, que lo han

valorado en poblaciones y en condiciones distintas con valores de sensibilidad y especificidad altos. Además, esta prueba se puede utilizar para el diagnóstico de cisticercosis en cerdos vivos; en este sentido es interesante el hallazgo de la presencia de anticuerpos IgM contra bandas de alto peso molecular en la fase aguda de la infección experimental (Tsang *et al.*, 1991). La desventaja principal de la IET es que su costo es elevado y requiere de equipo de laboratorio especial, además de la obtención de las GPs, lo que es laborioso y requiere pericia en el trabajo de laboratorio, su costo es elevado y su uso restringido. Una alternativa es el uso del extracto crudo buscando bandas específicas (Larralde *et al.*, 1989; Vaz *et al.* 1997) disminuiría los costos del diagnóstico respecto de la prueba que usa las GPs. Interesante es el hallazgo de que la GP24 del método de Tsang y col. (1989) reacciona con anticuerpos purificados con la banda de 26 kDa del EC y viceversa (Rodríguez-Canul *et al.*, 1997). Por su parte Plancarte y col. (1999) encontraron que la GP10 y la GP24 son la misma. Cabe señalar que existe controversia respecto a la utilidad de las pruebas basadas en la determinación de anticuerpos en grupos de pacientes neurológicos, pues mientras Ramos-Kuri y col. (1992) encontraron un valor predictivo positivo (vpp) bajo, Proaño-Narvaez y col. (2002) recientemente reportaron un vpp tanto para ELISA como para IET-GP.

Se han probado varios métodos de diagnóstico inmunológico en cerdos, pero solo la IET con GPs funciona (Cheng *et al.*, 1991; Pathak *et al.*, 1994; Rhoads *et al.* 1987, Tsang *et al.*, 1991). Un estudio hecho en Perú con IET mostró una sensibilidad cercana al 100% en animales infectados de manera natural, así mismo en infecciones experimentales se observó la aparición de anticuerpos IgG contra bandas diagnósticas 4 semanas después de la infección y una respuesta específica de anticuerpos IgM hacia una proteína de 90 kDa a los 14 días de infección. Este último hallazgo podría emplearse en el diagnóstico temprano de cisticercosis en cerdos (Tsang *et al.*, 1991).

La búsqueda de antígenos de cisticerco para diagnóstico en seres humanos inició con la prueba de aglutinación de partículas de látex sensibilizadas con un suero hiperinmune de conejo anti-EC para LCR donde se obtiene un 97% de especificidad y un 77% de sensibilidad, la cual aumentó al 88% después del tratamiento antiparasitario con prazicuantel (Velazco *et al.*, 1983). Este aumento en la sensibilidad posiblemente se deba a la liberación de antígenos a la muerte y posterior lisis del parásito. Se han desarrollado ELISA y Dot-ELISA para la determinación de antígenos, en los que

se detectan los antígenos con un anticuerpo policlonal de conejo anti-EC. La sensibilidad en este caso varía entre un 59 y un 75% (Estrada y Kuhn, 1985; Tellez-Girón *et al.*, 1987). A partir de estos trabajos pioneros han surgido algunos otros con este mismo objetivo: demostrar la presencia de antígenos en el LCR de pacientes con cisticercosis. Se han probado sistemas con anticuerpos monoclonales o policlonales, y métodos más modernos de separación de proteínas, como el HPLC y las sensibilidades observadas oscilan entre 11 y 93%, dependiendo del sistema empleado (Correa, 1998). También se ha propuesto que este tipo de diagnóstico es útil para el seguimiento del tratamiento médico (Yonghao *et al.*, 1995). En estos trabajos se han buscado antígenos principalmente en el LCR y antígenos en el suero de un grupo de pacientes con epilepsia y sus familiares en Burundi, África (Newell *et al.*, 1997), pero no se encontró asociación entre los seroantígenos y las crisis convulsivas.

Los estudios en animales han puesto de manifiesto que es posible detectar antígenos y que éstos son buenos indicadores de infección activa, pues aparecen en circulación alrededor de las 2 semanas después de la infección, en el caso de conejos con *Taenia pisiformis* (Craig, 1984), o 10 semanas en el caso de bovinos con *T. saginata* (Brandt *et al.*, 1992; Harrison *et al.*, 1989). Además, los antígenos desaparecen muy pronto después del tratamiento antiparasitario, mientras que los anticuerpos persisten en ausencia de parásitos vivos durante varias semanas. En los estudios citados también se ha demostrado la presencia de complejos inmunes que aparecen con los anticuerpos, usualmente una o dos semanas después de aparecer los antígenos. En estudios independientes se ha demostrado la presencia de antígenos por medio de uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos contra *T. saginata* en el suero de cerdos infectados naturalmente (Brandt *et al.*, 1992; Rodríguez-del-Rosal *et al.*, 1989).

Se sabe poco del mosaico antigénico presente en los fluidos de los animales o los seres humanos con esta infección, y nada acerca de la relación entre el número de parásitos o su localización y la presencia de antígenos. Los estudios que existen al respecto indican que en el LCR de pacientes hay dos antígenos, uno de 190 y otro 230 kDa, que también están presentes en el fluido vesicular del metacéstodo de *T. solium* (Estrada, Almon-Estrada y Kuhn, 1989).

Diagnóstico de teniosis

La forma común del diagnóstico de teniosis es a través de la detección al microscopio de huevos utilizando métodos CPS de flotación como el de Faust, de sedimentación como el de Ritchie o el de frotis grueso de Kato-Katz, entre otros. Estas técnicas presentan baja sensibilidad ya que detectan menos de la mitad de los casos cuando se analiza solo una muestra de heces, por lo que diversos autores sugieren una serie de tres para incrementar este valor. Otro método es el de la impresión anal o de Graham; sin embargo, la presencia de huevos solo indica una infección por parásitos de este género y no permite determinar la especie, ya que los huevos de *T. solium* y *T. saginata* son morfológicamente iguales, por lo que el resultado debe reportarse solo como positivo a teniosis (Faust *et al.*, 1938; Ritchie, 1948; Thornton y Goldsmith, 1973).

Por coproparasitoscopia no siempre es posible detectar los huevos presentes en la materia fecal; lo anterior puede deberse a que los proglótidos y huevos no son liberados de forma constante o por fallas en el método de diagnóstico, además de que se debe evitar confundir los huevos de tenia con polen y esporas, que dificultan el diagnóstico. El diagnóstico de *T. solium* se puede hacer por observación de proglótidos liberados espontáneamente o preferentemente después de un tamizado de las heces como consecuencia del tratamiento farmacológico (Richards y Schantz, 1991). La determinación de especie se realiza contando el número de ramas uterinas en los proglótidos grávidos, de 7-13 para *T. solium* y de 15-20 para *T. saginata*. Otro criterio a seguir, es la presencia de 4 ventosas y una doble corona de ganchos en el escólex para *T. solium* y de solo 4 ventosas para *T. saginata* (Elsdon-Dew y Proctor, 1965).

En la determinación de coproantígenos de *T. solium*, Allan y col. (1993), han desarrollado un inmunopunto en tiras reactivas, basado en su prueba de ELISA anti-*T. solium* (Allan *et al.*, 1992), este método de diagnóstico utiliza anticuerpos policlonales anti-adulto de *T. solium* y vino a mejorar el diagnóstico con una sensibilidad del 88.6%, sin embargo su alta especificidad (99.9%) solo es en cuanto a género, ya que no puede distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*.

El uso de técnicas de biología molecular para evaluar muestras de heces, como la hibridación con sondas de DNA especie-específicas y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son

alternativas a futuro para el diagnóstico de la teniosis. (Chapman *et al.*, 1995; González L.M. *et al.*, 2000; Mayta *et al.*, 2000).

Por otra parte, se han utilizado antígenos de excreción-secreción del adulto de *T. solium* mantenida *in vitro*, en IET para la identificación de anticuerpos específicos presentes en sueros de individuos confirmados para teniosis con un 95% de sensibilidad y un 100% de especificidad, además de no reaccionar con sueros de individuos con cisticercosis (Wilkins *et al.*, 1999)

Anticuerpos monoclonales y el diagnóstico

La utilidad de los anticuerpos policlonales está limitada por las reacciones cruzadas. Si las inmunizaciones se realizan con antígenos complejos, que comparten algunos de sus determinantes con otras moléculas similares, entonces siempre existe la posibilidad de que una fracción de los anticuerpos en la preparación reaccione con otras moléculas. Para muchas aplicaciones de laboratorio, como el diagnóstico o la clasificación de microorganismos relacionados, los anticuerpos policlonales producidos no son útiles, debido a las reacciones cruzadas. Aunque es posible reducir las reacciones cruzadas eliminando los anticuerpos no deseados mediante procedimientos de adsorción con el antígeno homólogo, el título de anticuerpos útiles se reduce sensiblemente. Un reactivo ideal para el diagnóstico, es aquel conformado por una preparación estable y reproducible de anticuerpos uniformes, con especificidad, afinidad e isotipo predeterminado. Esta preparación tendría como base las inmunoglobulinas producidas por una única clona de células B y se denominan anticuerpos monoclonales.

La tecnología de los anticuerpos monoclonales (AcMo) se inició con los trabajos de Kohler y Milstein (1975), quienes fueron los primeros en obtener hibridomas murinos productores de anticuerpos de reconocimiento específico de eritrocitos de carnero. La mayoría de los AcMo se han generado en ratón, debido a las grandes ventajas que presenta este modelo, como la excelente respuesta que se genera con la mayoría de los antígenos y el buen crecimiento que presentan las células en cultivo. La producción de los AcMo se logra gracias a la fusión de dos tipos celulares que tienen características muy especiales y mediante el empleo de un desestabilizante de

membrana como es el polietilenglicol. El linfocito B de ratón tiene como característica principal el producir anticuerpos específicos, a su vez el mieloma tiene las siguientes características: a) se divide indefinidamente como toda célula cancerosa y b) presenta dos mutaciones genéticas que lo hacen carente de las enzimas hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK). La carencia de estas enzimas incapacitan a las células para utilizar la ruta alterna de síntesis nucleótidos para el DNA (Potter, 1972), de tal forma, que al agregar a la fusión celular un bloqueador de la síntesis normal de nucleótidos, como es la aminopterina presente en el medio de cultivo con HAT, solamente podrán sobrevivir aquellos híbridos (linfocito B/mieloma) que puedan producir las enzimas HGPRT y TK aportadas por la célula B, pudiendo así sintetizar su DNA *de novo* a partir de las bases púricas y pirimídicas presentes en el medio de cultivo (Goding, 1996).

Una vez efectuada la fusión y la selección bioquímica con medio HAT, los sobrenadantes de cultivo de todos los pozos de cultivo con proliferación celular, se someten a pruebas para determinar si producen el anticuerpo deseado. Si el resultado es positivo, los cultivos son clonados por dilución limitante, es decir; se siembra el hibridoma en una placa de cultivo de 96 pozos de modo que sólo se deposite una célula por pozo, para que de esta forma se obtengan hibridomas capaces de proliferar en cultivo, que produzcan AcMo específicos y homogéneos y que puedan proliferar en animales genéticamente compatibles (Horibata, 1970). Ya que cada AcMo reconoce un único determinante antigénico, es posible seleccionar aquel que identifica exclusivamente la molécula de interés, evitando las reacciones cruzadas que son características de muchos antiseros policlonales. De esta forma, las reacciones cruzadas inesperadas se deberán exclusivamente a la presencia de epítomos (determinantes antigénicos) idénticos o muy similares (Milstein *et al.*, 1984).

Los AcMo se han empleado para la purificación e identificación de antígenos, moléculas de superficie celular, grupos sanguíneos, detección de hormonas, toxinas, sustancias mutagénicas y drogas en la circulación, así como para el estudio de la respuesta inmune, detección de agentes patógenos, en el diagnóstico de enfermedades vasculares, auto-inmunes y tumorales, etc. Actualmente la tecnología de los AcMo ha cobrado gran importancia, ya que se ha desarrollado biotecnología de vanguardia mediante el uso de la biología molecular con el fin de aplicar dichas moléculas en la clínica y sobre todo en el diagnóstico. En la terapéutica su valor ha sido probado

como herramienta en el control de rechazo de trasplantes como es el caso del anti-CD3 que evita una reacción agresiva entre el donante y el receptor. Los anticuerpos monoclonales constituyen el grupo de moléculas derivadas de la biotecnología con mayor número de ensayos clínicos. Los anticuerpos y sus fragmentos, se han modificado genéticamente para ser evaluados en la profilaxis, la terapia y el control de enfermedades alérgicas y auto-inmunes (Gavilondo, 1994).

JUSTIFICACIÓN

Gran parte de los trabajos de investigación involucrados en el binomio teniosis-cisticercosis, se abocan al desarrollo de técnicas de diagnóstico de cisticercosis, lo cual es comprensible ya que esta parte del binomio es la que más afecta al ser humano, debido a las secuelas que puede dejar, principalmente tratándose de neurocisticercosis. Sin embargo, no debemos olvidar que los individuos parasitados con el adulto de *T. solium* son los agentes dispersores de la cisticercosis, por ende si se lograra interrumpir el ciclo en este punto se tendría ganado gran parte del camino para erradicar o por lo menos controlar la cisticercosis. Por lo anterior, es necesario dedicar más esfuerzos al desarrollo de técnicas de diagnóstico de la teniosis. En este contexto, se han desarrollado técnicas de biología molecular para el diagnóstico de *T. solium* (Chapman *et al.*, 1995; González LM *et al.*, 2000; Mayta *et al.*, 2000), que si bien logran su objetivo, tienen cierto grado de sofisticación que no les permite ser accesibles en lugares con poca infraestructura, por lo cual es necesario crear técnicas de fácil aplicación para ser llevadas al campo o a los laboratorios que cuentan con poca infraestructura. Una alternativa en el diagnóstico de *T. solium* es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. Con estos anticuerpos se podrían detectar antígenos en suero o en muestras de heces mediante inmunotécnicas sencillas como el inmunopunto o tiras reactivas. En este trabajo se pretendió producir un anticuerpo monoclonal que reuniera las características necesarias para ser utilizado en el diagnóstico sencillo de teniosis por *T. solium*.

HIPÓTESIS

Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente el gusano adulto de *Taenia solium*, se podrá elaborar un método de diagnóstico de este parásito.

OBJETIVOS

- I.- Producir un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente el gusano adulto de *Taenia solium*.
- II.- Caracterizar inmunoquímicamente los anticuerpos monoclonales producidos.

JUSTIFICACIÓN

Gran parte de los trabajos de investigación involucrados en el binomio teniosis-cisticercosis, se abocan al desarrollo de técnicas de diagnóstico de cisticercosis, lo cual es comprensible ya que esta parte del binomio es la que más afecta al ser humano, debido a las secuelas que puede dejar, principalmente tratándose de neurocisticercosis. Sin embargo, no debemos olvidar que los individuos parasitados con el adulto de *T. solium* son los agentes dispersores de la cisticercosis, por ende si se lograra interrumpir el ciclo en este punto se tendría ganado gran parte del camino para erradicar o por lo menos controlar la cisticercosis. Por lo anterior, es necesario dedicar más esfuerzos al desarrollo de técnicas de diagnóstico de la teniosis. En este contexto, se han desarrollado técnicas de biología molecular para el diagnóstico de *T. solium* (Chapman *et al.*, 1995; González LM *et al.*, 2000; Mayta *et al.*, 2000), que si bien logran su objetivo, tienen cierto grado de sofisticación que no les permite ser accesibles en lugares con poca infraestructura, por lo cual es necesario crear técnicas de fácil aplicación para ser llevadas al campo o a los laboratorios que cuentan con poca infraestructura. Una alternativa en el diagnóstico de *T. solium* es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. Con estos anticuerpos se podrían detectar antígenos en suero o en muestras de heces mediante inmunotécnicas sencillas como el inmunopunto o tiras reactivas. En este trabajo se pretendió producir un anticuerpo monoclonal que reuniera las características necesarias para ser utilizado en el diagnóstico sencillo de teniosis por *T. solium*.

HIPÓTESIS

Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente el gusano adulto de *Taenia solium*, se podrá elaborar un método de diagnóstico de este parásito.

OBJETIVOS

- I.- Producir un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente el gusano adulto de *Taenia solium*.
- II.- Caracterizar inmunoquímicamente los anticuerpos monoclonales producidos.

JUSTIFICACIÓN

Gran parte de los trabajos de investigación involucrados en el binomio teniosis-cisticercosis, se abocan al desarrollo de técnicas de diagnóstico de cisticercosis, lo cual es comprensible ya que esta parte del binomio es la que más afecta al ser humano, debido a las secuelas que puede dejar, principalmente tratándose de neurocisticercosis. Sin embargo, no debemos olvidar que los individuos parasitados con el adulto de *T. solium* son los agentes dispersores de la cisticercosis, por ende si se lograra interrumpir el ciclo en este punto se tendría ganado gran parte del camino para erradicar o por lo menos controlar la cisticercosis. Por lo anterior, es necesario dedicar más esfuerzos al desarrollo de técnicas de diagnóstico de la teniosis. En este contexto, se han desarrollado técnicas de biología molecular para el diagnóstico de *T. solium* (Chapman *et al.*, 1995; González LM *et al.*, 2000; Mayta *et al.*, 2000), que si bien logran su objetivo, tienen cierto grado de sofisticación que no les permite ser accesibles en lugares con poca infraestructura, por lo cual es necesario crear técnicas de fácil aplicación para ser llevadas al campo o a los laboratorios que cuentan con poca infraestructura. Una alternativa en el diagnóstico de *T. solium* es el uso de anticuerpos monoclonales específicos. Con estos anticuerpos se podrían detectar antígenos en suero o en muestras de heces mediante inmunotécnicas sencillas como el inmunopunto o tiras reactivas. En este trabajo se pretendió producir un anticuerpo monoclonal que reuniera las características necesarias para ser utilizado en el diagnóstico sencillo de teniosis por *T. solium*.

HIPÓTESIS

Utilizando un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente el gusano adulto de *Taenia solium*, se podrá elaborar un método de diagnóstico de este parásito.

