



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

“Heterogeneidad de la respuesta inmune humoral
en la neurocisticercosis humana”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

MARIO EDUARDO PERÉZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE



MEXICO, D.F



2004

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la división de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: **“Heterogeneidad de la Respuesta Inmune Humoral en la Neurocisticercosis Humana”**.

realizado por **Mario Eduardo Pérez Hernández**

con número de cuenta **9855173-6**, quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Propietario

Dra. Gladis Frago González

Propietario

Dr. Carlos Larralde Rangel

Suplente

Dra. Leonor Huerta Hernández

Suplente

Dr. Raúl José Bobes Ruiz

Consejo Departamental de Biología

M. en C. **Juan Manuel Rodríguez Chávez**

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

Esta tesis fue realizada en el departamento de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Edda Sciutto Conde y la asesoría técnica de la Dra. Leonor Huerta Hernández.

El presente trabajo fue financiado por PAPIIT, clave de proyecto IN231002.

El alumno Mario Eduardo Pérez Hernández con número de cuenta 098551736 recibió beca, clave del proyecto IN231002.

Sólo los instantes impresos rinden al tiempo, abaten
al olvido, el único vestigio que persiste a nuestro extravío.....

DEDICATORIAS

A mis padres, Martha e Isidro, por la incalculable cantidad de esfuerzos y sacrificios que han realizado para que lograra esta meta. Mi más ferviente gratitud y todo mi amor para ellos.

A mis hermanos, Luis, Guadalupe y Martha, compañeros y amigos incondicionales de mi vida.

A Brenda, por la magia de sus instantes.

A Evelyn Vega, por la sabiduría obtenida de nuestro encuentro y las experiencias que nos descubrieron.

A mis amigos, Gabriela, Cynthia, y todos los Guerreros que hicieron de los días en la facultad un fandango inolvidable.

A mi raza, por el valor inherente a su sangre.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo de la Dra. Leonor Huerta Hernández quien me asesoró técnicamente para el desarrollo de este trabajo de tesis.

A la Dra. Edda Sciutto, por las oportunidades brindadas, la paciencia, los consejos y su incansable impulso por la vocación científica.

A la Dra. Agnes Fleury, por la información proporcionada sobre los expedientes de pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, así como por los comentarios realizados sobre este trabajo.

Al Dr. Raúl Bobes, por su amistad y las críticas realizadas al presente escrito.

A la Dra. Gladis Fragoso, por el apoyo otorgado para la realización de esta tesis.

A la Médica Mayra Orechia, por la asistencia proporcionada en la revisión de expedientes de pacientes del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

A la señora Carmen Silva, por el apoyo, los favores y la confianza concedida, sin su ayuda el camino hubiera resultado más difícil.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
Neurocisticercosis	4
Epidemiología	5
Patología	5
Impacto económico	7
Morfología del parásito	7
Ciclo de vida	12
ANTECEDENTES	14
HIPOTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y METODO	20
RESULTADOS	25
DISCUSION	38
CONCLUSION	44
REFERENCIAS	45

RESUMEN

La instalación del cisticerco de *Taenia solium* en el sistema nervioso central produce neurocisticercosis (NC) en el hombre. Esta es una parasitosis de alta endemicidad en México. La NC exhibe una amplia heterogeneidad en su sintomatología y en su presentación imagenológica. Se ha observado que la respuesta inmune humoral asociada a esta enfermedad también es heterogénea al respecto de la sensibilidad y su especificidad. Sin embargo, se encuentra poco explorada esta heterogeneidad con relación a la especificidad de las diferentes subclases de inmunoglobulina G (IgG). Se ha demostrado que la IgG1 y la IgG4 son las de mayor frecuencia en la NC y que la IgG4 se encuentra elevada en la NC silenciosa. El propósito de este estudio es conocer con detalle el repertorio de antígenos reconocidos por IgG1 e IgG4 en muestras de suero y LCR de individuos con NC y asociarlo a su estado clínico e imagenológico.