OBJETIVOS

- I.- Producir un anticuerpo monoclonal que reconozca específicamente el gusano adulto de *Taenia solium*.
- II.- Caracterizar inmunoquímicamente los anticuerpos monoclonales producidos.

III.- Localizar e identificar histológicamente el antígeno reconocido en el adulto y el metacéstodo de *Taenia solium*, así como en el adulto de *Taenia saginata* que es el parásito más cercano filogenéticamente.

III.- Elaborar un método de diagnóstico del gusano adulto de *Taenia solium* utilizando el anticuerpo monoclonal específico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación del parásito adulto de Taenia solium y Taenia saginata.

Dos ejemplares adultos obtenidos de ser humano, uno de *T. solium* y otro de *T. saginata* fueron observados al microscopio de luz para identificar sus estructuras específicas. Del ejemplar de *T. solium*, se pudo identificar un rostelo con cuatro ventosas, armado con una doble corona de ganchos, la presencia de entre 7 y 13 ramas uterinas y poro genital lateral alternado por proglótido. El ejemplar de *T. saginata* se escogió debido a que este es el parásito más estrechamente relacionado con *T. solium* y a diferencia de esta última se pudieron distinguir las diferencias que la caracterizan tales como: un rostelo con cuatro ventosas pero sin corona de ganchos, un número mayor de ramas uterinas y poro genital localizado del mismo lado en todos los proglótidos, además de una talla mayor. Con la finalidad de confirmar la especie, se procedió a la identificación molecular del adulto de *T. solium* y *T. saginata* por hibridación del DNA con la sonda pTsol-9 específica de *T. solium* (Chapman *et al.*, 1995). El proceso de identificación molecular de *T. solium* fue realizado por la química Rosalba Trejo en el laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Biotecnología del INDRÉ, dirigido por la M. en C. América Mandujano Martínez.

Obtención de Antígenos

Con el gusano adulto de *T. solium* plenamente identificado se obtuvo un antígeno somático (ASTsol) que se utilizó en la inmunización de ratones y en los ensayos de captura de anticuerpos. Para la preparación del ASTsol, el ejemplar adulto fue lavado previamente en tres ocasiones con

III.- Localizar e identificar histológicamente el antígeno reconocido en el adulto y el metacéstodo de *Taenia solium*, así como en el adulto de *Taenia saginata* que es el parásito más cercano filogenéticamente.

III.- Elaborar un método de diagnóstico del gusano adulto de *Taenia solium* utilizando el anticuerpo monoclonal específico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación del parásito adulto de Taenia solium y Taenia saginata.

Dos ejemplares adultos obtenidos de ser humano, uno de *T. solium* y otro de *T. saginata* fueron observados al microscopio de luz para identificar sus estructuras específicas. Del ejemplar de *T. solium*, se pudo identificar un rostelo con cuatro ventosas, armado con una doble corona de ganchos, la presencia de entre 7 y 13 ramas uterinas y poro genital lateral alternado por proglótido. El ejemplar de *T. saginata* se escogió debido a que este es el parásito más estrechamente relacionado con *T. solium* y a diferencia de esta última se pudieron distinguir las diferencias que la caracterizan tales como: un rostelo con cuatro ventosas pero sin corona de ganchos, un número mayor de ramas uterinas y poro genital localizado del mismo lado en todos los proglótidos, además de una talla mayor. Con la finalidad de confirmar la especie, se procedió a la identificación molecular del adulto de *T. solium* y *T. saginata* por hibridación del DNA con la sonda pTsol-9 específica de *T. solium* (Chapman *et al.*, 1995). El proceso de identificación molecular de *T. solium* fue realizado por la química Rosalba Trejo en el laboratorio de Ingeniería Genética del Departamento de Biotecnología del INDRÉ, dirigido por la M. en C. América Mandujano Martínez.

Obtención de Antígenos

Con el gusano adulto de *T. solium* plenamente identificado se obtuvo un antígeno somático (ASTsol) que se utilizó en la inmunización de ratones y en los ensayos de captura de anticuerpos. Para la preparación del ASTsol, el ejemplar adulto fue lavado previamente en tres ocasiones con

PBS (sol 2), esterilizado por filtración con membrana de nitrocelulosa con poro de 0.2 μm (MILLIPORE). Posteriormente, el gusano se maceró en un mortero previamente congelado a -70°C y en presencia de inhibidores enzimáticos: p-hidroximercuribenzoato al 0.04% (PHMB), naptosil-clorometil-cetona 1mg/mL, L-1-tosilamida-2-2-feniletilclorometil cetona 1mg/mL, EDTA 5 mM, leupeptina, 4 $\mu\text{g/mL}$, la concentración de los inhibidores esta en función del volumen final (Espinoza 1986 modificado). Posteriormente la mezcla se sonicó tres veces a 7 Hz por 5 minutos con descansos de 1 minuto. Una vez sonicada, la mezcla se centrifugó 1 hora a 200,000 g y 4°C . Se recuperó la fracción soluble con las proteínas y se le determinó la concentración de proteínas por la técnica de Bradford, (1976) mediante un microensayo comercial (BIO-RAD, Protein Assay). Por último, el antígeno se fraccionó y almacenó a -20°C .

En los ensayos de reacción cruzada se utilizaron diversos antígenos, de los cuales, las bacterias, el gusano adulto de *T. solium*, el cisticerco de *T. solium* (ASCist) y el gusano adulto de *T. saginata* (ASTsag) se procesaron de la misma forma como se indicó anteriormente. Las especies utilizadas fueron las siguientes:

Bacteria - *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella spp*
Proteus mirabilis, *Aeromona sp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio cholerae* Ogawa, *V. cholerae* Inaba.

Protozoa.- *Plasmodium vivax*, *Entamoeba histolítica*

Nematoda.- *Ascaris lumbricoides*, *A. suum*, *Trichinella spiralis*, *Toxocara canis*, *Onchocerca volvulus*, *Macracanthorhynchus hirudinaceus*

Trematoda.- *Fasciola hepatica*

Cestoda.- *Taenia solium* (cisticerco), *T. saginata*, *T. taeniaeformis* (cisticerco), *T. taeniaeformis* (adulto), *Echinococcus granulosus*.

Otros antígenos que se utilizaron para determinar las reacciones cruzadas fueron:

Antígeno B recombinante (rAgB), proteína que está presente en muchos helmintos y otros parásitos (Olivo *et al.*, 1988; Laclette *et al.*, 1991). Este antígeno fue donado amablemente por el

Dr. Juan Pedro Laclette del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Antígeno B nativo de cisticerco de *T. solium* (AgBCist), este antígeno se purifica aprovechando su afinidad a colágena (Laclette *et al.*, 1991) y fue donado amablemente por la M en C Ma. Edith Medina Escutia del Laboratorio de Producción de Anticuerpos Monoclonales, InDRE SSA.

Glicoproteínas de cisticerco de *Taenia solium* (GliCist), purificadas por afinidad a lentil-lectinas. Estas proteínas son reconocidas específicamente por los anticuerpos presentes en sueros de seres humanos y cerdos con cisticercosis (Tsang *et al.*, 1989 y 1991) y son usadas en el diagnóstico clínico específico de cisticercosis. Este antígeno fue donado amablemente por el QFI Antonio Meza Lucas, del laboratorio de Pruebas Rápidas del Departamento de Investigaciones Inmunológicas del InDRE SSA.

Fluido vesicular del cisticerco (FVCist). Este antígeno se obtuvo directamente por punción y succión con jeringa de insulina, del fluido vesicular del cisticerco recién extraído del cerdo infectado. Se determinó su concentración de proteínas, se fraccionó en volúmenes de 200 μ L y se congeló a -70°C .

La miosina de *T. solium* que junto con la actina son proteínas relacionadas con el sistema muscular del parásito, fue donada amablemente por el Dr. Javier Ambrosio del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Antígeno de excreción-secreción del adulto (ESTsol) y del cisticerco de *T. solium* (ESCist). Este antígeno se obtuvo a partir del sobrenadante de cultivo del parásito adulto de *T. solium* desarrollado en hamster y de su metacéstodo (el método se describe más adelante)..

Electroforesis en geles de acrilamida-SDS en gradiente de 5 al 22.5%.

Los antígenos procesados, fueron sometidos a electroforesis en un equipo Mini protean II (BIO RAD) en condiciones reductoras con 2-mercapto etanol al 1% y no reductoras, en geles de acrilamida-dodesil sulfato de sodio (SDS) con un gradiente de concentración de 5 a 22.5% y una corriente eléctrica de 150 Volts. La cantidad de antígeno utilizada por carril fue de 20 µg.

Inmunización de ratones.

Tres ratones hembra de la línea Balb/c de entre 6 y 8 semanas, fueron inmunizados por vía intraperitoneal (ip) con ASTsol (80 µg) mezclado 1:1 con adyuvante completo de Freund (SIGMA). Dos inmunizaciones ip más se realizaron con 60 µg de ASTsol mezclado 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (SIGMA) los días 21 y 35 después de la primera inmunización y posteriormente, a los 49, 63 y 77 días se administraron i.p 60 µg de ASTsol sin adyuvante. Por último, se dió un refuerzo diario de 50 µg de ASTsol durante los 3 días previos a la fusión por vía intramuscular. La producción y posterior aumento de anticuerpos anti-ASTsol, se siguió por ELISA de captura de anticuerpos con ASTsol como su antígeno homólogo. Dos de los tres ratones inmunizados murieron sin causa aparente durante el proceso de inmunización y solo sobrevivió el ratón denominado como Lo1, el cual por cierto presentó una mayor talla con respecto a los otros dos.

Mantenimiento de células de mieloma Ag8 e hibridomas.

Las células de mieloma X63-Ag8.653 se seleccionaron como pareja de fusión de las células esplénicas de ratón inmunizado. Esta línea celular tiene como característica importante la de no producir inmunoglobulinas ni fracciones de éstas y tienen su origen en ratones Balb/c, además de carecer de la enzima fosforribosil transferasa que interviene en la vía de síntesis alterna de DNA. Estas células se cultivaron en medio RPMI-1640 (sol. 4) adicionado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y una mezcla de 95% aire y 5% de CO₂. Cuando el cultivo estuvo confluyente y la proliferación celular fue máxima, las células se

resembraron en cajas nuevas o se conservaron en nitrógeno con solución crioprotectora (sol. 5) Este proceso se sigue también en el cultivo de las células de hibridoma (Gavilondo, 1994).

Obtención de células del bazo del ratón inmunizado y fusión celular

El ratón inmunizado se sacrificó por desnucamiento, se bañó con una solución de alcohol al 70% y se fijo con alfileres en posición dorso-ventral sobre una placa de unicel. Utilizando tijeras y pinzas, se hizo primero un pequeño corte transversal en la piel en la parte superior del después a lo largo de la línea media cuidando de no rasgar el peritoneo hasta la región de las ingles. Con un par de pinzas se descubrió el peritoneo y después se abrió este último con tijeras dejando al descubierto el bazo, el cual se extrajo con cuidado de no rasgarlo. Para separar las células del tejido del bazo, éste se colocó en una caja de Petri y se envolvió con la malla de organza estéril que previamente contenía la caja, se agregaron 10 mL medio RPMI-1640 (sol. 4) se maceró suavemente con el émbolo de una jeringa de plástico. El medio con las células se transfirió a un tubo cónico de 25 mL y se centrifugaron a 100 g durante 5 minutos, el botón de células se resuspendió en 5 mL de medio RPMI-1640 (sol. 4) y se contaron. Las células resultantes se mezclaron en 10 mL de RPMI-1640 (sol. 4) con las células de mieloma X63-Ag8.653 en proporción de 5 a 1 y se centrifugaron por 5 minutos a 100 g. La mezcla de células resultante se fusionó en presencia de polietilén glicol 1300-1600 (SIGMA) según la técnica descrita por Gavilondo (Gavilondo, 1994). Las células fusionadas se cultivaron en medio RPMI-1640 (sol. 4) adicionado con 20% de suero de bovino fetal (HyClone), adicionado con HAT 50X (SIGMA) como medio de crecimiento y selección bioquímica de los hibridomas. En placas de cultivo de 96 pozos se depositaron 100 μ L/pozo de la suspensión celular y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 95/5% de aire/CO₂ durante 10 días, al término de los cuales, el HAT fue sustituido por medio HT 50X (SIGMA) durante 7 días más, al cabo de los cuales se continuó con medio de cultivo normal o sin aditivos. Por último, los hibridomas productores de anticuerpos anti ASTsol, fueron seleccionados al reconocer en ELISA el antígeno homólogo y utilizando el sobrenadante de los hibridomas.

Clonación celular

Los hibridomas que resultaron positivos hacia ASTsol, fueron clonados por dilución limitante: A partir del pozo de cultivo original, se tomaron 50 μL de medio con células y se hicieron diluciones dobles seriadas a lo largo de la última línea de una placa de 96 pozos. Se seleccionó el pozo que tenía aproximadamente 30 células y se diluyó en 10 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (sol. 4) y se repartieron en los pozos restantes de la placa (100 μL /pozo). De esta forma se garantizó una alta frecuencia de pozos con una sola célula. Las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 (sol. 4) complementado con 20% de suero fetal de bovino (GIBCO) hasta que formaron clonas, las cuales fueron probadas nuevamente por ELISA para determinar su especificidad ante los antígenos de parásitos y bacterias entes indicados. Las clonas específicas resultantes se expandieron en botellas de 75 cm^3 para posteriormente congelarlas a -196°C hasta su uso

Congelación y descongelación de células

Las células se centrifugaron a 150 g durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en solución crioprotectora (sol. 5). Esta mezcla con aproximadamente 1×10^6 células/mL se colocó en criotubos de 2 mL y se congelaron a -70°C , durante toda la noche y al día siguiente se almacenaron a -196°C en tanques de nitrógeno líquido. Para la descongelación de las células, se sacaron los criotubos del tanque de nitrógeno líquido y se colocaron en baño María a 37°C . Inmediatamente después de descongelarse, la suspensión celular se agregó a 5 mL de medio RPMI 1640 (sol. 4), la mezcla se centrifugó durante 5 min a 150 g. El botón celular se resuspendió en medio RPMI-1640 (sol. 4) complementado con 20% de suero fetal y se colocó en la incubadora a 37°C y 95/5% de aire/ CO_2

Fortalecimiento celular por inducción de tumor ascítico.

Este procedimiento se realiza para fortalecer o revitalizar las células de mieloma que se van a utilizar en la fusión, además permite recuperar y limpiar de contaminación los hibridomas que se encuentren en malas condiciones. Las células se inocularon intraperitonealmente en ratones

Balb/c, los cuales son genéticamente compatibles con las células en cuestión. Previamente y para favorecer el implante, los ratones fueron inyectados con 0.5 mL de aceite mineral por vía intraperitoneal y después de cinco días, se inocularon por la misma vía con 5×10^6 células de mielomas o hibridomas resuspendidas en 0.5 mL de PBS (sol. 2) esterilizado por filtración. Después de aproximadamente diez días de la inoculación, los ratones presentaron un abdomen abultado, en este momento, se sacrificó al ratón por desnucamiento y se extrajo el líquido ascítico por punción del peritoneo con una jeringa con aguja de calibre grueso (20X32) y en un tubo de 15 mL. Las células fortalecidas se recuperaron por centrifugación del líquido ascítico a 100 g y fueron congeladas o mantenidas en cultivo. Del líquido ascítico también se pueden obtener anticuerpos en una mayor concentración a la obtenida en el cultivo celular, sin embargo, este líquido puede estar contaminado con otros anticuerpos diferentes al producido por el hibridoma.

Determinación de anticuerpos por ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados, los anticuerpos producidos por los hibridomas y la posible reacción cruzada de estos últimos con otros antígenos, fueron evaluados por ELISA: se forraron placas de 96 pozos de fondo plano (Costar) con 100 μ L/pozo de antígeno a 10 μ g/mL en solución amortiguadora de carbonatos (sol. 6) y se incubaron por toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas con 200 μ L de PBS Tween (sol. 7), tres veces por 5 min. cada vez. Después, se bloquearon los sitios activos libres con 100 μ L/pozo de solución de bloqueo (sol. 8) durante 60 min a 37°C. Una vez bloqueados, se agregaron 100 μ L/pozo de la fuente de anticuerpos (suero de ratón inmunizado diluido 1:1000 o sobrenadante de cultivo de hibridoma) y se incubaron por 2 hrs a 37°C. Se lavaron las placas como se indicó anteriormente y se agregaron 100 μ L/pozo de un anticuerpo anti Ig de ratón conjugado a peroxidasa (SIGMA) diluido 1:1000 en PBS (sol. 2) y se incubó por 2 hrs a 37°C. Por último, se adicionaron 100 μ L/pozo de la solución de cromógeno-substrato (sol. 10) y se incubó a temperatura ambiente hasta la aparición de color. La reacción enzimática se detuvo adicionando 100 μ L/pozo de H₂SO₄ 2N. Los valores de absorbancia se determinaron a 490 nm usando un lector de ELISA para microplacas (BIO-RAD).

La determinación de la clase y la subclase de los anticuerpos producidos por los hibridomas positivos a *T. solium*, se realizó sensibilizando la placa de ELISA con el sobrenadante de cultivo de los hibridomas y utilizando como anticuerpo de reconocimiento, un conjugado anti clase o anti subclase peroxidasa (AMERSHAM).

Cultivo de hibridomas en medio libre de proteínas

Con el propósito de obtener una fuente de anticuerpos libre de proteínas que pudieran interferir con los ensayos de caracterización del hibridoma, este fue adaptado gradualmente a crecer en un medio de cultivo libre de proteínas (PFHM, GIBCO). Inicialmente, el hibridoma se cultivó con un tercio del medio libre de proteínas y dos tercios de medio RPMI-1640 (sol. 4) complementado con 10 % de suero fetal bovino (SIGMA); al día siguiente con dos tercios de medio RPMI-1640 y al tercer día con el 100% del medio libre de proteínas; a partir de este momento se colectó el sobrenadante de los cultivos cada tercer día y se concentró por ultrafiltración en el sistema AMICON. Finalmente, se determinó la concentración de proteínas por BIO-RAD y el producto final se fraccionó y conservó a -20°C hasta su uso.

Purificación de AcMo F6.64.

El AcMo F6.64 fue purificado aprovechando su afinidad a la proteína A de *Staphylococo aureus* acoplada a sefarosa 4B (SIGMA) mediante una columna de 1.5 cm de diámetro por 5.5 cm de altura. La columna previamente lavada con cinco volúmenes de PBS (sol. 2), se incubó con el sobrenadante ajustado a un pH de 8.5 en una relación 10:1 con solución de Tris-base 2M durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavó la columna con PBS pH 8.5 y se colectó el eluido en fracciones de 1 mL; estas fracciones se dejaron de colectar, una vez que la lectura en el espectrofotómetro calibrado a 280 nm fue de cero. La elución de los anticuerpos se hizo con glicina 0.1M pH 2.5 y se colectó en fracciones de 1 mL hasta una lectura de cero en el espectrofotómetro calibrado a 280 nm. Las fracciones con lectura positiva se juntaron y se dializaron contra PBS (sol.

2); posteriormente se determinó la concentración de proteínas y se analizó la pureza de los anticuerpos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (Laemmli, 1970).

Inmunoelectrotransferencia

Con el fin de identificar el patrón de bandas reconocidas por el AcMo F6.64, el ASTsol y los otros antígenos se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS en gradiente de 5 a 22.5%, en condiciones reductoras (con β -mercaptoetanol al 1%) y no reductoras (Laemmli, 1970). Posteriormente las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa (MN) con 0.2 μ m de poro (BIO-RAD) por el método de Towbin y col. (1979), con regulador de transferencia Tris-glicina (sol. 12) y a 25 volts por 90 min. Después de bloquear los sitios activos con solución de bloqueo (sol. 8) por 30 min a 37°C, la MN se cortó en tiras de 5 mm de ancho y se incubaron durante 2 h a 37°C con sobrenadante de hibridoma directo o suero de ratón inmunizado diluido 1:1000 en PBS. Después de ser lavadas 3 veces con PBS (sol. 7), las tiras fueron incubadas con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (BIO-RAD) diluido 1:1000 en PBS (sol. 2) durante 2 hrs a temperatura ambiente. La actividad enzimática se detectó por medio de la solución cromógeno/substrato (sol 13). La reacción se detuvo lavando abundantemente con agua destilada.

Obtención del adulto de Taenia solium por medio del modelo de hamster dorado.

Diez hamsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) fueron inmunosuprimidos administrándoles por vía intramuscular 40 mg de metilprednisolona (Pharmacia & Upjohn) e infectados con 5 cisticercos de *Taenia solium* recién extraídos de la carne de un cerdo infectado naturalmente. Quince días después de la infección les fueron suministrados 40 mg más de metilprednisolona por la misma vía. Las tenias fueron extraídas del intestino de los hamsteres una vez sacrificados y lavadas tres veces con PBS (sol. 2) adicionado con antibióticos-antimicóticos 100X (SIGMA) a intervalos de 10 min. y puestas en medio de cultivo DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium (GIBCO)) adicionado con antibióticos-antimicóticos 100X (SIGMA) para la obtención de los antígenos de ESTsol.

Obtención del ESTsol y del ESCist.

Ejemplares de *T. solium* de hamster y cisticercos recién extraídos de un cerdo parasitado, se lavaron tres veces con una solución de PBS (sol. 2) adicionado con antibióticos-antimicóticos 100X (SIGMA) y posteriormente se mantuvieron por separado (2 tenias o 20 cisticercos) en frascos de cultivo por 48 hrs con 20 mL de medio RPMI-1640 (sol. 4) sin suero. Al término de este tiempo se recuperó el sobrenadante y se concentró por ultrafiltración a presión positiva (AMICON) y se le determinó la concentración de proteínas por Bradford en microplaca y se determinó la calidad de las mismas por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS en gradiente del 5 al 22.5 % (Laemmli, 1970).

Immunohistoquímica.

Con el objeto de identificar las estructuras reconocidas por el AcMo F6.64 en el adulto y metacéstodo de *T. solium* así como del adulto de *T. saginata*, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre cortes de tejido fresco de ambas especies. El parásito se incluyó en Tissue-Teck (Sakura), se congeló a -70°C y se cortó en secciones de $8\ \mu\text{m}$ en un criostato (American Optical). Los cortes se colocaron sobre portaobjetos previamente tratados con albúmina sérica bovina (SIGMA) al 0.1% para facilitar la adherencia del tejido al portaobjetos. Los portaobjetos con el tejido se bloquearon con solución bloqueadora (sol. 8) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente el tejido se cubrió con una solución de $100\ \mu\text{g/mL}$ del AcMo F6.64 en PBS (sol. 2) y se incubó durante 2 hrs a temperatura ambiente en cámara húmeda y con agitación suave. Después de lavar los tejidos 3 veces con PBS (sol. 2), se incubaron 2 hrs a temperatura ambiente y en agitación suave con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a fluoresceína (SIGMA) diluido 1:200 en PBS (sol. 2). Después de lavar el tejido 3 veces con PBS y sin dejar que se secase, se cubrió por 3 min con una solución de azul de Evans 1:200 en PBS (sol. 2). Posteriormente, el tejido se lavó 3 veces con PBS (sol. 2) y se cubrió con una gota de solución de glicerina al 50% en PBS (sol. 2) y sobre de éste se colocó cuidadosamente y sin formar burbujas un cubreobjetos. Las preparaciones se observaron al microscopio de epifluorescencia

(OLYMPUS, BH2-RFCA) con lámpara de mercurio (OSRAM HBO) comenzando por el control negativo que se preparó de igual forma que el tejido problema y utilizando un anticuerpo no relacionado. Por último, las preparaciones se fotografiaron a un aumento de 10X y 40X. Con las fotografías, se hizo una recomposición para determinar las áreas de reconocimiento del AcMo F6.64.

ELISA de captura de antígenos para determinar reacciones cruzadas del AcMo F6.64 con otros antígenos de parásitos y bacterias intestinales.

Se hizo una ELISA de captura de antígenos de diferentes parásitos relacionados con *T. solium* además de un grupo de bacterias que se pueden encontrar en el tracto digestivo del ser humano. Se preparó una solución de 10 µg/mL en amortiguador de carbonatos (sol. 6), con cada uno de los antígenos seleccionados. Se agregaron por duplicado 100 µL/pozo de esta solución antigénica a una placa de ELISA Falcon de 96 pozos (BECTON DICKINSON) y se dejó incubando por 2 hrs a 37°C, después de las cuales se procedió a lavarla con 200 µL/pozo de PBS (sol. 7) 3 veces por 5 min, después se bloquearon los pozos con 200 µL/ pozo de solución bloqueadora (sol. 8) y se puso en incubación por espacio de una hora al termino de la cual la placa se lavó como se indicó anteriormente y se adicionaron 100 µL/pozo del sobrenadante de cultivo del hibridoma F6.64 y se dejó en incubación por 2 hrs. La placa se saco de la incubación, se lavo como se indicó anteriormente y se agregaron 100 µL/pozo del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa a una dilución de 1:1000 y se incubó la placa por 2 hrs más. La placa se lavó como se indicó anteriormente y se agregaron 100 µL/pozo de una solución de cromógeno/substrato compuesta por O-fenilenediamina (SIGMA) 2 mM, en regulador de citratos 0.1 M y 0.01% de H₂O₂ y se incubó a temperatura ambiente hasta la aparición de color. La reacción enzimática se detuvo adicionando 100 µL/pozo de H₂SO₄ 2N y los valores de absorbancia se determinaron a 490 nm usando un lector de ELISA para microplacas (BIO-RAD).

ELISA de proporciones para determinar las concentraciones de trabajo del AcMo F6.64.

Se hizo una ELISA de proporciones con el fin de determinar las concentraciones óptimas de reconocimiento entre el AcMo F6.64 biotinado (F6 64*) y el ESTsol, utilizando diluciones dobles del ESTsol y del AcMo F6.64* desde 100 µg/mL y hasta 0 µg/mL en ambos casos: en una placa de ELISA Falcon de 96 pozos (BECTON DICKINSON), se colocaron 100 µL/pozo de una solución amortiguadora de carbonatos-bicarbonatos pH 9.6 (sol. 6), desde la fila B hasta la H. De la misma forma se colocaron 100 µL/pozo del ESTsol a 100 µg/mL en las filas A y B. Con una pipeta multicanal, se tomaron 100 µL de la fila B y se hicieron diluciones dobles hasta la G, dejando a la fila H sin antígeno. Se colocó la placa en incubación por 2 hrs a 37 °C, después de las cuales se procedió a lavarla con 200 µL/pozo de PBS (sol. 7) 3 veces por 5 min y después se bloquearon los pozos con 200 µL/ pozo de solución bloqueadora (sol. 8), y se puso en incubación por espacio de una hora. Después del bloqueo, la placa se lavó como se indicó anteriormente y se adicionó el AcMo F6 64* de la misma forma que el ESTsol, pero partiendo de la columna 1 con 100 µg/mL y hasta 0 en la columna 12, disuelto en solución de bloqueo (sol. 9) La placa se incubó por espacio de 2 hrs y después se lavó como se indicó anteriormente. Se agregaron 100 µL/pozo del conjugado avidina peroxidasa (SIGMA) en dilución 1:1000 en solución bloqueadora (sol. 9) a toda la placa y se incubó a 37^oC por espacio de 2 hrs. Se lavó la placa como antes se indicó, se adicionaron 100 µL/pozo de la solución de cromógeno-sustrato (10). La reacción enzimática se detuvo adicionando 100 µL/pozo de H₂SO₄ 2N y los valores de absorbancia se determinaron a 490 nm usando un lector de ELISA para microplacas (BIO-RAD).

De forma similar, se realizó una ELISA de proporciones, manteniendo constante la concentración del AcMo F6.64 en 100 µg/mL, concentración que aparentemente fue la óptima en el ensayo anterior. En este ensayo se variaron las concentraciones del anticuerpo de captura (anti ESTsol, en conejo) desde 100 µg/mL hasta 0 µg/mL y el antígeno ESTsol desde 100 µg/mL hasta 0 µg/mL. Un ensayo más se hizo utilizando como anticuerpo de captura por al AcMo F6.64 y como segundo anticuerpo el ESTsol partiendo de 100 µg/mL hasta 0 µg/mL en ambos casos, manteniendo una

concentración constante de 10 µg/mL del ESTsol y un anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa en dilución 1:1000.

ELISA de captura de coproantígenos en muestras de heces creadas (adicionadas con ESTsol).

Este ensayo se realizó con la finalidad de conocer si el AcMo es capaz de capturar el antígeno contenido en el ESTsol una vez que es adicionado a muestras de heces de humano para hacerlas positivas a *T. solium*. Este ensayo se realizó con el formato de proporciones anterior, utilizando como agente bloqueador PBS Tween 20 al 0.1%, una concentración constante de 50 µg/mL del AcMo F6.64 como anticuerpo de captura, diluciones dobles de 10 a cero µg/mL del ESTsol como antígeno y como segundo anticuerpo el anti-ESTsol en diluciones dobles de 25 y hasta cero µg/mL. Se sensibilizó una placa de ELISA con el AcMo F6.64 a una concentración 50 µg/mL en amortiguador de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 y se incubó por toda la noche a 4°C. Se lavó la placa con 200 µL/pozo de una solución de lavado (Sol. 7) 3 veces por 5 min cada vez. Se neutralizaron los sitios activos en la placa con PBS Tween 20 al 0.1% y se incubó por 2 hrs a temperatura ambiente. Se lavó la placa como se indicó anteriormente y se agregaron 100 µL de sobrenadante heces previamente diluidas 1:2 en PBS y centrifugadas a 1000 g por 15 min en los pozos del 1 al 8 de las filas A y B se adicionaron 100 µL de muestra de heces con ESTsol a 10 µg/mL y se procedió a hacer las diluciones dobles a partir de la fila B y hasta la H. La placa se incubó por 2 hrs a 37°C y se lavó como se indicó anteriormente. Se agregaron 100 µL/pozo de anti-ESTsol en diluciones dobles partiendo de la columna 1 con 25 µg/mL hasta la 8 sin anticuerpo, la placa se incubó por 2 hrs a 37°C y se lavó como se indicó anteriormente. Se adicionaron 100 µL/pozo de un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa en dilución 1:1000, se incubó por 2 hrs. La placa se lavó como se indicó anteriormente y se agregaron 100 µL/pozo de una solución de cromógeno/substrato compuesta por O-fenilenediamina (SIGMA) 2 mM, en regulador de citratos 0.1 M y 0.01% de H₂O₂ y se incubó a temperatura ambiente hasta la aparición de color. La

reacción enzimática se detuvo adicionando 100 μL /pozo de H_2SO_4 2N y los valores de absorbancia se determinaron a 490 nm usando un lector de ELISA para microplacas (BIO-RAD).

RESULTADOS

Dos ejemplares de *Taenia* sp procedentes de ser humano, se identificaron al microscopio como *T. solium* y *T. saginata*, por las diferencias particulares que muestran entre sí como es el escólex con doble corona de ganchos en *T. solium* y su ausencia en *T. saginata* (Proctor, 1972; Schantz, 1989).

Algunas diferencias y similitudes se muestran en la figura 1.

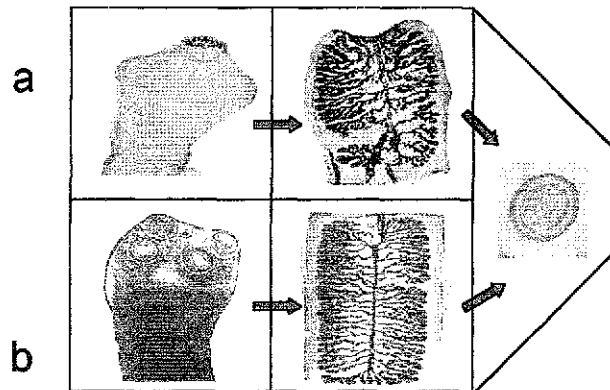
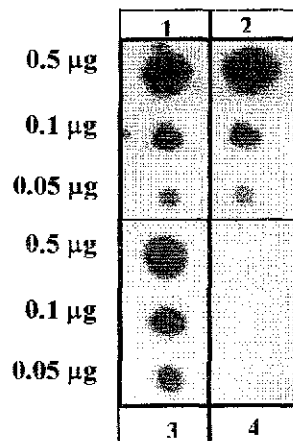


Figura 1: Estructuras de identificación de *T. solium* (a) y *T. saginata* (b): Se muestra el escólex y proglótido maduro así como el huevo que es similar entre ambas especies.

La confirmación de la especie se hizo por Dot Blot con hibridación del DNA de *T. solium* con la sonda de DNA específica pTsol-9 (fig. 2)(Chapman A, *et al.*, 1995), en el Lab. de Biología Molecular del Depto. de Biotecnología del INDRÉ por la QFB Rosalba Trejo y consiste en la obtención y desnaturalización del DNA del parásito y su posterior hibridación con la sonda pTsol 9 marcada con digoxigenina, que a su vez es reconocida con un anticuerpo anti digoxigenina.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2: Identificación del espécimen de *T. solium* por Dot Blot mediante la sonda de hibridación de DNA pTsol-9 específica. (1) DNA de *Taenia solium* problema; (2) DNA de cisticerco de *Taenia solium*. (3) DNA de *Taenia solium* de hamster como control positivo. (4) DNA *Taenia saginata*.

Una vez identificado, el espécimen de *T. solium* se utilizó para obtener el antígeno somático correspondiente (ASTsol), al cual se le determinó su patrón de bandeo proteico por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS en gradiente del 5 al 22.5% (fig. 3). Al igual que al ASTsol, también se sometieron a electroforesis el AgB de cisticerco, los GliCist, los ESCist, el ASCist, el ASTsag, los ESTsol y el FVCist

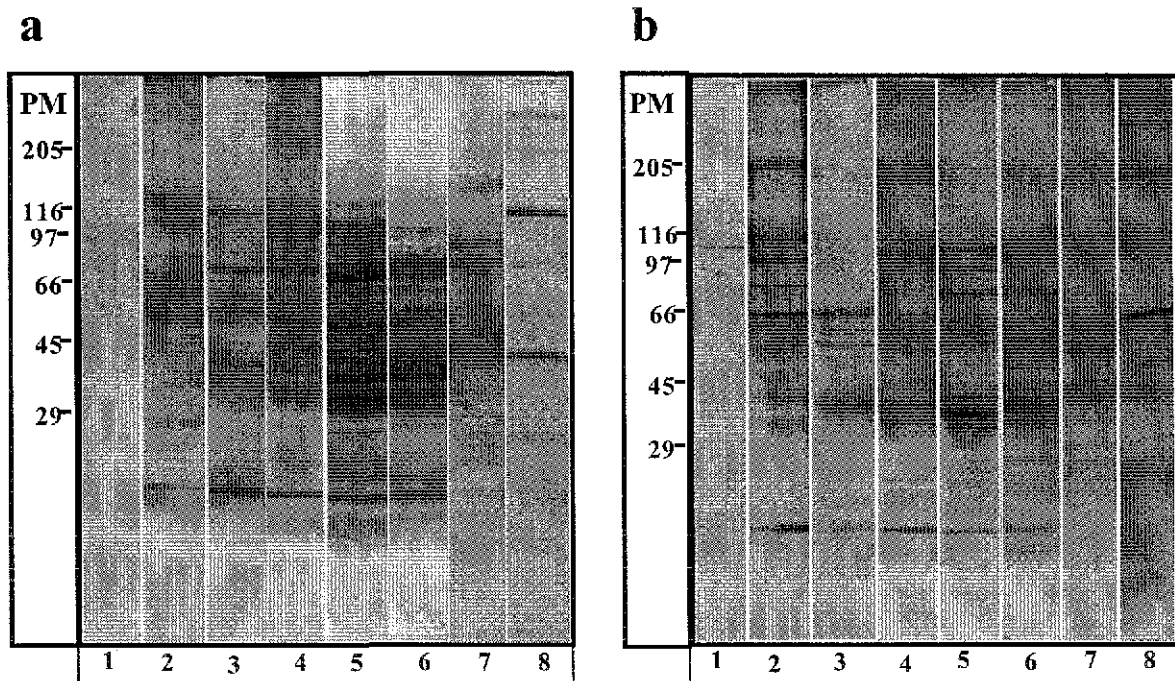


Figura 3: Electroforesis de antígenos de *T. solium* y ASTsag en geles de gradiente (5-22.5%) de acrilamida-SDS, en condiciones no reductoras (a) y reductoras con 1% de β -mercaptoetanol (b). AgB de cisticerco de *T. solium* (1), GliCist (2), ESCist (3), ASCist (4), ASTsol (5), ASTsag (6), ESTsol (7) y FVCist (8). Los antígenos se utilizaron a 30 μ g de proteína total por carril.