20 fracciones antigénicas obtenidas por la electroforesis del fluido vesicular de cisticercos de *T. solium* mostraron ser reconocidas diferencialmente, al ser analizadas por el método del inmunoplot, por ambas subclases de IgG en el suero y LCR de pacientes con NC agrupados en cuatro categorías: NC activa, NC inactiva, NC inflamatoria y NC no inflamatoria. IgG4 mostró reconocer un repertorio más amplio y diferente al reconocido por IgG1 en ambas muestras biológicas, principalmente en los casos de NC activa, NC inactiva y NC inflamatoria con el criterio de > de 30 % de sensibilidad y 100 % de especificidad. Sin embargo, a este nivel no se observaron diferencias significativas en el reconocimiento realizado por cada subclase, observándose solamente una mayor frecuencia en el reconocimiento realizado por la IgG1.

El análisis de muestras pareadas (suero y LCR del mismo individuo) sugiere que existen diferencias claras en el repertorio de antígenos que se reconocen en suero y LCR y entre inmunoglobulinas al observarse fracciones antigénicas reconocidas exclusivamente en una de las muestras y por una de las dos subclases estudiadas.

En este trabajo de tesis se señala la clara heterogeneidad de la respuesta inmune humoral asociada a la neurocisticercosis con respecto al repertorio de antígenos que son reconocidas por las subclases de IgG estudiadas.

INTRODUCCIÓN

La cisticercosis causada por el cisticerco de *Taenia solium* es una zoonosis que afecta frecuentemente a humanos y cerdos de países en vías de desarrollo de América Latina, Asia y África (Sotelo, *et al.*, 1996) donde prevalecen los factores que favorecen su transmisión, como son el fecalismo al aire libre y las malas condiciones sanitarias e higiénicas, aunado a la crianza rústica de cerdos y el consumo de carne sin adecuada inspección sanitaria (Gemmell *et al.*; 1982, Aluja *et al.*; 2000). La instalación del cisticerco en el sistema nervioso central produce neurocisticercosis (NC) en el humano, esta es la enfermedad neurológica parasitaria de mayor relevancia (Del Bruto, *et al.*, 1996, 2001; Singhi, 2000; Rosenfeld, 2003) y es la causa más común de epilepsia de aparición tardía en adultos en México (30-50%). La cisticercosis es, además, causa de importantes pérdidas económicas en la porcicultura rústica (Larralde *et al.*; 1992).

La neurocisticercosis es una enfermedad reemergente en países desarrollados, reportándose un incremento en el número de casos en países como Estados Unidos (Stamos, 1996), Canadá, Australia y algunos países de Europa, a consecuencia de la inmigración de personas infectadas provenientes de zonas endémicas (Richard *et al.*; 1991, Rosendfeld *et al.*; 1996, White AC Jr.; 2000, Sciutto *et al.*; 2000; Sotelo y Del Brutto, 2000).

En México es una parasitosis frecuente, de alta endemicidad, las zonas de mayor seroprevalencia en seres humanos se localizan en regiones del centro occidental y el sureste del país (Larralde *et al.*; 1992). La neurocisticercosis resulta así un problema de salud en países endémicos. En México constituye la tercera causa más común de ingresos en el hospital de neurología (INNN) (Fleury, *et al.*; 2003). Existen datos que estiman una prevalencia de neurocisticercosis del 1.3 % al 3.1 % en diferentes estudios de autopsias realizados en el Hospital General de la ciudad de México (Villagrán and Olvera 1988; Del Brutto, *et al.*; 1998).

A escala mundial La organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado un 1.9 % de defunciones por neurocisticercosis y un 3.5 % de cisticercosis en necropsias (OMS, 1979).