Con el ASTsol se inmunizaron 3 ratones Balb/c, dos de los cuales murieron sin causa aparente el día 20 después de la 2ª inmunización. Con el ratón que sobrevivió (Lo1) se continuo con el esquema de inmunización y la producción de inmunoglobulinas totales se siguió por ELISA (Figura 4). Con la finalidad de llegar a una inmunización óptima, el esquema de inmunización se continuó hasta el día 90 y a lo largo de este tiempo se observó un aumento gradual en la producción de inmunoglobulinas totales (Figura 4).

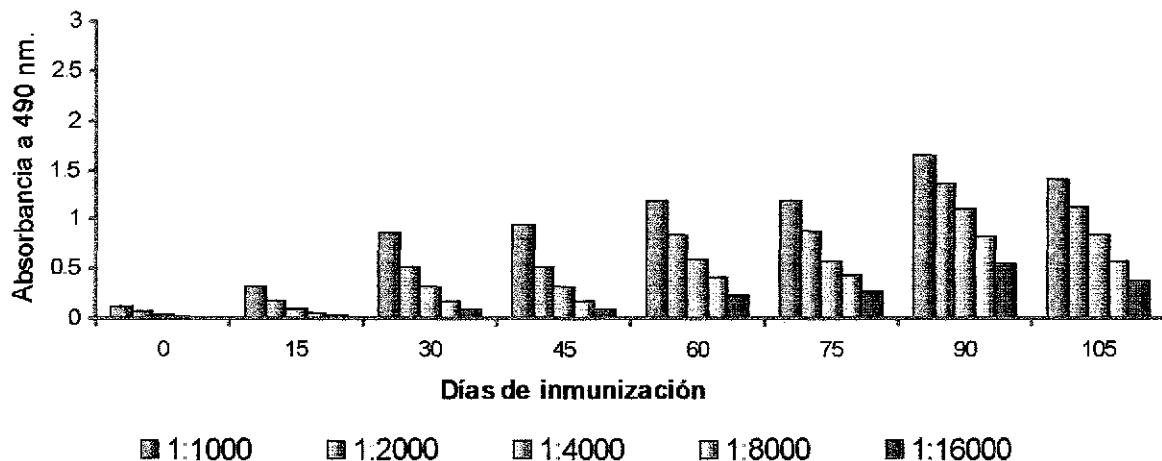


Figura 4: Cinética de producción de inmunoglobulinas totales que presentó el ratón Lo1 a lo largo del protocolo de inmunización con ASTsol.

Sin embargo, en el día 105 se observó una ligera disminución en la producción de anticuerpos totales, por lo que previo a la fusión se decidió aplicar un refuerzo con tres inmunizaciones (una por día) de 50 µg de ASTsol por vía intramuscular, con esto se alcanzó un título de anticuerpos IgG de 1:16000 con absorbancia mayor a 3 (Figura 5).

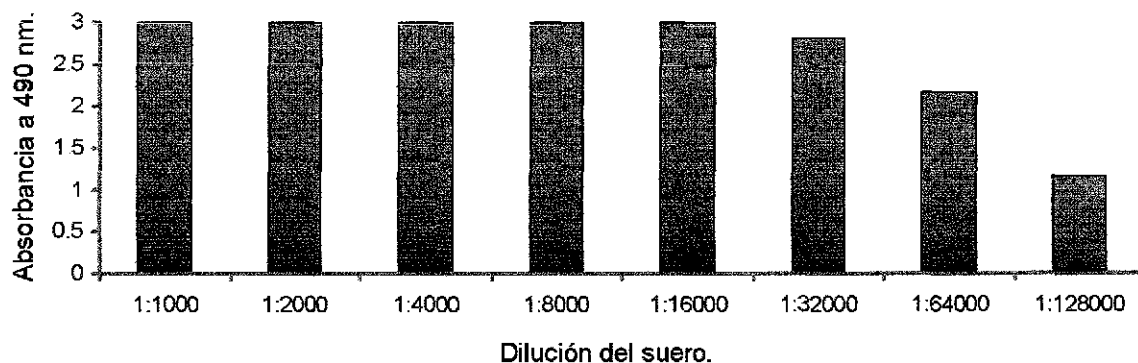


Figura 5: Título de anticuerpos IgG del ratón Lo1 al momento de la fusión y después del último refuerzo con ASTsol.

Después de la fusión y la clonación se obtuvieron seis híbridos productores de AcMo: F6.64, F6.65, F10.23, F10.8, F3.80 y F8.4, que reconocieron en ELISA el ASTsol. De éstos, los anticuerpos F6.64 y F6.65 solo reconocieron al adulto y al metacéstodo de *T. solium* (Fig. 6). De los anticuerpos de los hibridomas restantes, tres reconocieron tanto ASTsol como ASTsag (F10.23,

F10.8 y F8.4), pero no reconocieron ASCist. y el anticuerpo F3.80 reconoció antígenos del adulto y del metacésto de *T. solium*, así como antígenos de *T. saginata*.

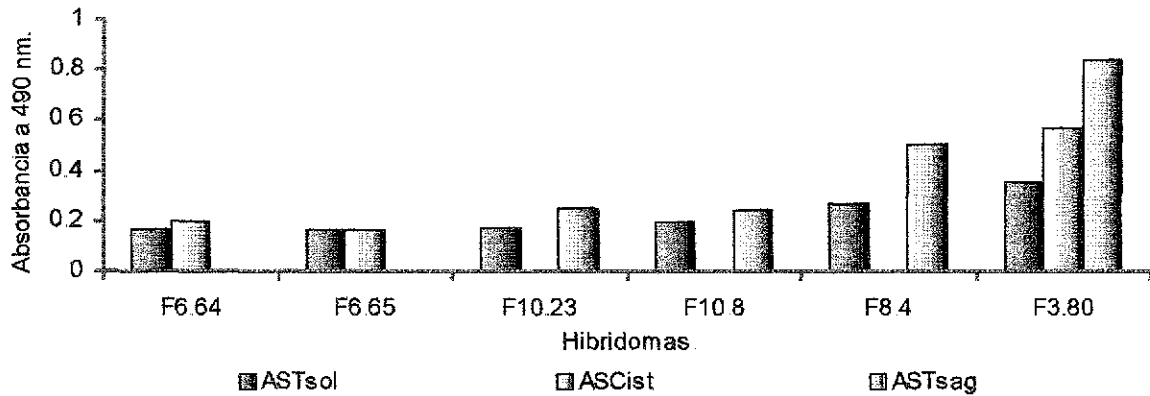


Figura 6: Reconocimiento de los antígenos del adulto de *T. solium* (ASTsol), el metacésto (ASCist) y el adulto de *T. saginata* (ASTsag) por los AcMo obtenidos. La concentración de antígeno empleada fue de 10µg/mL y la fuente de anticuerpos fue el sobrenadante directo de los hibridomas.

Se determinó la clase a la que pertenecía cada uno de los AcMo obtenidos, la cual resultó ser IgG, con excepción del AcMo F8.4 que resultó ser IgM (Fig. 7).

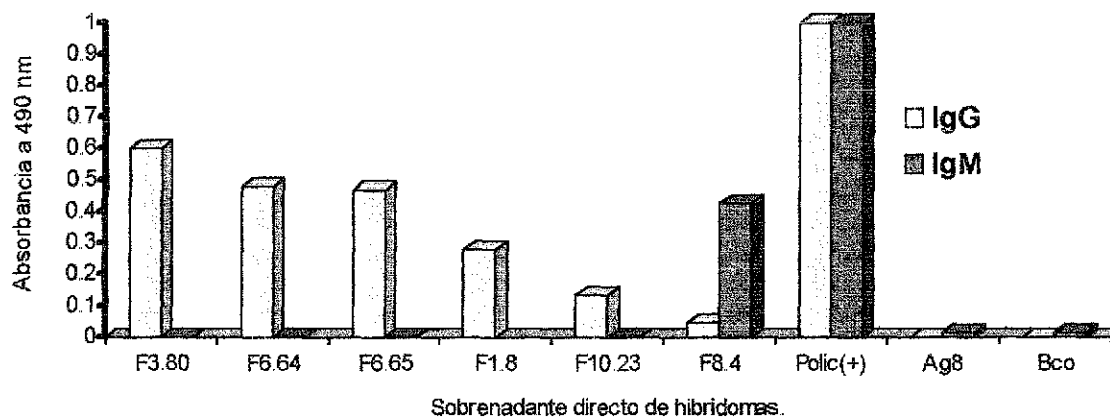


Figura 7: ELISA para determinar la clase de anticuerpos que producen los hibridomas resultantes de la fusión: (Polic (+)), suero de ratón inmunizado con ASTsol (1:1000) como control positivo; (Ag8) sobrenadante directo de cultivo del mieloma, como control negativo; (PBS) como blanco o sin fuente de anticuerpos

Debido a que tanto el sobrenadante del hibridoma F6.64 como el del F6.65 reconocieron los antígenos del adulto y del metacésto de *T. solium* y debido también a la cercanía entre los pozos de origen, se decidió enfrentar ambos anticuerpos en inmunolectrotransferencia con ASCist

(Figura 8), para determinar si ambas clonas estaban produciendo el mismo anticuerpo. Como resultado de este ensayo, se encontró que ambos anticuerpos reconocieron el mismo patrón de bandas antigénicas en el ASCist, por lo que se concluyó que se trataba de un mismo anticuerpo y se decidió continuar trabajando únicamente con el AcMo F6.64.

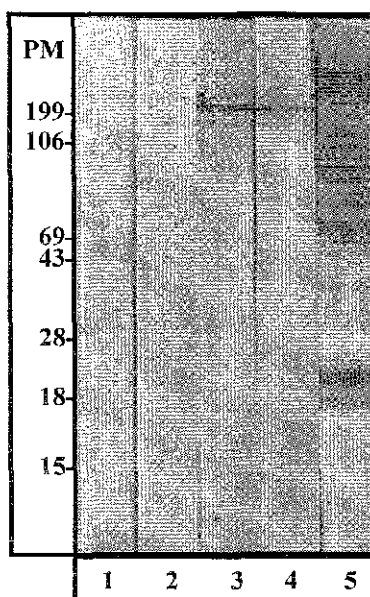
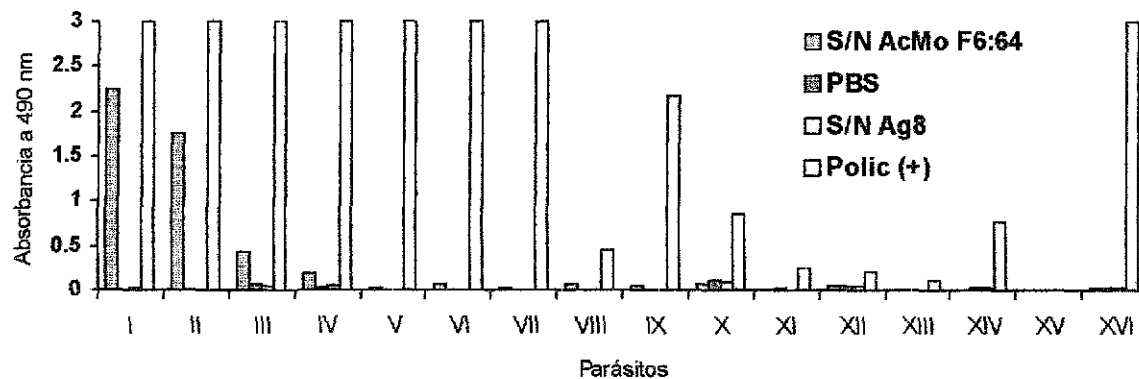
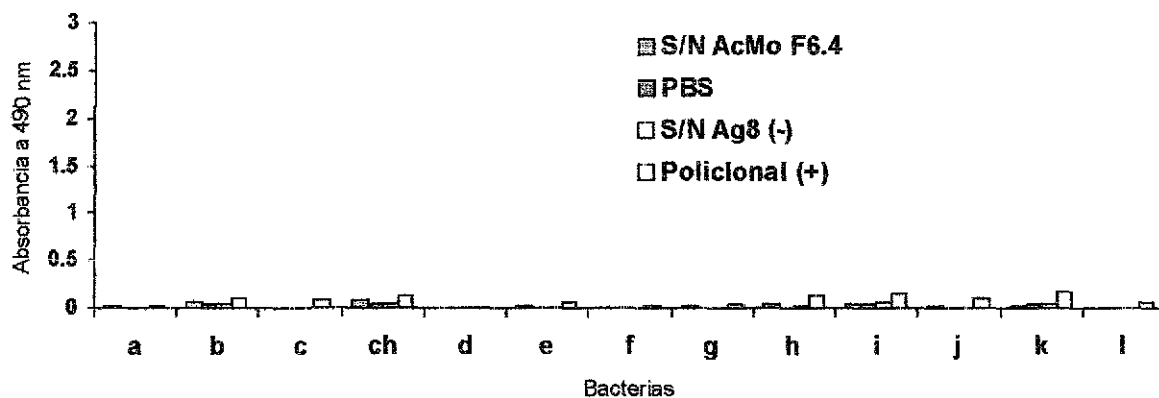


Figura 8: IET con ASCist reducido con β -mercaptoetanol al 1% y los AcMo F6.64 y F6.65 como anticuerpos de reconocimiento y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa como segundo anticuerpo: PBS como control o sin AcMo (1); medio de cultivo de mieloma Ag8 como control negativo (2); sobrenadante de cultivo del AcMo F6.64 (3); sobrenadante de cultivo del AcMo F6.65 (4); suero (1:1000) del ratón inmunizado con ASTsol, utilizado para la fusión (5) Estándar de pesos moleculares (PM).

La especificidad del AcMo F6.64 se confirmó al enfrentar en ELISA el sobrenadante del hibridoma F6.64 contra antígenos de diversos parásitos relacionados a *T. solium* (Figura 9) De la misma forma y tomando en cuenta que se pretende usar al AcMo F6.64 como un reactivo para la detección de coproantígenos, se decidió determinar su posible reacción cruzada con bacterias intestinales (Figura 10). En estos ensayo sólo se observó un reconocimiento significativo del gusano adulto y del metacéstodo de *T. solium*.



Figuras 9: ELISA de reacción cruzada con diferentes parásitos para determinar la especificidad del AcMo F6.64 hacia *T. solium*: (S/N AcMo F6.64) sobrenadante directo de cultivo del hibridoma como fuente de AcMo F6.64; (PBS) amortiguador de fosfatos en solución salina pH 7.2, como blanco en lugar del AcMo F6.64; (S/N Ag8) sobrenadante de cultivo del mieloma Ag8, como testigo negativo; (Polic(+)) suero de ratón inmunizado con ASTsol 1:1000, como testigo positivo. Se utilizaron antígenos somáticos a 10 µg/mL de: (i) ASTsol de humano; (ii) ASCist; (iii) ASTsol de hamster; (iv) ESTsol de hamster; (v) ASTsag; (vi) cisticerco de *T. taeniaeformis*; (vii) adulto de *T. taeniaeformis*; (viii) adulto de *Ascaris lumbricoides*; (ix) adulto de *Ascaris suum*; (x) adulto de *Trichinella spiralis*; (xi) adulto de *Toxocara canis*; (xii) adulto de *Onchocerca volvulus*, (xiii) *Plasmodium vivax*; (xiv) *Entamoeba histolytica*; (xv) *Macracantornichus hirudinaceus*; (xvi) *Fasciola hepatica*



Figuras 10: ELISA de reacción cruzada con diferentes bacterias para determinar la especificidad del AcMo F6.64 hacia *T. solium*: (S/N AcMo F6.64) sobrenadante directo de cultivo del hibridoma como fuente de AcMo F6.64; (PBS) amortiguador de fosfatos en solución salina pH 7.2, como blanco en lugar del AcMo F6.64; (S/N Ag8) sobrenadante de cultivo del mieloma Ag8, como testigo negativo; (Polic(+)) suero de ratón inmunizado con ASTsol 1:1000, como testigo positivo. Se utilizaron antígenos somáticos de las siguientes bacterias a 10 µg/mL. (a) *Escherichia coli*; (b) *Enterobacter cloacae*; (c) *Salmonella typhimurium*; (ch) *Shigella* sp; (e) *Proteus mirabilis*; (f) *Aeromona* sp; (g) *Klebsiella pneumoniae*; (h) *Morganella morgani*; (i) *Citrobacter freundii*; (j) *Vibrio cholerae* 12 Ogawa; (k) *V. cholerae* 13 Inaba; (l) *V. cholerae* O139.

Para evitar los problemas derivados de las variaciones en la concentración del AcMo al usar el sobrenadante directo del hibridoma, se decidió purificar el AcMo F6.64 por cromatografía de afinidad, mediante una columna de proteína A acoplada a sefarosa y el AcMo resultante se sometió a electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 12% en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 1% y en no reductoras (figura 11).

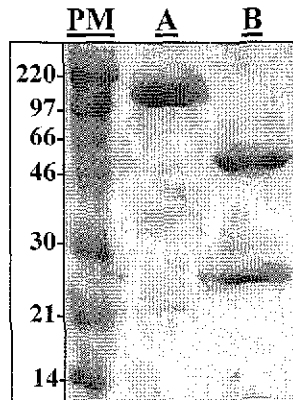


Figura 11: Electroforesis del AcMo F6.64 purificado por cromatografía de afinidad, corrido en condiciones no reductoras (A) y en condiciones reductoras con β -mercaptoetanol al 1% (B). Pesos moleculares (PM).

Una vez purificado, el AcMo F6.64 se enfrentó en ELISA con algunos antígenos de *T. solium* y ASTsag. En este ensayo también se utilizaron los sobrenadantes de cultivo del hibridoma cultivado en PFHM-II y RPMI-1640 concentrado y directo respectivamente (Fig. 12) El ensayo reveló un aumento en los valores de reconocimiento hacia antígenos de *T. solium* como son ASCist, GliCist, FVCist y ESCist y no así por ESTsol y AgBCist, sin embargo también se observó un reconocimiento hacia *T. saginata*, lo cual no se observó cuando se utilizó el sobrenadante RPMI-1640 directo ni con el PFHM-II concentrado. En general, se observan valores de absorbancia menores con los medios de cultivo directo y concentrado que con el AcMo F6.64 purificado Cabe resaltar que con este ensayo se confirmó que el AcMo F6.64 no reconoce al AgB aislado de cisticercos de *T. solium* y que tampoco reconoce al antígeno ESTsol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

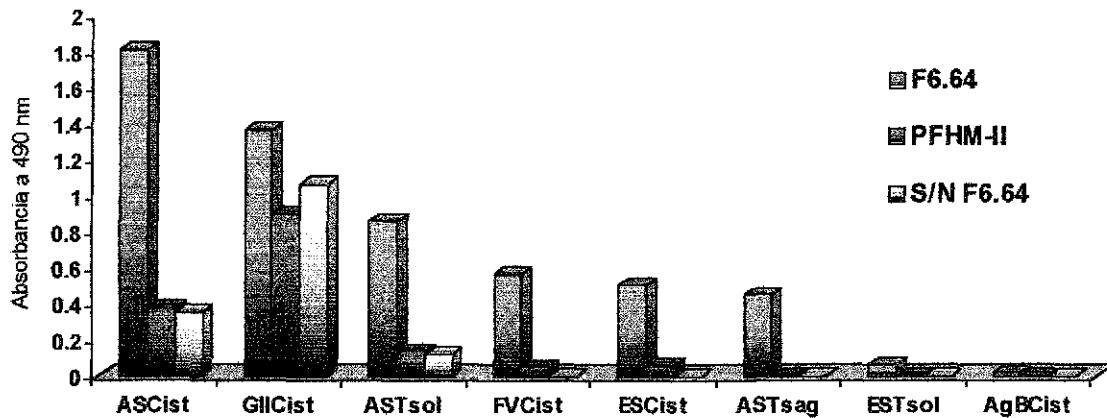


Figura 12: ELISA de reconocimiento de antígenos de *T. solium* y *T. saginata* con el AcMo F6.64: el AcMo se utilizó en forma pura (F6.64) a 25 µg/mL, con el sobrenadante del hibridoma cultivado con medio libre de proteínas concentrado (PFHM-II) a 25 mg/mL y con el sobrenadante del hibridoma cultivado en medio RPMI-1640 (S/N F6.64) directo. (ASCist) antígeno somático de cisticerco de *T. solium*; (ASTsol) antígeno somático de *T. solium* de hámster; (ASTsag) antígeno somático de *T. saginata* de humano; (ESTsol) antígeno de excreción-secreción de *T. solium* de hámster, (ESCist) antígeno de excreción-secreción de cisticerco de *T. solium*; (FVCist) fluido vesicular de cisticerco de *T. solium*; (GliCist) glicoproteínas de cisticerco de *T. solium*, (AgBCist) antígeno B de cisticerco de *T. solium*. Los antígenos se utilizaron a una concentración de 10 µg/ml.

Con la finalidad de descartar el reconocimiento de miosina de *T. solium* por el AcMo F6.64, se realizó una ELISA donde se encontró una ligera reacción hacia este antígeno (Fig.13).

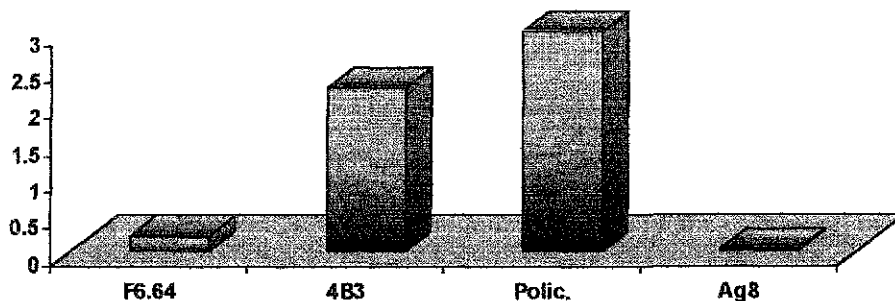


Figura 13: ELISA de reconocimiento de miosina de *T. solium* por el AcMo F6.64: AcMo específico de miosina (4B3), suero de ratón inmunizado con *T. solium* (Polic.) y medio de cultivo del mieloma X63 Ag8.653 (Ag8).

Con la finalidad de corroborar el reconocimiento de ASTsag por el AcMo F6.64 en ELISA y para determinar el patrón antigénico de los diferentes antígenos reconocidos, se hizo una IET en condiciones no reductoras (Figura 14A) y reductoras con 2-mercaptoetanol al 1% (Figura 14B). Con este ensayo se confirmaron diferencias para el reconocimiento de ASTsol y ASTsag por el

AcMo. Al analizar el patrón de bandeo reconocido por el AcMo F6.64 en el IET con los diferentes antígenos utilizados, se observó que bajo condiciones no reductoras (Fig. 14 A) en las GliCist se observan aproximadamente 9 bandas que son difíciles de distinguir, pero algunas de ellas se comparten con el ESCist, ASCist y ASTsol como la de 97 y 220 kDa. El ASTsol presenta varias bandas de proteína con peso molecular por arriba de los 220 kDa, algunas de las cuales comparte con ASCist pero no se presentan en ASTsag que por su parte presenta una banda que parece ser exclusiva, con peso molecular por arriba de 220 kDa. Bajo esas condiciones los antígenos AgBCist y ESTsol no reaccionaron con el AcMo F6.64 puro.

En el ensayo bajo condiciones reductoras (Fig. 14 B), el antígeno ESCist presentó una banda exclusiva de aproximadamente 50 kDa, el ASTsol dos bandas exclusivas con peso aproximado de 97 y por arriba de los 220 kDa, el ASTsag cuatro bandas exclusivas con pesos aproximados de 80, 100, 170 y 200 kDa y el FVCist un duplete aproximadamente a los 200 kDa cuya banda inferior parece estar compartida con ASTsol y ASTsag, pero la superior parece ser exclusiva del FVCist. Al igual que en el ensayo anterior, bajo estas condiciones no se encontró reacción alguna del AcMo F6.64 con los antígenos de AgBCist y ESTsol pero además no hubo reconocimiento de GliCist.

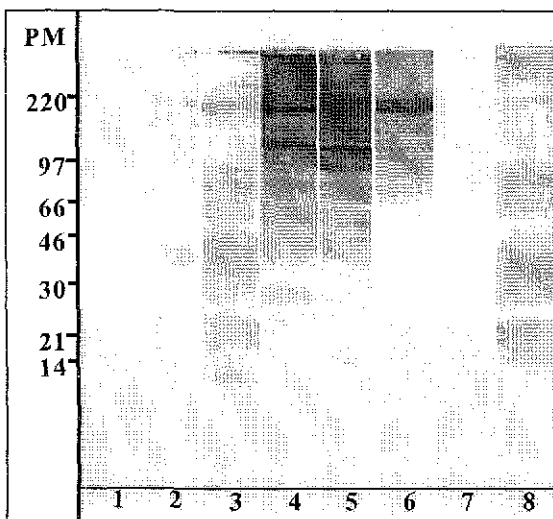


Fig. A

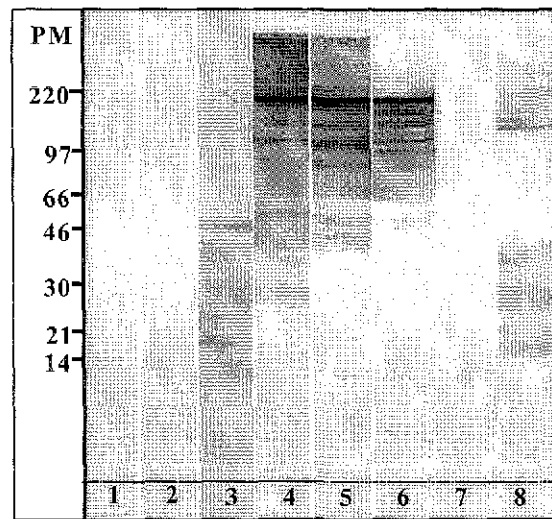


Fig. B

Figura 14: Reconocimiento en IET de antígenos de *T. solium* y *T. saginata* con el AcMo F6.64 puro (A, condiciones no reductoras y B condiciones reductoras); AgBCist (1); GliCist (2); ESCist (3); ASCist (4); ASTsol (5); ASTsag (6); ESTsol (7) FVCist (8) Se utilizaron 30 µg de proteína total por antígeno y 25 de AcMo puro. (PM) estándar de pesos moleculares.

Con el propósito de determinar si había diferencias en cuanto a la ubicación del antígeno reconocido por el AcMo F6.64 en el adulto de *T. solium* de hamster, el metacéstodo de *T. solium* y el adulto de *T. saginata*, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Debido a la dificultad que implica conseguir un ejemplar de *T. solium* de humano, para este ensayo se utilizaron proglótidos de *T. solium* desarrollada en hamster, suponiendo un desarrollo similar del parásito en ambos casos y debido al reconocimiento que tiene el AcMo por el parásito de ambos orígenes. Para el ensayo, también se procuró que los proglótidos de ambas especies fueran similares en cuanto a su desarrollo por lo cual se escogieron proglótidos inmaduros de *T. saginata* y los últimos proglótidos de un ejemplar de *T. solium* desarrollada en hamster por espacio de cinco semanas. Como resultado del ensayo, se encontró en el proglótido de *T. solium* una marca con el AcMo F6.64 ampliamente difundida por todo el proglótido, excepto en un área que parece ser la correspondiente a las ramas uterinas y la región del tegumento, el antígeno reconocido no parece estar relacionado con tejido muscular ya que las fibras musculares se observan negativas al ser teñidas con el colorante de contraste (Figura 15). El reconocimiento en el metacéstodo se observó de forma similar e incluyó un reconocimiento en la membrana vesicular (Fig. 16). Por su parte en *T. saginata* se observó un reconocimiento antigénico diferente, ya que el antígeno reconocido parece estar asociado únicamente a la superficie de las fibras musculares, tanto longitudinales como transversales de todo el proglótido (Fig 17).

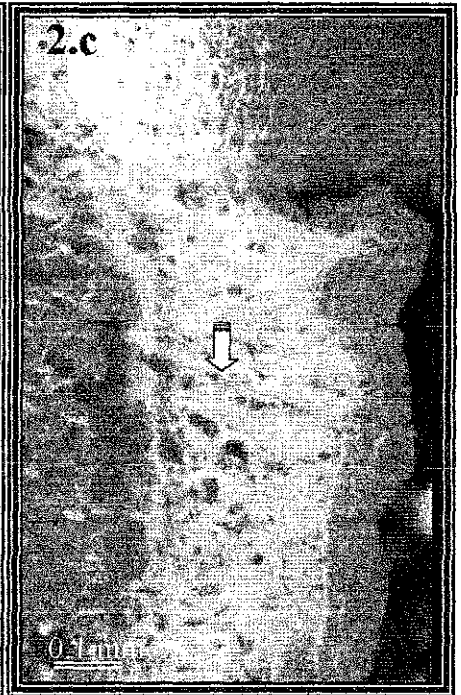
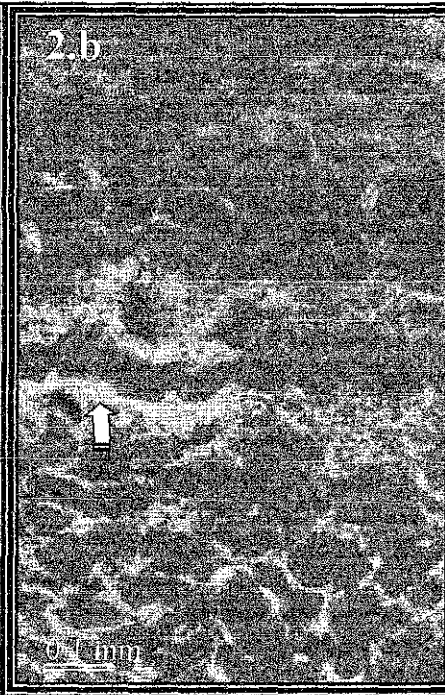
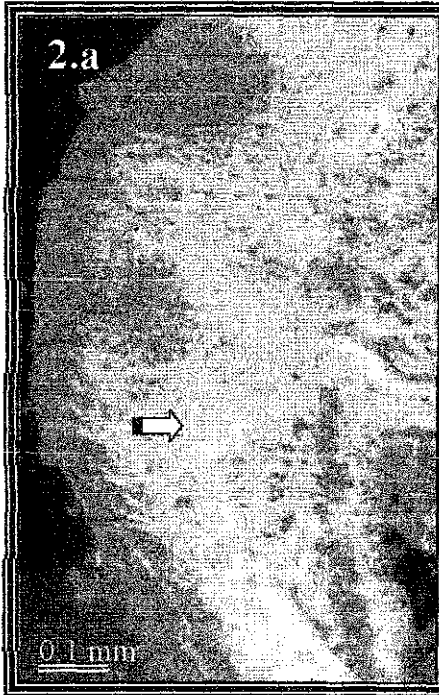
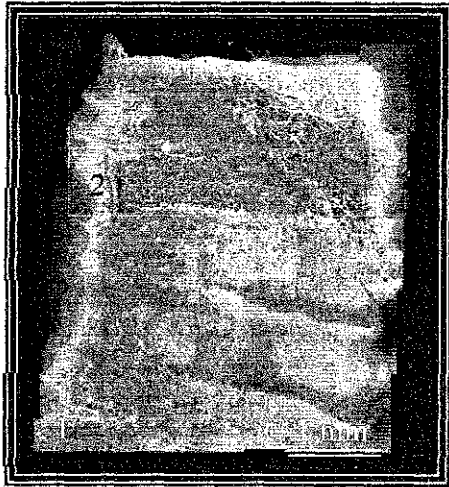


Figura 15: Identificación por inmunofluorescencia indirecta de estructuras de un proglótido maduro de *Taenia solium* de hamster con el AcMo F6.64: sección longitudinal del estróbilo (1), proglótido (2), región del poro genital (2.a), región de ramas uterinas (2.b), región subtegumentaria (2.c). Las flechas indican las estructuras reconocidas por el AcMo. Las figuras se construyeron a partir de las fotografías originales digitalizadas.

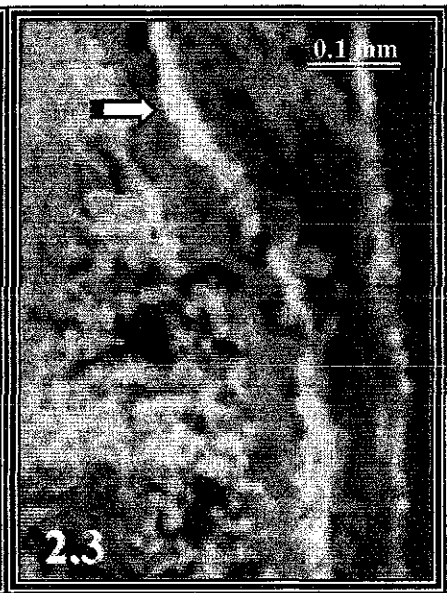
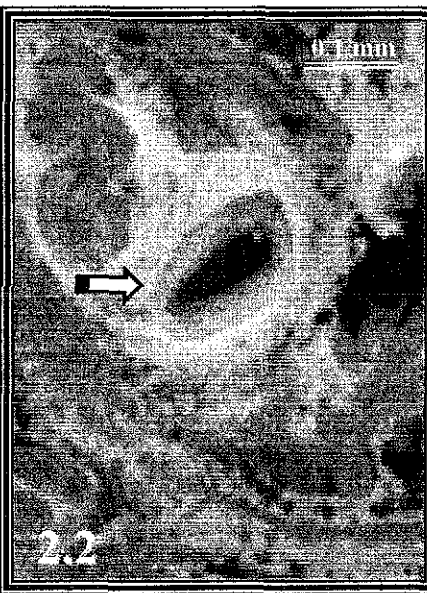
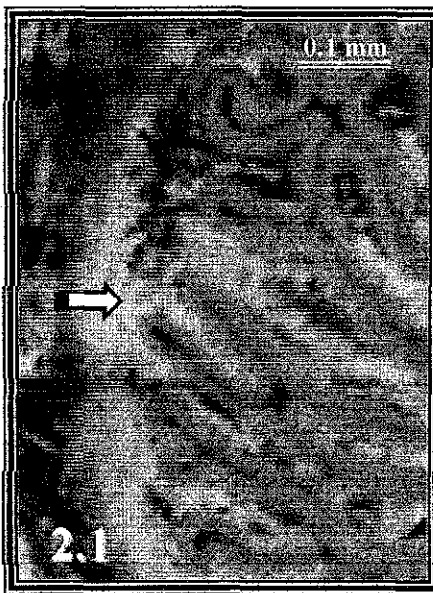


Figura 16: Identificación de estructuras del cisticerco de *Taenia solium* por Inmunofluorescencia con el AcMo F6.64: imagen de cisticerco completo (1), sección transversal (2), canal espiral (2.1), ventosas (2.2), membrana interna y vesicular del cisticerco (2.3). Las flechas indican las estructuras reconocidas por el AcMo. Las figuras se construyeron a partir de las fotografías originales digitalizadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