Neurocisticercosis

A la enfermedad producida por el parásito cuando se aloja en el sistema nervioso central se le conoce como neurocisticercosis (NC) y es la forma más grave de esta patología en el humano (Lombardo et al. 1982; Estañol 1986; Del Brutto y Sotelo 1988, 2000 White ASC Jr.; 2000). Se estima que anualmente la NC causa alrededor de 50, 000 muertes (Gemmell *et al*; 1983; Román, 2000). En México es la principal causa de consulta neurológica por epilepsia y la causa del 20 al 25 % de las craneotomías (Centeno; 1965, Del Brutto y Sotelo; 1988, Fleury, *et al*; 2003). La NC es una enfermedad pleomórfica que puede cursar sin ninguna sintomatología ó las personas afectadas pueden desarrollar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde leves como cefaleas y crisis epilépticas ocasionales, hidrocefalia (Del Brutto, 1992; Sciutto, 2000) ó algunos otros desórdenes de gravedad, como la hipertensión intracraneana, que pueden llevar hasta la muerte. Antes del uso de drogas cisticidas, se estima que la NC era la causa del 1 – 2 % de todas las muertes en los hospitales generales (Albores-Saavedra *et al*; 1971, Velasco-Suárez *et al*; 1982). El síntoma más frecuente es la epilepsia, observándose en el 50-80% de los casos, particularmente en pacientes con compromiso de parénquima cerebral (Alcalá, 1991; Ferreira, 2002; Del Brutto, 1992; Del Brutto, 1997). Aún cuando las causas involucradas en esta heterogeneidad no han sido sistemáticamente evaluadas, es posible que dependa de un conjunto de factores y mecanismos tanto del hospedero como del parásito.

Epidemiología

En la neurocisticercosis humana la frecuencia de anticuerpos anticisticercosis se ha determinado utilizando diversas pruebas inmunodiagnósticas en diferentes poblaciones, encontrándose prevalencias del 0.1 al 12 %. Con el uso de técnicas más sensibles y específicas, como el análisis inmunoenzimático (ELISA) y la inmunoelectrotransferencia (IET), las frecuencias encontradas en las poblaciones estudiadas, entre 1992 y 1997, se ha mantenido alrededor del 10% (Woodhuose *et al*; 1982; Sarti *et al*; 1986, 1992, 1994). Cabe recordar que la presencia de anticuerpos anticisticercosis son un indicador de contacto con el parásito y no así de infección. Sin embargo, la alta prevalencia reportada tanto en comunidades rurales, en donde se completa el ciclo del parásito, como en medio urbano y en población abierta son buenos indicadores de la endemidad de esta parasitosis en nuestro medio. Las estadísticas oficiales informan un promedio anual de 500 casos de cisticercosis con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100, 000 habitantes, sin diferencias por sexo y señalan como grupo mas afectado el de 15 a 44 años de edad (Correa *et al*; 1994; SSA 1996). Solo existe un estudio de prevalencia realizado en una comunidad rural de Puebla (Fleury *et al*; 2003) en donde se reportó una mayor prevalencia en individuos mayores a 60 años. Aunque en estos estudios resulta difícil distinguir si el aumento de la prevalencia es consecuencia de la exposición acumulada o de una mayor susceptibilidad del hospedero, es alarmante la alta prevalencia (9.4%) en área rural, misma que se ha confirmado con mayor amplitud en otra comunidad rural del Estado de Morelos que presenta condiciones similares de vida (Fleury *et al*; 2004, sometido a publicación).

Patología

El aspecto de los cisticercos y la severidad de los cambios tisulares alrededor de los mismos parece relacionarse con su localización en el sistema nervioso central. Los cisticercos en parénquima cerebral suelen ser pequeños, probablemente debido a que la presión que ejerce el parénquima cerebral impide

un mayor crecimiento del parásito. Cuando se encuentran en etapa vesicular desencadenan una escasa reacción inflamatoria perilesional. Dicha reacción está principalmente constituida por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos; quienes son los responsables de la eventual destrucción del parásito y su subsecuente transformación en un nódulo calcificado. Sin embargo, la severidad de la reacción inflamatoria es altamente variable. Una vez que los cisticercos alcanzan la etapa coloidal, se rodean de una gruesa cápsula de tejido colágeno y el infiltrado inflamatorio perilesional usualmente incluye al parásito propiamente dicho. El parénquima cerebral muestra una intensa gliosis reactiva de tipo astrocitaria, con proliferación de células de microglia, edema difuso, cambios degenerativos neuronales e infiltrado perivascular de linfocitos. Cuando los parásitos mueren, el edema disminuye, pero los cambios glióticos perilesionales suelen ser más intensos que en las etapas anteriores.

Los cisticercos del espacio subaracnoideo también pueden ser pequeños cuando se localizan en la profundidad de los surcos corticales, entre dos circunvoluciones cerebrales. Sin embargo, cuando estos se localizan en las cisternas de la base, algunos pueden alcanzar tamaños de 5 centímetros o más, probablemente debido a que su crecimiento no está detenido por la presión ejercida por el parénquima cerebral vecino. Estos cisticercos pueden causar síntomas neurológicos focales y aumentar la presión intracraneal; también pueden desencadenar una intensa reacción inflamatoria en las meninges, con formación de un denso exudado compuesto principalmente por fibras de colágeno, células gigantes multinucleadas, eosinófilos y membranas parasitarias hialinizadas, este exudado compromete varias estructuras cerebrales, dando como consecuencia el desarrollo de hidrocefalia.

Los cisticercos ventriculares pueden desencadenar una intensa reacción inflamatoria perilesional debido a la liberación de antígenos en el líquido cefalorraquídeo produciendo una ventriculitis o una meningitis crónica que puede convertirse en aracnoiditis. Si la reacción inflamatoria ocurre cuando los cisticercos se encuentran adheridos al plexo coroideo o a la pared ventricular, la capa de

células endoteliales se altera y se forman células gigantes subendoteliales. Estas células tienden a agruparse y protruir hacia el interior de las cavidades ventriculares, lo cual puede ocluir el libre tránsito del líquido cefalorraquídeo. Este proceso se denomina endotelitis granular y condiciona hidrocefalia obstructiva.

Finalmente, los cisticercos localizados en el espacio leptomeningeo espinal también condicionan cambios inflamatorios en los nervios raquídeos de una manera similar a lo que los cisticercos menígeos hacen con los nervios craneales.

Impacto económico

En 1992 los costos por tratamiento para NC se estimaron en 82 millones de dólares (Roberts *et al*; 1994), a lo que hay que agregarle, las pérdidas económicas ocasionadas por incapacidad para trabajar de muchas de las personas infectadas (Tsang y Wilson, 1995).

En el campo de la porcicultura, la cisticercosis en cerdos también causa considerables pérdidas económicas debido al decomiso de carne infectada en los rastros. En 1980, las pérdidas por decomiso alcanzaron los 43 millones de dólares (Acevedo-Hernández, 1989), lo que representó el equivalente al 68% del total de la inversión en la producción de cerdos. Las prevalencias de cisticercosis porcinas estimadas a partir de las cifras de cerdos que llegan a los rastros, y que no reflejan el número de animales criados rústicamente y sacrificados de manera clandestina (y de mayor proporción), informan una tasa cruda anual de 0.22 x 100 cerdos (1991) aunque por inspección de lengua las cifras van de 1.4 a 4.0 % y por Inmunoelotransferencia (IET) de 4.1 a 7.0 % (Sarti *et al*; 1992)

Morfología del parásito

Los cestodos son organismos acelomados con simetría bilateral. En general se caracterizan por ser planos, segmentados hermafroditas y carecer de tubo digestivo. El parásito adulto de *T. solium* tiene apariencia de listón y puede medir

de 1.5 a 5 m de largo. Su cuerpo presenta un órgano fijador denominado escólex (Figura 1) (Smyth, 1994), que le permite fijarse a la mucosa intestinal del hospedero a través de sus cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos (Merchant *et al*; 1998). La corona externa posee de 11 a 14 ganchos largos (de 0.13 a 0.16 mm), mientras que la corona interna esta formada por un número similar de ganchos pequeños (de 0.10 a 12 mm) (Vester, 1969). Enseguida del escólex se encuentra una zona de crecimiento con alta actividad mitótica llamada cuello, que de origen al estróbilo (Figura 2). El estróbilo está formado por una serie de segmentos denominados proglótidos, los cuales se encuentran en distintos grados de diferenciación dependiendo de la posición que ocupen en el estróbilo. Los más cercanos al cuello son inmaduros sin órganos sexuales desarrollados. Les siguen los proglótidos maduros, que han desarrollado órganos sexuales masculinos y femeninos, lo que les da ha estos parásitos su carácter hermafrodita. Los más lejanos al escólex son los proglótidos grávidos, que se encuentran llenos de huevos.