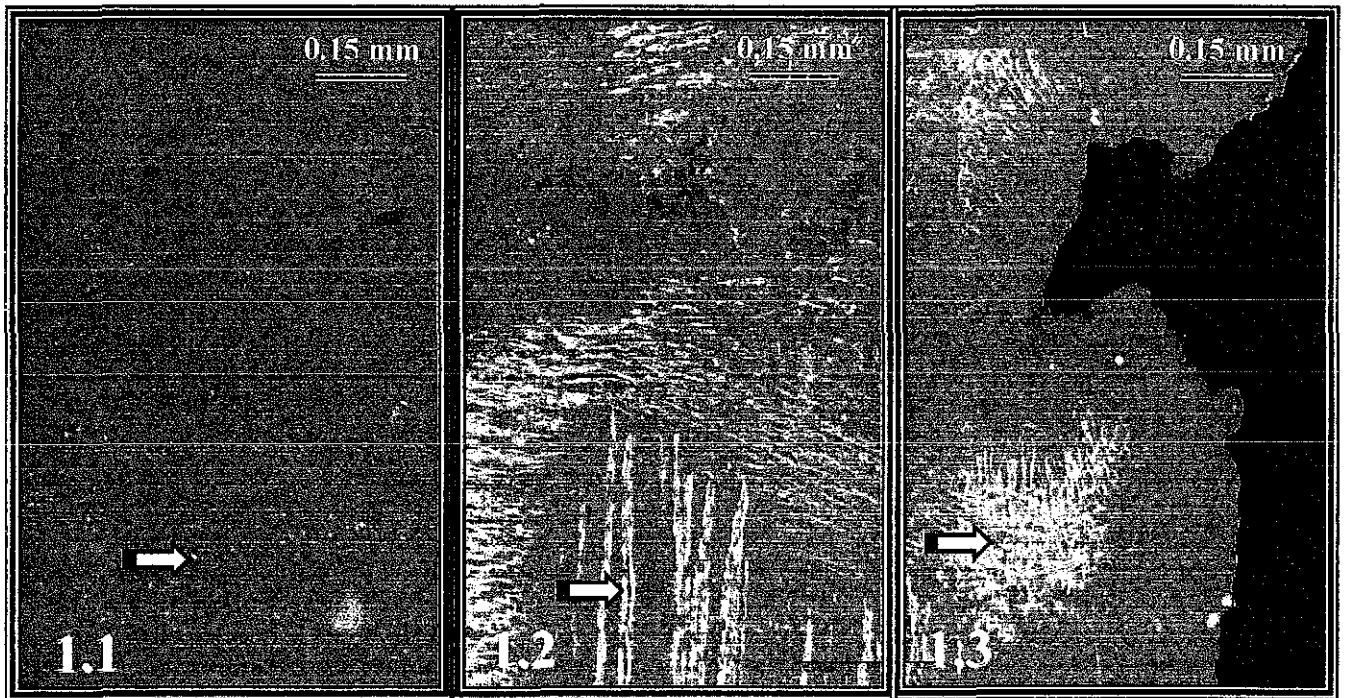
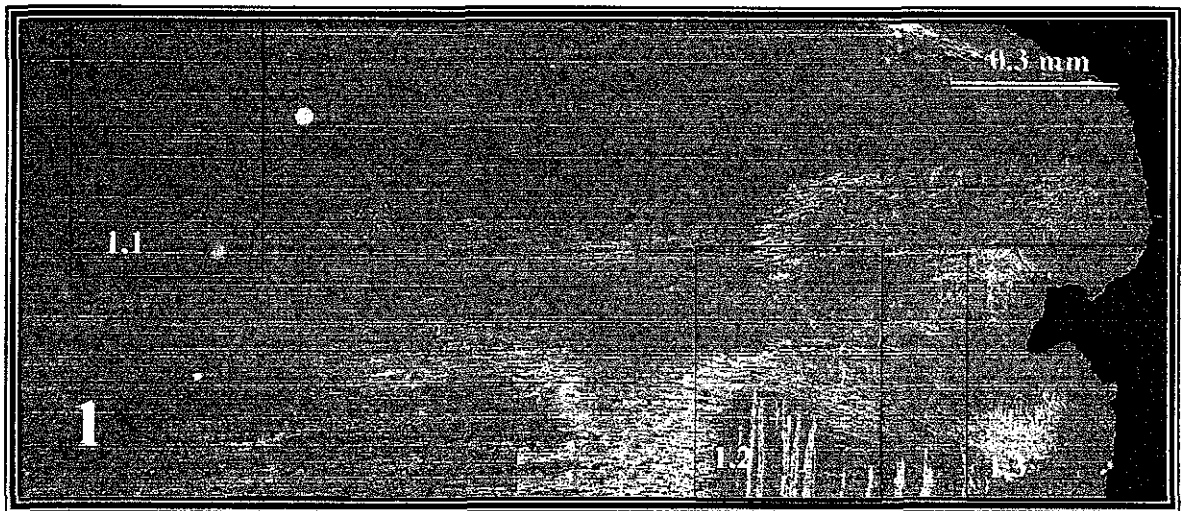


Figura 17: Identificación de estructuras de *Taenia saginata* por Inmunofluorescencia con el AcMo F6.64: sección transversal del proglótido (1), región de las ramas uterinas (1.1), región media del proglótido (1.2), región del poro genital y región subtegumentaria (1.3). Las flechas indican las estructuras fibrilares reconocidas por el AcMo. Las figuras se construyeron a partir de las fotografías originales digitalizadas.

Para determinar las concentraciones de trabajo del ESTsol y el F6.64 biotinado (F6.64*) se hizo una ELISA de proporciones, y se encontró que se puede detectar como mínimo 3.12 $\mu\text{g/mL}$ de antígeno a una concentración de trabajo del AcMo de 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Los valores de absorbancia para estas concentraciones de AcMo fueron de 0.029 y 0.051 respectivamente (Fig. 18).

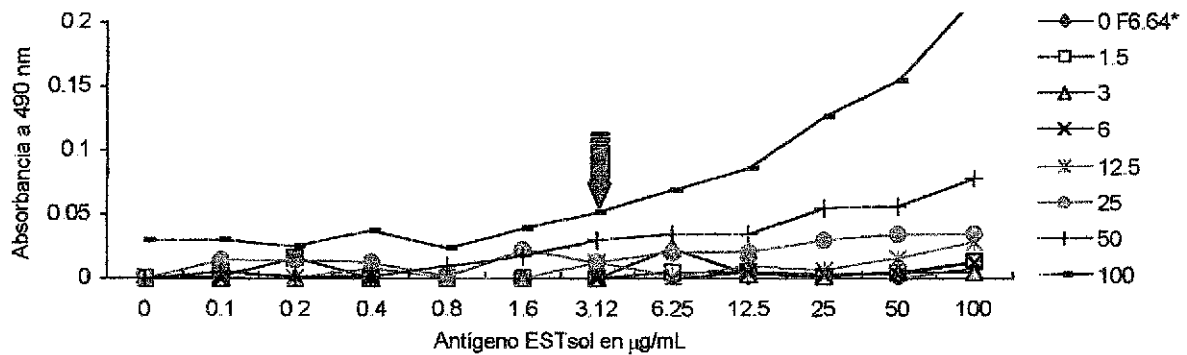


Figura 18: ELISA de proporciones y detección de antígeno para determinar la concentración óptima de trabajo del AcMo F4.64 y el antígeno ESTsol. Tanto el F6.64* como el ESTsol se utilizaron en diluciones dobles, partiendo de una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ y hasta cero $\mu\text{g/mL}$. La flecha indica la concentración de trabajo del F6.64* y el ESTsol.

Bajo las mismas condiciones que en el ensayo anterior, se determinó la concentración de trabajo del AcMo F6.64* con el ASCist en diluciones dobles de 20 a 0 $\mu\text{g/mL}$ y de 10 a 0 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Fig. 19). En este ensayo se encontró que se puede detectar 0.6 $\mu\text{g/mL}$ de ASCist con 20 $\mu\text{g/mL}$ de F6.64*.

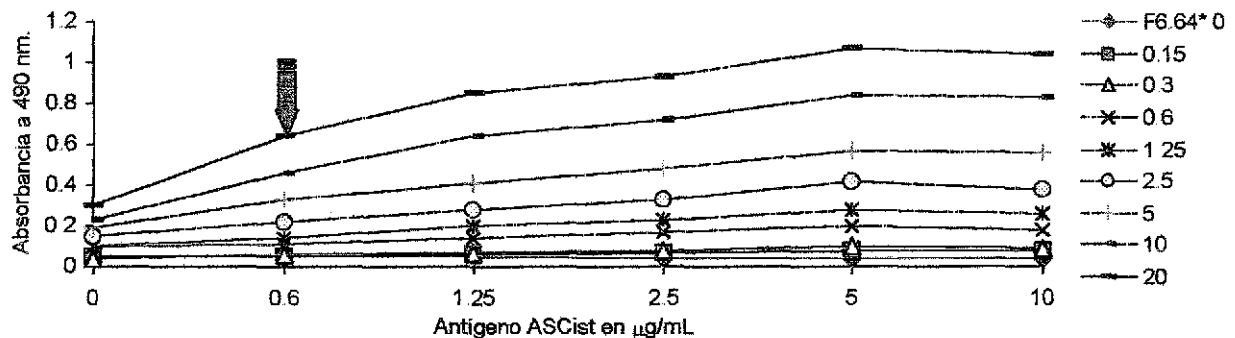


Figura 19: ELISA de proporciones y detección de antígenos para determinar la concentración óptima de trabajo del AcMo F4.64* y el antígeno ASCist. Tanto el F6.64* como el ASCist se utilizaron en diluciones dobles, partiendo de una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente y hasta cero. La flecha indica las concentraciones de trabajo del F6.64* y el ASCist.

Conociendo la concentración de trabajo del AcMo F6.64 en la ELISA de reconocimiento del ESTsol, se procedió a determinar las concentraciones de trabajo del anti-ESTsol y el ESTsol en una ELISA de captura de antígeno (Fig. 20), utilizando como primer anticuerpo el anti-ESTsol producido en conejo y el ESTsol en diluciones dobles de 100 a cero $\mu\text{g/mL}$. El AcMo F6.64* se utilizó a una concentración constante de 100 $\mu\text{g/mL}$, ya que fue la concentración que mejor resultado dio en el ensayo de detección de ESTsol. Como resultado de este ensayo, se tiene que con 3.12 $\mu\text{g/mL}$ de anti-ESTsol se pueden capturar 0.78 $\mu\text{g/mL}$ de ESTsol. Sin embargo, la diferencia entre los valores de absorbancia de fondo y los de detección es pequeña.

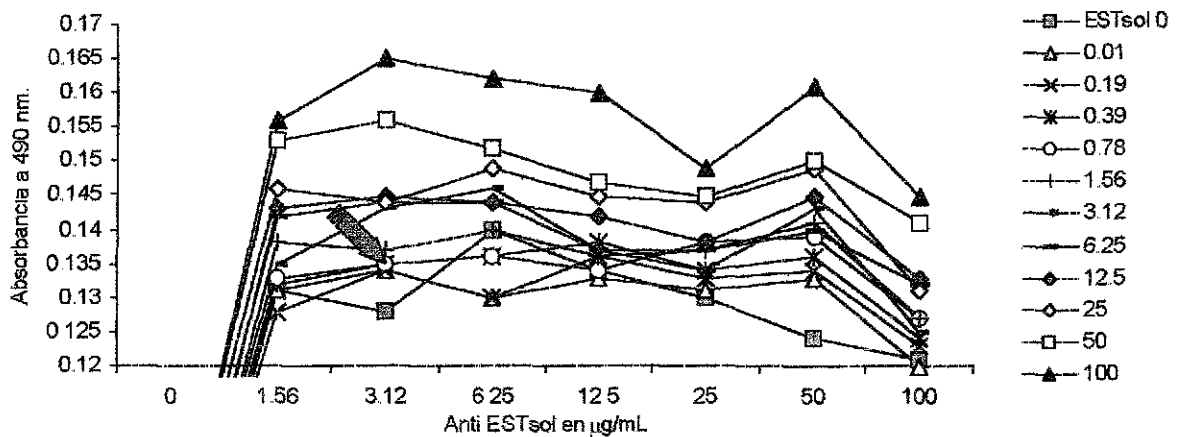


Figura 20: ELISA de proporciones y captura de ESTsol con anti-ESTsol, con diluciones dobles del antígeno y del anticuerpo partiendo de 100 y hasta cero $\mu\text{g/mL}$. La concentración del AcMo F6 64* se mantuvo constante a 100 $\mu\text{g/mL}$. La flecha indica la concentración de trabajo del anti-ESTsol y el ESTsol.

En el ensayo anterior se utilizó el anti ESTsol como anticuerpo de captura del antígeno de ESTsol. Sin embargo, pensando en la posibilidad de que bajo las condiciones del ensayo anterior (Fig. 20), el anti ESTsol capturara el epítipo reconocido por el F6.64* y que esto limitara por competencia la posibilidad de reconocimiento del antígeno con el AcMo, se decidió hacer un ensayo similar al anterior pero invirtiendo el orden de los anticuerpos para dar oportunidad al F6.64 de capturar primero el antígeno que parece ser escaso en el ESTsol (Fig. 21). Tomando en cuenta que en el ensayo anterior (Fig. 20) se pudieron detectar hasta 0.78 $\mu\text{g/mL}$ de ESTsol, para este caso, se usó una concentración constante de 10 $\mu\text{g/mL}$ y se variaron las concentraciones del AcMo F6.64 (100 a cero $\mu\text{g/mL}$) como primer anticuerpo y del anti ESTsol (100 a cero $\mu\text{g/mL}$) como segundo anticuerpo. Como anticuerpo de revelado se utilizó un anti conejo peroxidasa en dilución 1:1000. Como resultado de este ensayo se observó un incremento en los valores de absorbancia de



0.145 con 3.12 $\mu\text{g/mL}$ de anti ESTsol, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de ESTsol y 100 $\mu\text{g/mL}$ de AcMo F6.64* (Fig. 20) contra 0.779 con las mismas concentraciones de antígeno y anticuerpos (Fig. 21).

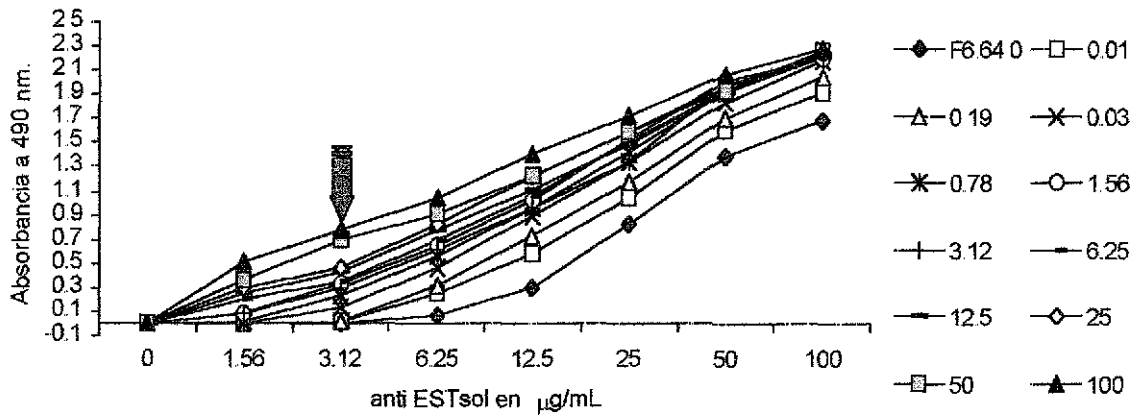


Figura 21: ELISA de proporciones y captura de antígeno para determinar la concentración de trabajo del AcMo F6.64 y el anti ESTsol. Tanto el AcMo F6.64 como el anticuerpo policlonal anti ESTsol se utilizaron en diluciones dobles de 100 a cero $\mu\text{g/mL}$ y el ESTsol se utilizó a una concentración constante de 10 $\mu\text{g/mL}$.

Una vez que se determinó que el AcMo F6.64 podía capturar el antígeno contenido en el ESTsol (Fig. 21), se procedió a realizar una ELISA de proporciones con muestras de heces a las cuales se les adicionó ESTsol a diferentes concentraciones (muestras creadas) para saber si bajo estas condiciones el AcMo podía capturar el antígeno (Fig. 22). Como resultado de este ensayo, se observó que en muestras de heces creadas, el AcMo F6.64 a una concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ puede capturar como mínimo 1.25 $\mu\text{g/mL}$ de ESTsol.

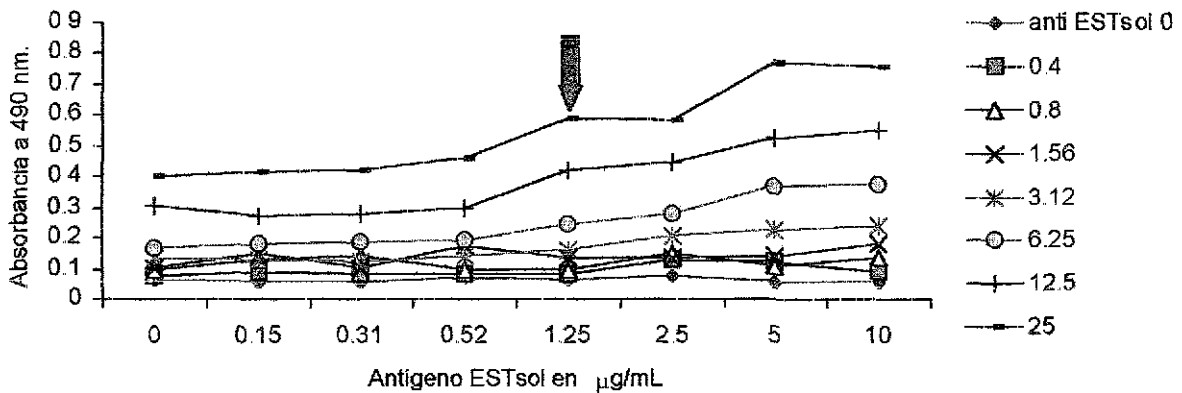


Figura 22: ELISA de proporciones y captura de antígeno en muestras adicionadas con ESTsol. Como anticuerpo de captura se utilizó el AcMo F6.64 a una concentración constante de 50 $\mu\text{g/mL}$, como segundo anticuerpo el anti ESTsol en concentraciones de 25 a cero $\mu\text{g/mL}$ y a las muestras de heces se les adicionó el ESTsol a diferentes concentraciones, partiendo de 10 y hasta cero $\mu\text{g/mL}$.