Figura1. Escolex de metacéstodo de *T. solium*. Estudio por microscopía electrónica de barrido. Dr. José Luis Molinari.



Figura 2. Escolex y estrobilo de *T. solium*

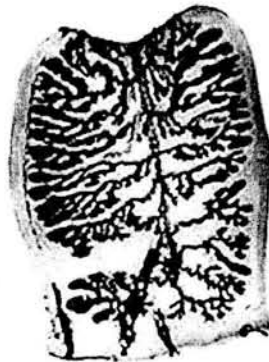


Figura 3. Proglotido grávido de *T. solium*

Los huevos son esféricos, miden alrededor de 30 μm de diámetro y tienen una apariencia radial cuando se observan bajo el microscopio de luz (Flisser *et al*; 1997). Contiene un embrión hexacanto, llamado así por presentar seis ganchos. Varias envolturas rodean al embrión, cada una con características particulares (Laclette *et al*; 1982). El vitelo delimitado por su cápsula constituye la envoltura más externa del huevo. Esta capa delgada y lábil se presenta como una envoltura sincicial caracterizada por la presencia de elementos citoplasmáticos tales como mitocondrias y glucógeno. El vitelo no se encuentra presente en los huevos encontrados en la materia fecal, y se sugiere que se encarga de la protección y nutrición de la oncosfera antes que el embrióforo esté bien formado. Por debajo de

la envoltura vitelar se encuentra la membrana embriofórica externa, la cual se presenta como una membrana flexible y discontinua con apariencia de cráter, muy relacionada con la superficie externa del embrióforo. El embrióforo es la cubierta más importante del huevo, protege al embrión mientras el huevo está en el ambiente exterior y está formado por bloques electrodensos de proteínas parecida a queratina, unidos por una sustancia cementante. Estos bloques proteicos son resistentes a jugos digestivos, no así la sustancia cementante, permitiendo la separación de los bloques al pasar por el tubo digestivo del hospedero, liberándose así la oncósfera. La célula embriofórica, la cual se extiende por la superficie interna del embrióforo, es de origen sincicial y tiene una apariencia globular debido a la presencia de abundantes elementos parecidos a los ribosomas. Se considera que la función de esta envoltura es la de sintetizar al embrióforo. La envoltura más interna es la membrana oncosferal, la cual es impermeable a las condiciones ambientales externas, pero se vuelve permeable cuando se pone en contacto con el jugo gástrico, permitiendo la activación del embrión expuesto (Laclette *et al*; 1982).

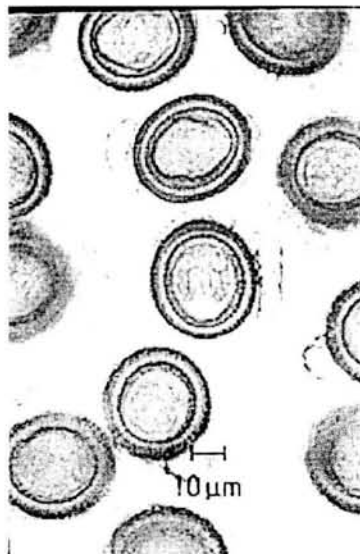


Figura 4. Huevos de *T. Solium*.

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula traslúcida redonda u ovoide de 0.5 a 2 cm de diámetro, con un escólex invaginado y opaco, semejante al de la etapa adulta. La vesícula está llena de fluido transparente llamado fluido vesicular, que contiene proteínas del parásito y del hospedero (Ambrosio *et al*; 1994). La superficie de la pared vesicular está formada por el tegumento que es un citoplasma sincicial, anucleado y continuo, cuya membrana externa se encuentra aumentada por proyecciones digitiformes llamadas microtricas recubiertas por un abundante glicocálix.

Los estudios histopatológicos favorecen el concepto de que los cisticercos se forman luego de que el embrión hexacanto (oncósfera) se implanta en el sistema nervioso central. Se pueden identificar diferentes estadios a lo largo de la vida del parásito en el sistema nervioso central de los que se pueden clasificar de la siguiente manera:

ESTADIO VESICULAR

La membrana vesicular del parásito es delgada transparente y se encuentra llena de fluido vesicular claro; dentro de la vesícula hay una larva invaginada de forma enrollada esférica. El escólex en el interior de las vesículas es de aspecto normal. Los cisticercos pueden permanecer durante décadas en este estadio, o bien pueden entrar en un proceso de degeneración que termina con la muerte del parásito (Davis, 1996) en el que probablemente participe la respuesta inmune que el hospedero desarrolla contra el parásito.

ESTADIO COLOIDAL

Es el siguiente estadio, en donde el parásito comienza a mostrar cambios degenerativos debido al envejecimiento o por factores inmunológicos del hospedero y la incapacidad de la larva de convertirse en tenia adulta. El líquido vesicular se torna viscoso y turbio y el escólex muestra signos de degeneración hialina y mineralización. En esta etapa, la pared del quiste comienza a desprender

antígenos que pueden desencadenar una reacción inflamatoria intensa en el tejido cerebral adyacente. En respuesta a la inflamación, los fibroblastos forman una estructura en forma de cápsula que rodea el quiste.

ESTADIO CALCIFICADO

En este estadio el material granular se mineraliza completamente. Todo el parásito se transforma en un pequeño nódulo calcificado e inerte de la mitad o una cuarta parte de su tamaño original.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. solium* involucra a los seres humanos como único hospedero definitivo (que aloja a la tenia adulta), y al cerdo como principal hospedero intermediario (que aloja a los cisticercos), cuando el humano consume carne de cerdo infectada y poco cocida, ingiere uno o varios cisticercos viables. La larva o cisticerco evagina en respuesta a las sales biliares y tripsina, adhiriéndose a la superficie de la pared del intestino delgado y se desarrolla hasta alcanzar la forma adulta en 4 meses. Los individuos infectados con la forma adulta del parásito liberan en sus heces proglótidos y huevos que de esta manera contaminan el medio ambiente. Los gusanos adultos de *T. solium* liberan espontáneamente entre 4 – 5 proglótidos cada día y cada proglótido grávido contiene entre 30,000 a 50,000 huevos, los cuales, alrededor del 50 % contienen embriones infectivos. La contaminación de agua y alimentos con los huevos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene personal.

El ciclo de vida se completa cuando el cerdo ingiere heces contaminadas con huevos. Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen las envolturas protectoras del huevo liberando al hexacanto (Laclette *et al*; 1982), el cual atraviesa la mucosa intestinal para alcanzar los capilares sanguíneos y

linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en cisticerco.