DISCUSIÓN

En este trabajo se intentó obtener un AcMo que reconociera específicamente a *Taenia solium* para desarrollar con él un método de diagnóstico de este parásito en heces. Como resultado se obtuvo un AcMo que aparentemente tenía esta característica. Sin embargo, los ensayos realizados hasta ese momento se habían hecho sólo con el sobrenadante de cultivo del hibridoma y cuando se utilizó el AcMo purificado se observó un aumento de reconocimiento hacia *T. solium*, pero también hubo reconocimiento hacia *T. saginata*, aunque de menor magnitud; por tal motivo, surgió la inquietud de caracterizar lo que el AcMo estaba reconociendo en cada especie. Con este objetivo se hizo una IET con antígenos de *T. solium* y *T. saginata* y se encontró que había diferencias en el patrón antigénico de reconocido por el AcMo F6.64 en cada parásito; incluso se encontraron diferencias entre el parásito adulto de *T. solium* y su metacéstodo. En la IET con condiciones no reductoras no se pueden distinguir las bandas que están por arriba de los 220 kDa en ASCist y ASTsol lo cual puede estar determinado por una alta proporción en la concentración de las proteínas con estos pesos moleculares, por lo cual es necesario aumentar el tamaño del gel para permitir una mejor separación de las proteínas sin que interfiera su concentración proporcional, ya que si se reduce la concentración de la proteína total para visualizar mejor las proteínas, es posible que las bandas más tenues ya no se distingan. El efecto de una alta concentración del antígeno total parece no afectar la visualización de las bandas en la IET con condiciones reductoras, sin embargo, si se hicieran geles más largos la separación entre bandas sería mayor y estas se podrían distinguir más claramente.

El AcMo F6.64 reveló una banda principal de aproximadamente 200 kDa compartida entre los dos estadios de *T. solium* y *T. saginata* la cual se observa aun en condiciones reductoras. Para el caso de ambos estadios de *T. solium* también se encontró una banda de alrededor de 100 kDa, tanto en condiciones reductoras como no reductoras. La observación de estas dos bandas nos llevaron a examinar la posibilidad de que el antígeno reconocido fuese miosina o AgB (paramiosina), debido a la coincidencia en pesos moleculares con estos dos antígenos, ya que en años pasados se había encontrado un anticuerpo monoclonal que reconoce a la miosina del metacéstodo de *T. solium* pero que también reconoce al AgB (Ambrosio y col., 1996). De nuestros resultados podemos

concluir que no se trata de ninguna de estas proteínas, debido a que el AcMo F6.64 no las reconoció en ELISA y tampoco reconoció al AgB en IET. Más aun, en los ensayos de inmunofluorescencia con el AcMo F6.64, el patrón de distribución de la marca es completamente distinto al reportado por Ambrosio y col. (1996), tanto en el caso del metacéstono como en el del adulto de *T. solium*.

Por otro lado, el antígeno que reconoce el AcMo F6.64 contiene azúcares, ya que la magnitud de la reacción que presenta en ELISA con una fracción enriquecida de glicoproteínas del metacéstono es mucho mayor a la obtenida con el ASCist. Esta afirmación se refuerza por el hecho de que el reconocimiento con F6.64 del ASCist tratado con proteinasa K se redujo en un 30%, y con periodato de sodio en un 50% (no se muestra) lo cual indica que en el reconocimiento de este antígeno están involucrados un azúcar y un péptido. Además, el reconocimiento en la IET nos indica que el epítoto está expuesto aún en condiciones desnaturalizantes en presencia de un agente reductor como es el 2-mercaptoetanol, lo cual indica que podría tratarse de una secuencia de aminoácidos o un azúcar. Aunque parece ser que el antígeno reconocido no está relacionado con tejido muscular, aun falta descartar la reacción del anticuerpo con actina. Debido a la distribución tipo fibrilar que presentó en la IFI el AcMo en *T. saginata* y de tipo reticular en *T. solium*, existe la posibilidad de que el antígeno involucrado sea colágena. Hace algunos años Torre Blanco y col (1981) purificaron esta proteína del metacéstono de *T. solium* y encontraron que se trata de un dímero formado por proteínas de 100 kDa. Las colágenas son proteínas glicosiladas que se secretan, lo cual concuerda con el reconocimiento de antígenos en el ESTsol y en el FVCist además del patrón de distribución en los tejidos de *T. solium*, que cabe resaltar es distinto al de *T. saginata*. Esto sugiere dos cosas, o que el epítoto esta representado en dos antígenos distintos, o que el antígeno reconocido se organiza de forma distinta en cada especie. Así mismo, la abundancia del antígeno en *T. solium*, explica por que el anticuerpo parecía en un principio exclusivo de este parásito.

En el ensayo de proporciones que se hizo para determinar la concentración a la que puede detectarse el antígeno de ESTsol, se encontró que aproximadamente se pueden detectar desde 3.12 µg/mL; sin embargo, esta concentración parece ser muy alta y nos esta indicando que la

proporción del antígeno reconocido por el AcMo F6.64 es menor con respecto al total contenido en el ESTsol. Lo anterior se corrobora con el ensayo de proporciones en el que se utilizó el F6 64* y el ASCist donde se pudo detectar con 20 µg/mL de AcMo F6.64* hasta 0.6 µg/mL del antígeno. Este resultado confirma, que el antígeno detectado por el AcMo F6.64* se encuentra en menor proporción en el ESTsol que en el ASTsol.

Por otro lado, se utilizaron concentraciones altas del AcMo si se compara con los ensayos anteriores en donde con 25 µg/mL del AcMo logró detectar levemente el ESTsol con respecto a los otros antígenos empleados en el mismo ensayo. Así mismo, el AcMo aparentemente se encuentra en exceso, como lo demuestra el ensayo de captura de ESTsol donde se emplearon 50 µg/mL y donde la curva tiende a hacerse asintótica en el punto de 3.12 µg/mL de antígeno. Por esta razón se decidió seguir trabajando con la concentración de 50 µg/mL de AcMo F6.64.

En el ensayo para determinar las concentraciones de trabajo del anti-ESTsol y el ESTsol, con el AcMo F6.64* como segundo anticuerpo, los valores de absorbancia de fondo (sin antígeno) pueden estar dando por un pegado inespecífico del AcMo F6 64* debido a la alta concentración con que se maneja este anticuerpo (100 µg/mL), sin embargo, estos valores de fondo se mantienen por abajo de los valores correspondientes a las diferentes concentraciones de antígeno.

En el ensayo de captura de antígeno con el AcMo F6.64 como primer anticuerpo, tal como se esperaba hubo un incremento sustancial de los valores de absorbancia (de 0.145 a 0.779) con respecto al ensayo donde se utilizó el anti-ESTsol como primer anticuerpo, empleando las mismas concentraciones de antígeno y anticuerpos. Sin embargo los valores de absorbancia de fondo se mantuvieron altos, incrementándose proporcionalmente a la concentración del anti ESTsol lo que puede estar indicando un pegado inespecífico del anticuerpo policlonal, por efecto de un exceso en la concentración empleada.

El objetivo principal de este trabajo es implementar un método de diagnóstico de teniosis por detección de coproantígenos, con este fin se empleó el ESTsol para hacer las pruebas preliminares de captura de coproantígenos debido a que en este antígeno es posible que se encuentre con mayor probabilidad las moléculas liberadas por el adulto de *T. solium*; además, la forma en que se obtiene este antígeno es la más cercana a la natural en la que el parásito libera

sus antígenos al medio, por lo tanto, si se toma en cuenta esta consideración, el reconocimiento de un antígeno en ESTsol es muy importante para el diagnóstico debido a que es muy probable que se encuentre en el medio intestinal donde se aloja el adulto de *T. solium*. En muestras de heces adicionadas con ESTsol el AcMo F6.64 es capaz de capturar desde 1.25 µg/mL de antígeno, sin embargo, en este ensayo y al igual que en el anterior hay un valor de fondo con incremento proporcional a la concentración del anti ESTsol en ausencia de antígeno. Este valor de fondo puede estar relacionado con un pegado inespecífico del anti ESTsol. Por otro lado, el AcMo F6 64 reconoce una molécula que parece encontrarse en una concentración muy baja en el ESTsol, ya que en una detección directa con el AcMo F6.64* se pueden detectar 3.12 µg/mL de ESTsol y 0.6 de ASTsol con 100 y 20 µg/mL del AcMo respectivamente. Es decir, que la molécula reconocida por el AcMo F6.64 se encuentra en muy baja concentración en el ESTsol, lo cual plantea un problema difícil de resolver, ya que si la molécula reconocida por el AcMo no se encuentra en cantidad suficiente para ser detectada, el diagnóstico no se podrá realizar. Por último, es necesario hacer pruebas con muestras de heces positivas a *T. solium* para comprobar la factibilidad de utilizar el AcMo F6.64 en el diagnóstico de este parásito.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Se obtuvo un AcMo que en ELISA de captura de antígenos y utilizando el sobrenadante del hibridoma directo, reconoce solamente a *Taenia solium*, pero que al utilizarlo en forma pura reconoce también a *Taenia saginata* aunque con menor intensidad.

Por IET, el AcMo reconoce diferencialmente antígenos de *T. solium* y *T. saginata*.

El reconocimiento diferencial de los antígenos de *T. solium* y *T. saginata* por F6.64 en la IFI refuerza las diferencias entre estos dos parásitos.

La naturaleza glicoproteica de los antígenos reconocidos concuerdan con la distribución de los antígenos reconocidos por el AcMo F6.64 y abre la posibilidad de encontrarlos en los sueros de pacientes con cisticercosis.

El reconocimiento de ESTsol en muestras de heces creadas, abre la posibilidad de detectar antígenos de *T. solium*. Sin embargo, el diagnóstico se puede ver dificultado debido a que el antígeno solo puede ser detectado a altas concentraciones de ESTsol, por lo cual es necesario hacer las pruebas de reconocimiento en muestras positivas reales. Una alternativa a las muestras de seres humanos sería el uso de muestras de heces de hamster infectado con *T. solium*. Si las pruebas en hamster resultan positivas, se pasará al siguiente nivel que será probar en muestras de heces de humano con la dificultad que conlleva el obtener dichas muestras.

La purificación del antígeno reconocido por el AcMo F6.64 permitirá profundizar más en el estudio de *T. solium*.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo-Hernández A (1982). **Economic impact of porcine cysticercosis**. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds). **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives**. Academic Press. N.Y. 63-67.

Aluja AS, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Lacleste JP, Larralde C, Madrazo I, Velázquez 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. 201.

Allan JC, García Domínguez C, Craig PS, Rogan TM, Lowe BS, Flisser A. (1991). **Sexual development of *Taenia solium* in hamsters**. Ann. Trop. Med. Parasitol. **85**: 473-477.

Allan JC, Mencos F, García-Noval J, Sarti E, Flisser A, Wang Y, Liu D, Craig PS. (1993). **Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia solium* coproantigens in humans**. Parasitology. **107**: 79-85

Allan JC; Craig PS; García Noval J; Mencos F; Liu D; Wang Y; Wen H; Zhop P; Stringer R; Rogan M. (1992). **Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniasis in dogs and humans**. Parasitology. **104**: 347-355

Allan JC, Velasquez-Tohom M, Fletes C, Torres-Alvarez R, Lopez-Virula G, Yurrita P, Soto de Alfaro H, Rivera A, Garcia-Noval J. (1997). **Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs**. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **91**: 595-598.

Ambrosio J, Cruz-Rivera M, Allan J, Morán E, Ersfeld K, Flisser A (1996). **Identification and partial characterization of a myosin like-protein from cysticerci and adults of *Taenia solium* using a monoclonal antibody**. Parasitology. **116**: 545-553.

Barker CF, Billingham RE. (1977). **Immunologically privileged sites**. En: **Advances in Immunology**. Kunkel HG, Dixon FJ (eds) Academic Press, N.Y. **25**: 1-54.

Bradford MM. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. Anal. Biochem. **72**: 248-254.

- Brandt JR, Gueerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, Falla N. (1992) **A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis**. *Int. J. Parasitol.* **22**: 471-477.
- 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: 363-374.
- Cárdenas F. (1992). ***Taenia solium* ocular cysticercosis: findings in 30 cases**. *Ann. Ophthalmol.* **24**: 25-28.
- Cardigan F, Santon JS, Tanticharoenyus P, Chajcumpa. (1967). **The Lar gibbon as definitive and intermediare host of *Taenia solium***. *J. Parasitol.* **53**: 844.
- 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. (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.
- Correa-Beltrán D, Morales-López Z, Medina-Flores Y, García-Domínguez C, Medina-Escutia E; Mandujano-Martínez A. (1991). **Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*: Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos** Publicación técnica No. 4 del instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) México, D F. 3-28
- Craig PS. (1984). **Circulating antigens, antibodies and immune complexes in experimental *Taenia pisiformis* infections of rabbits**. *Parasitology.* **89**: 121-131.
- Chapman A, Vallejo V, Mossie GK, Ortiz D, Agabian N, and Flisser A (1995). **Isolation and characterization of species- specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in egg detection assay**. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1283-1288.
- Cheng RW, Ko RC (1991). **Cross-reactions between crude antigens of larval *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*) and other helminths of pigs**. *Vet Parasitol.* **39**: 61-170.

- Del Bruto OH, Rajshekhar V, White Jr. AC, Tsang V, Nash TE, Takayanagui OM, Schantz PM, Evans CAW, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JD, Sarti EC, González AE, Gilman RH, García HH (2001). **Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis**. *Neurology*. **57**: 177-183.
- Díaz-Camacho S, Candil-Ruioz A, Suate PV, Zazueta R, Félix M, Lozano R, Willms K. (1991). **Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural vilage of México**. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **45**: 522-531.
- Díaz-Camacho S, Candil RA, Uribe BM, Willms K. (1990). **Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in México**. *Trans. Roy Soc Trop. Med. Hyg.* **84**: 563-566.
- Díaz-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. 243-250.
- Díaz F, García HH, Gilman RH. (1992). **Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village**. *Am J Epidemiol.* **135**: 875-882.
- 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**. *Prion 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.
- Elsdon-Dew R, Proctor EM. (1965). **Distinction between *Taeniarhynchus saginata* and *Taenia solium***. *S Afr Sci*; **61**: 215-217.
- Escobedo F. (1988). **Neurosurgical aspects of neurocysticercosis**. En: **Operative Neurosurgical Techniques**. Schmidek and Sweet (eds). Grune and Stratton 2nd Edition. USA. 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.

Estrada JJ, Almon-Estrada J, Kuhn ER. (1989). **Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis.** Am. J. Trop. Med. Hyg **41**: 50-55.

Estrada JJ, Kuhn ER. (1985) **Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and antilarval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis.** J. Neurol Sci. **71**: 39-42.

Faust EC, D' Antoni JS, Odom V, Miller MJ, Pérez C, Sawitz E. (1938). **A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cyst and helminth eggs in feces.** Am J Trop Med. **18**:169-183.

Feldman M, Plancarte A, Sandoval M, Wilson M, Flisser A. (1990). **Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis.** Trans Royal Soc Trop Med Hyg **84**: 559-562.

Flisser A, Bulnes I, Días MN, Luna R, Woodhouse E, Beltrán F, Martínez I, Larralde C. (1976). **Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del Estado de Chiapas.** Arch. Invest. Méd. **7**: 107.

Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. (1980). **Human cysticercosis: antigens, antibodies and non responders.** Clin. Exp. Immunol **39**: 27-37.

Flisser A, Larralde C. (1986). **Cysticercosis.** En: Immunodiagnosis of parasitic diseases. Walls KW, Schantz PM (eds). Academic Press Orlando, EUA. 109-161.

Flisser A, Madrazo I, Delgado H. (1997). **Cisticercosis humana.** Ed. El Manual Moderno México DF. 176.

Flisser A, Plancarte A, Avila G. (1994). **Aplicación de métodos de diagnóstico de cisticercosis y teniasis a estudios epidemiológicos.** Rev. Fac. Med. UNAM **37**: 82-86.

Flisser A. *Taenia solium*, *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana*. (1995). En: **Enteric infection 2. Intestinal helminths.** Farthing MJG, Keusch GT, Wakelin D. Chapman & Hall Medical. London 173-189.

- García HH, Martínez M, Gilman RH, Herrera G, Tsang VCW. (1991). **Diagnosis of cysticercosis in endemic regions**. *Lancet*. **338**: 549-551.
- García-Noval J, Allan JC, Fletes C, Moreno E, De Mata F, Torres-Alvarez R, Soto de Alfaro H, Yurrita P, Higueros-Morales H, Mencos F, Craig PS (1996). **Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities**. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**: 282-289.
- Gavilondo JV. (1994). **Anticuerpos Monoclonales**. Elfos. La Habana, Cuba.
- Gnezdilov V.G. (1957) **The golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse) as potential definitive host of tapeworm *Taenia solium***. *Zoologicheski zhurnal*. **36**: 1770-1773.
- Goding JW. (1996) **Monoclonal Antibodies: principles and practice**. Third edition. Academic Press Limited. London: 121-122.
- Goldsmith RS, Kagan IG, Reyes G, Cedeño FJ. (1971). **Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México**. *Bol. Ofna. Sanit. Panam.* **71**: 500-506.
- Gomes E, Veiga M, Katiane E, Rabelo R, Bernardo M, Meza-Lucas A, Tapia-Romero R, Carillo-Becerril BL, Alcantara-Anguiano I, Correa D, Melo A. (2002). **Taeniasis and cysticercosis prevalence in a small village from northeastern Brasil**. *Arq Neuropsiquiatr.* **60**: 219-223.
- González D, Rodríguez-Carbajal J, Aluja A, Flisser A 1987. **Cerebral cysticercosis in pigs studied by computed tomography and necropsy**. *Vet. Parasitol.* **26**: 55-69.
- González LM, Estrell M, Leslie JS, Harrison R, Parkhouse ME, Garate T. (2000). **Differential Diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* Infection by PCR**. *J. of Clin. Microbiol.* **38**: 737-744.
- Harnet W. (1988). **The antihelminthic action of praziquantel**. *Parasitol today* Vol 4, No. 5: 144-146.
- Harrison LJS, Joshua GWP, Wright Sh, Parkhouse RME. (1989). **Specific detection of Circulating surface-secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis**. *Parasite Immunol.* **11**: 351-370.
- Horibata K, Harris AW. (1970). **Mouse myelomas and lymphomas in culture** *Exp. Cel. Res.* **60**: 61-70.