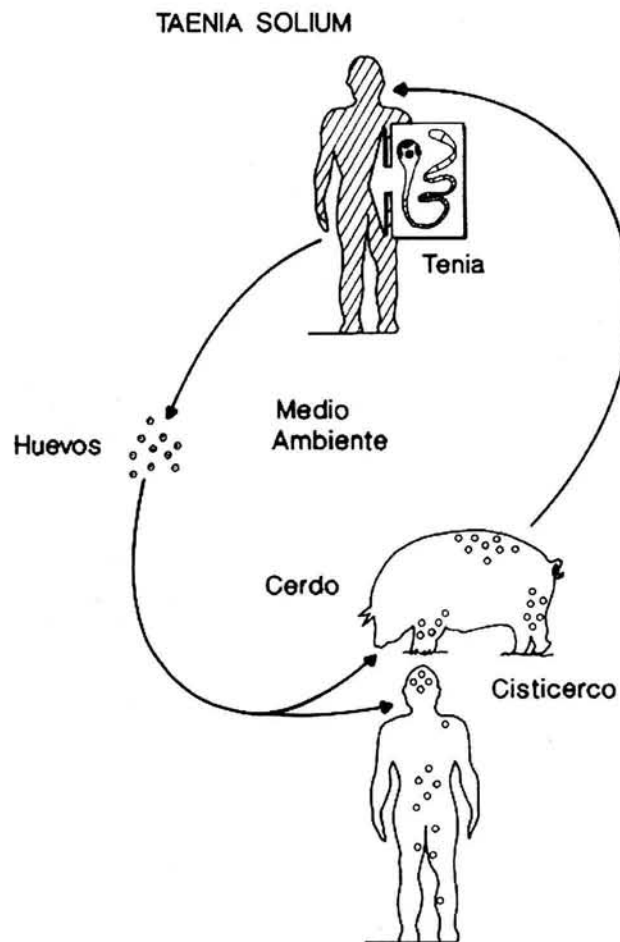


Figura 5. Ciclo de vida de *Taenia solium*

ANTECEDENTES

La neurocisticercosis es una enfermedad parasitaria que presenta una amplia heterogeneidad en su sintomatología y en su presentación imagenológica. Al respecto de las formas clínicas de esta parasitosis, puede presentarse con ausencia total de sintomatología (Fleury *et al*; 2003), manifestaciones clínicas moderadas, desde cefaleas hasta epilepsia, o hasta ser causa de hipertensión intracraneal poniendo en riesgo la vida del paciente (Fleury *et al*; 2004).

Al respecto de la heterogeneidad imagenológica puede observarse una gran variación en el número de quistes que se instalan en el sistema nervioso central (desde quistes únicos a múltiples), en su localización (parénquima, espacio subaracnoideo, ventrículos, medula espinal), en su tamaño, su estadio (vesicular, coloidal o calcificados). También es posible observar en estudios de imágenes la gran heterogeneidad al respecto de la intensidad de la reacción inflamatoria asociada a la presencia de cada parásito (Restrepo, 1998; Fleury *et al*; 2004). Aún cuando las causas de esta heterogeneidad no han sido sistemáticamente evaluadas, es posible que dependa de un conjunto de factores y mecanismos tanto del hospedero como del parásito. Es probable que factores del hospedero como el género, la edad y perfil genético e inmunológico estén involucrados en la heterogeneidad de la enfermedad.

Aunada a esta heterogeneidad clínica e imagenológica no resulta sorprendente que también la respuesta inmune asociada a la neurocisticercosis sea heterogénea. En este sentido, la respuesta inmune humoral ha sido la más ampliamente estudiada en vista de su potencial para el desarrollo de métodos diagnósticos. En términos cuantitativos se ha observado que algunos individuos no presentan niveles detectables de anticuerpos contra el parásito mientras que otros presentan desde muy bajos niveles hasta muy altos niveles tanto séricos como en líquido cefalorraquídeo. A pesar de que esta heterogeneidad no ha sido metódicamente valorada, existe el consenso que al respecto de niveles de anticuerpos, son más homogéneos en el líquido cefalorraquídeo que a nivel

sérico, lo que podría ser consecuencia de que los anticuerpos séricos se asocian más claramente a exposición que a infección (Ramos-Kuri *et al*; 1989). Existe menor información respecto a la heterogeneidad de la respuesta humoral relativa a su especificidad. Una alternativa con el propósito de estudiar esta heterogeneidad es definir especificidad en términos del perfil de fracciones antigénicas obtenidas por separación electroforética según su peso molecular en geles y reconocidas por anticuerpos utilizando inmunoelectrotransferencia. En este sentido se ha reportado la extensa heterogeneidad en las especificidades de la respuesta inmune humoral asociada a la neurocisticercosis, si bien no se ha evaluado extensamente ni se han explorado los posibles factores asociadas a la misma (Larralde *et al*; 1989). Menos aún se ha explorado la heterogeneidad en especificidades en diferentes subclases de inmunoglobulinas, aunque algunos estudios han demostrado que las subclases IgG1 e IgG4 son las más predominantes en la neurocisticercosis (Yang *et al*; 1998; Chavarria *et al*; 2003), y que la IgG4 se encuentra más elevada en la neurocisticercosis silenciosa (Chavarria *et al*; 2003).