- Jagota SC. (1986). **Albendazole, a broad-spectrum antihelmintic, in treatment of intestinal nematode and cestode infection: a multicenter study in 480 patients.** Clin Ther. **8**: 226-231.
- Kohler G, Milstein C. (1975). **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.** Nature. **256**: 495-497.
- 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, 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.
- Laemmli E K. (1970). **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. **227**: 680-685.
- Lamothe A, García P (1985). **Céstodos, parásitos del hombre.** Salud Pública Méx. **27**: 419-435.
- 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.
- Larralde C, Padilla A, Henández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutierrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. (1992). **Seroepidemiología de la cisticercosis en México.** Sal. Púb. Méx. **34**: 97-210.
- Macías SR, Hernández Peniche J. (1966) **Cisticercosis cerebral.** Prens. Méd. Mex. **5**: 147-152.
- Malagón F. (1989). **Elementos del binomio Taeniosis/Cisticercosis.** Una síntesis. En: Flisser A, Malagón F. Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. Limusa Noriega, Mex. 3-6.
- Maravilla P, Avila G, Cabrera V; Aguilar L, Ana Flisser, (1998). **Comparative development of *Taenia solium* in experimental models.** J Parasitol; **84**: 882-886.
- Mayta H, Talley A, Gilman RH, Jimenez J, Verastegui M, Ruiz M, Garcia HH, González AE. (2000) **Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* infections by simple hematoxylin/eosin staining and PCR-restriction enzyme analysis.** J. Clin Microbiol. **38**: 33-137.

- Milstein C, Cuello AC. (1984). **Híbrido hybridomas and the production of biespecific monoclonal antibodies**. Immunol Today. **5**:10
- Miller B, Grimell V, Goldberg MA, Heiner D. (1983). **Spontaneous radiographic disappearance of cerebral cysticercosis: three cases**. Neurology. **33**: 1377-1379
- Newell E, Vyungimana F, Geerts S, Van Kerckhoven I, Tsang VCW, Engels D. (1997). **Prevalence of cysticercosis in epileptics and members of their families in Burundi**. Trans. Roy. Soc. trop Med. Hyg. **91**: 389-391.
- 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.
- Organización Panamericana de la Salud. (1994). **Epidemiología y control de la taeniosis y cisticercosis en América Latina**. Washington D.C. OPS/OMS.
- Pathak KM, Allan JC, Ersfeld K, Craig PS. (1994) **A western blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs**. Vet. Parasitol. **53**: 209-217.
- Pawlowski ZS, Schultz MG. (1972). **Taeniasis and cysticercosis**. Adv Parasit. **10**: 269-343.
- Perera D, Western Ka, Scultz MG. (1970). **Niclosamide treatment of cestodiasis**. Am J. Trop Med. Hyg **19**: 610-612.
- Plancarte A, Hirota C, Martínez-Ocaña J, Mendoza-Hermández G, Zenteno E, Flisser A. (1999). **Characterization of GP39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* Cysticerci and of their antigenic GP10 subunit**. Parasitol Res. **85**: 680-684.
- Potter M. (1972). **Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice**. Physiol. Rev. **52**: 631-719.
- Proaño-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, García-Jerónimo RC, Correa D. (2002). **Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double blind comparison of ELISA and EITB**. J Clin. Microbiol. **40**: 2115-2118
- Proctor E M. (1972). **Identification of tapeworms**. S Afr. Med. J **46**: 234-238.

- Rabiela T, Flisser A. (1990). **Morphological types of *Taenia solium* cysticerci**. Parasitol. Today, 5: 357-359.
- Rabiela-Cervantes MT. (1989) **Patología de la neurocisticercosis benigna y grave**. En: Flisser, A, Malagón. **Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México**. Limusa-Noriega, México, D F. 107-126.
- Ramírez-Bon E, Merchant MT, González 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, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Academic Press, New York: 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.
- Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Días ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. (1992). **Disappointing performance of serology enzyme-linked immunosorbent assay in an unbiased sample of neurological patients**. Arch. Neurol. 496: 633-636.
- Rhoads ML, Kananga-Sollo EIP, Rapic D, Murrell KD, Schantz PM, Beus A. (1987). **Detection of antibody in humans and to *Taenia solium* metacestodes using an antigenic fraction from *Taenia hydatigena* metacestodes**. Veterinar Archiv. 57: 143-150.
- Richards F, Schantz P. (1991). **Laboratory diagnosis of cysticercosis**. Clin in Lab. Med. 11:1011-1027.
- Ritchie LS. (1948). **An ether sedimentation technique for routine stool examination**. Bull US Army Med Dept. 8: 326
- Rodriguez-Canul R, Allan JC, Fletes C, Sutisna IP, Kapti IN, Craig PS. (1997) **Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis**. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4: 579-582.
- Rodríguez-Carbajal J, Boleaga-Durán B. (1982). **Neuroradiology of human cysticercosis**. En: Cysticercosis. Present state of Knowledge and perspectives. Flisser A, Williams K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltrán F. Academic Press, New York 139-162.

- Rodriguez-del-Rosal E, Correa D, Flisser A. (1989). Swine cysticercosis: detection of parasite products in serum by EIA. 1989. *Veterinary Record*. **124**: 488-488
- Sarti E, Schantz PM, Lara-Aguilera R, Gómez H, Flisser A. (1988). ***Taenia solium* teniasis and cysticercosis in a mexican village** *Trop Med. Parasit.* **39**: 194-198.
- Sarti E, Schantz PM, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, López SA, Roberts J, Flisser A. (1992). **Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, México.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* **46**: 677-685.
- 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: 233-242.
- Sarti E. (1997) **Teniosis y Cisticercosis en México.** En: **NEUROCISTICERCOSIS.** Arriagada C, Nogales J, Apt werner. ARRYNOG Ediciones: 5-22.
- 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 PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer 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 México.** *Clin. Infect. Dis.* **18**: 879-885.
- Schantz PM, Sarti E. (1989). Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leidensia* **57**: 153-163.
- Smyth JD, McManus DP. (1989). **The physiology and biochemistry of cestodes.** Cambridge University Press. Great Britain: 5-51.
- 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.
- Sutisna I, Fraser A, Kapti N, Rodriguez-Canul, Widjana P, Craig P y Allan J.C (1999). **Community prevalence study of taeniasis and cysticercosis in Bali, Indonesia.** Trop. Med. and Int. Health. **4**: 288-294
- Tellez-Girón E, Ramos M, Dufour L, Alvarez P, Montante M. (1987). **Detection of *Cysticercus cellulosae* antigens in the cerebrospinal fluid by dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standard ELISA.** Am J. Trop. Med. Hyg. **37**: 169-173.
- Thornton H, Golsmid JM. (1973) **Cellophane tape as an aid to the detection of *Taenia saginata* eggs.** Centr. Afric. J. of Med. **19**: 149-151.
- Torre-Blanco A. (1982). **The collagen of *cysticercus cellulosae*: a study in the comparative biochemistry of collagen.** 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. 423-436.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.** Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350-4354.
- 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.
- Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RM, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, Ferreira AW. (1997). **Immunoblot with cerebrospinal fluids from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*.** Am. J. Trop. Med. Hyg. **57**: 354-357.

- Vázquez V, Sotelo J. (1992). **The course of seizures after treatment of cerebral cysticercosis.** New Engl. J. Med. **327**: 696-701.
- Velazco, Guzmán C, Gutiérrez QM, Romero V y Pulido RMa. (1983). **Comparación de una técnica de detección de antígenos solubles de *Cisticercus cellulosae*** Salud Publica de México. **25**: 2: 205.
- Verster A. (1969). **A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus, 1758** Onderstepoort Journal of Veterinary Research. **36**: 3-58.
- Verster A. (1971). **Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782.** Onderstepoort Journal of Veterinary Research. **38**: 63-64.
- Villagran-Urbe J, Olvera-Rabiela JE. (1989). **La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México, En: Flisser A, Malagón F (eds): Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México,** México: Limusa-Noriega. 97-105.
- Wilkins P; Allan JC; Verastegui M; Acosta M; Eason AG; García HH; González AE; Gilman RH; Tsang VC; (1999). **Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis.** Am J Trop Med Hyg; **60**(2): 199-204.
- Yonghao Z, Junping L, Minru Z, Xiaohan W, Chen L. (1995). **Observation on dynamics of circulating antigen from patients with cysticercosis before and after treatment.** Chin. J. of Parasit. and Dis. **13**: 225-226.
- Yoshino K. (1933) **Studies on the postembryonal development of *Taenia solium* part II. On the youngest form of *Cisticercus cellulosae* and on intermediate host.** J. Med. Ass. Formosa. **32**.

APÉNDICE A. ABREVIATURAS

AcMo:	Anticuerpo monoclonal.
AgBCist:	Antígeno B de Cisticerco.
ASCist:	Antígeno Somático de Cisticerco.
ASTsag:	Antígeno Somático de <i>Taenia saginata</i> .
ASTsol:	Antígeno somático de <i>Taenia solium</i> .
Balb/c:	Línea de ratones singénicos.
CD34:	Correceptores de linfocitos T.
CPS:	Estudios Coproparasitoscópicos.
Dot Blot:	Técnica de Inmunopunto.
EDTA:	Ac. Etilen Diamino Tetra Acético.
ELISA:	Ensayo Inmunoenzimático.
ENSE:	Encuesta Nacional Seroepidemiológica.
ESCist:	Antígeno de Excreción Secreción de Cisticerco de <i>Taenia solium</i> .
ESTsol:	Antígeno de Excreción Secreción de <i>Taenia solium</i> .
FVCist:	Fluido Vesicular de Cisticerco de <i>Taenia solium</i> .
GliCist:	Glicoproteínas de Cisticerco de <i>Taenia solium</i> .
HAT:	Hipoxantina-Aminopterina-Timidina.
HGPRT:	Hipoxantina-Guanina-Fosforribosil Transferasa.
HPLC:	Cromatografía Líquida de Alta Presión.
HT:	Hipoxantina-Timidina.
IEF:	Inmunoelectroforesis.
IET:	Inmunoelectrotransferencia.
Ip:	Inoculación de antígeno o células vía intraperitoneal.
kDa:	KiloDaltones.
LCR:	Líquido Cefalorraquídeo.
NCC:	Neurocisticercosis.

OMS:	Organización Mundial de la Salud.
PFHM-II:	Medio de cultivo para células libre de proteínas.
PHMB:	P-Hidroxi-Mercuri-Benzoato.
rAgB:	Antígeno B Recombinante.
RM:	Resonancia Magnética.
RPMI-1640:	Medio de cultivo celular.
SDS:	Dodecil Sulfato de Sodio.
SNC:	Sistema Nervioso Central.
PBS:	Solución salina amortiguada con fosfatos.
TC:	Tomografía Computarizada.
TK:	Timidina cinasa.
TLCK:	L-I-Tosilamida-2-2-Fenil-etil-Clorometil-Cetona.
TPCK:	Naptosil-Clorometil-Cetona.
X63-Ag8.653:	Línea de mieloma de ratón Balb/c.

APÉNDICE B. INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras de identificación de <i>Taenia solium</i> .	40
Figura 2: Identificación de <i>Taenia solium</i> por Dot Blot.	40
Figura 3: Electroforesis de antígenos de <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i>	41
Figura 4: Cinética de producción de inmunoglobulinas totales del ratón Lo1 inmunizado con ASTsol	42
Figura 5: Título de anticuerpos IgG del ratón Lo1 después del refuerzo con ASTsol	42
Figura 6: Reconocimiento del ASTsol, ASCist y ASTsag por los AcMo obtenidos en la fusión.	43
Figura 7: ELISA para la determinación de la clase de AcMo producidos por los hibridomas.	43
Figura 8: IET para determinar la individualidad de los AcMo F6 64 y F6.65.	44
Figura 9: ELISA de reacción cruzada del AcMo F6.64 con otros parásitos relacionados-	45
Figura 10: ELISA de reacción cruzada del AcMo F6.64 con algunas bacterias intestinales.	45
Figura 11: Electroforesis del AcMo F6.64 purificado por cromatografía de afinidad	46
Figura 12: Reconocimiento de diferentes antígenos de <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i> por el AcMo F6.64 de diferentes fuentes	47
Figura 13: Ensayo de reconocimiento de miosina por el AcMo F6.64	47
Figura 14a: Reconocimiento por IET en condiciones no reductoras de antígenos de <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i> .	48
Figura 14b: Reconocimiento por IET en condiciones reductoras de antígenos de <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i> .	48
Figura 15: IFI para el reconocimiento <i>in situ</i> de estructuras de <i>T. solium</i> utilizando el AcMo F6.64.	50
Figura 16: IFI para el reconocimiento <i>in situ</i> de estructuras del metacéstodo de <i>T. solium</i> , utilizando el AcMo F6.64.	51
Figura 17: IFI para el reconocimiento <i>in situ</i> de estructuras de <i>T. saginata</i> utilizando el AcMo F6.64.	52
Figura 18: ELISA de proporciones y detección de antígeno para determinar la	

concentración de trabajo óptima del AcMo F6.64* y el ESCist.	53
Figura 19: ELISA de proporciones y detección de antígeno para determinar la concentración de trabajo óptima del AcMo F6.64* y el ESCist.	53
Figura 20: ELISA de proporciones y captura de antígeno de ESTsol con anti-ESTsol y rebelado con el AcMo F6.64*	54
Figura 21: ELISA de proporciones y captura de antígeno de ESTsol con el AcMo F6 64 y rebelado con anti-ESTsol	55
Figura 22: ELISA de proporciones y captura de antígeno de ESTsol con el AcMo F6.64 y rebelado con anti-ESTsol en muestras de heces de humano adicionadas con ESTsol.	55

APÉNDICE C. SOLUCIONES

1- PB 10X, pH 7.2

Pesar 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de sodio monobásico monohidratado) y 11.5 g de Na_2HPO_4 (Fosfato de sodio dibásico anhidro).

Disolver con 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco para disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

2.- PBS, pH 7.2.

Medir 100 mL de PB 10X y agregar 8.75 g de NaCl.

Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

Ajustar el pH a 7.2.

Guardar a 4°C.

3.-Medio RPMI.

Disolver el contenido de un sobre con polvo para un litro de medio, en un litro de agua bidestilada y desionizada.

Agregar 2 g de bicarbonato de sodio y 2 g de HEPES.

Ajustar el pH a 6.8 (con NaOH 1N o con HCl 1N).

Esterilizar con filtro millipore de 0.22 mm.

Almacenar en frascos estériles de 100 mL y guardar a 4°C.

4.- Medio RPMI-1640 complementado (para 1L de medio).

L-glutamina (200mM)	16mL
Aminoácidos no esenciales 100X (Marca)	10mL
b-mercaptoetanol 1000X (GIBCO BRL)	1mL
Antibióticos-antimicóticos 100X (SIGMA)	10mL
Bicarbonato de sodio	2g
HEPES	2g
Pirubato de sodio	0.2g

5.- Solución crioprotectora.

Suero fetal bovino (SIGMA)	90 mL
----------------------------	-------

Dimetilsulfoxido (SIGMA) 10 mL

Mezclar y filtrar con filtro millipore 0.22 μ m.

Almacenar a -20 oC.

6.- Solución amortiguadora de carbonatos, pH 9.8.

Pesar 3.8 g de Na₂CO₃ (carbonato de sodio) más 5.86 g de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio), llevar a 900 mL con agua bidestilada, ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 mL.

Mantener a 4°C.

7.- PBS-Tween 20, 0.05%.

A un litro de PBS pH 7.2 añadir 500 μ L de Tween 20

Guardar a -20 oC.

8.- Solución reguladora de bloqueo con leche descremada al 5%.

Pesar 5 g de leche descremada (DIFCO) y aforar a 100 mL con PBS Tween 20 al 0.05%.

Guardar a -20 oC.

9.- Solución reguladora de bloqueo con leche descremada al 1%.

Pesar 1 g de leche descremada (DIFCO) y aforar a 100 mL con PBS Tween 20 al 0.05%.

Guardar a -20 oC.

10.- Solución de cromógeno-sustrato para revelado con peroxidasa (ELISA).

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina, medir 5 mL de ácido cítrico 0.1M, más 5 mL de citrato de sodio 0.1M y por último añadir 4 μ L de H₂O₂ al 30 %.

Nota: la solución se prepara inmediatamente de usarla y se mantiene en la oscuridad.

11.- Regulador de Tris-glicina 5X.

Para 1000 mL de solución, pesar 12 g de tris-base y añadir 57.6 g de glicina.

Guardar a 4oC

12.- Regulador de tris-glicina para electroforesis.

Medir 200 mL de tris-glicina 5X y agregar 12 mL de SDS al 10 %.

Aforar a 1000 mL con agua bidestilada

Guardar a 4oC.

13.- Solución cromógeno sustrato para revelado de inmunoelectrotransferencia: 3, 3'-diaminobenzidina 0.05% y H₂O₂ 0.003%.

Medir 60 mL de PBS pH 7.2

Agregar 30 mg de 3,3'-Diaminobenzidina.

Agregar 6 µL de H₂O₂ al 30%.

Mezclar por agitación en vortex.

Nota: la solución se hace al momento de ser utilizada.