Esta heterogeneidad es uno de los factores que ha obstaculizado el desarrollo de un método inmunodiagnóstico eficiente. Así el diagnóstico de la neurocisticercosis continua estableciéndose sobre la base de criterios clínicos, epidemiológicos y métodos imagenológicos (Tomografía Axial Computarizada y Resonancia Magnética Nuclear). Los métodos inmunológicos de detección de anticuerpos o antígenos solo se consideran como un elemento adicional para establecer el diagnóstico. El diagnóstico clínico se dificulta por el polimorfismo y los síntomas no específicos que puede presentar esta enfermedad (Bueno *et al*; 2001; Del Brutto *et al*; 2001).

Para el inmunodiagnóstico de la NC se han desarrollado procedimientos basados en la detección de anticuerpos así como de antígenos.

Para la detección de anticuerpos se han evaluado diferentes técnicas desde la fijación del complemento, hemaglutinación (Larralde *et al*; 1986) hasta más recientemente ensayos inmunoenzimáticos, ELISA y Western blot (Gekeler *et al*; 2002; Mittal *et al*; 2001; Proaño *et al*; 2002; Shiguekawa *et al*; 2000). Estos procedimientos han sido evaluados usando diferentes componentes antigénicos provenientes del parásito. Al respecto del uso de antígenos naturales del parásito se han evaluado desde extractos totales de cisticercos de *T. solium* (Larralde *et al*; 1989), fluido vesicular (Larralde *et al*; 1986; Dekumyoy *et al*; 2000), escólex (Nascimento *et al*; 1987) y antígenos de secreción (Molinari *et al*; 2002). Más recientemente, se ha propuesto el uso de antígenos heterólogos de cisticercos de la *Taenia crassiceps* (Larralde *et al*; 1990; Peralta *et al*; 2002; Pardini *et al*; 2002; Núñez *et al*; 2000). Más recientemente, se han comenzado a evaluar diferentes antígenos purificados (da Silva *et al*; 2000; Ev *et al*; 1999; Peralta *et al*; 2002), recombinantes (Sako *et al*; 2000; Hubert *et al*; 1999; Chung *et al*; 2002) y sintéticos (Gevorkian *et al*; 1996; Hernández *et al*; 2000). En este esfuerzo se han obtenido resultados prometedores, figuran entre ellos la identificación de la proteína recombinante de 10-kDa de *T. solium* (Chung *et al*; 1999). Sin embargo, las evaluaciones de los diferentes candidatos identificados distan de ser completas e incluir material biológico de pacientes bien caracterizados clínica e imagenológicamente y no han sido evaluadas extensamente en diferentes países endémicos que permitan validar su utilización.

En este sentido, es probablemente el ensayo desarrollado por Tsang y colaboradores, el único que se ha evaluado en diferentes regiones el (Tsang *et al*; 1989). Esta prueba se basa en un ensayo de inmunoelectrotransferencia (EITB) que utiliza una fracción de antígenos purificados utilizando sus características de adhesión a la lentil-lectina. Inicialmente, se propuso como un procedimiento altamente sensible y específico para el diagnóstico de la cisticercosis. Estudios ulteriores demostraron que puede detectar hasta el 50% de NC causada por la presencia de un solo cisticerco, y frecuentemente el ensayo resulta positivo para

portadores tanto de *T. solium* como de *Taenia saginata*, (Tsang *et al*; 1989). Este ensayo parece tener la misma sensibilidad a la obtenida utilizando el ensayo de ELISA y antígenos totales del cisticerco (Gekeler *et al*; 2002; Aguilar *et al*; 2002) aplicada en pacientes hospitalarios. Al nivel de su utilidad, en un estudio epidemiológico en población abierta presenta serias limitaciones. En un estudio de prevalencia de NC, por medio de tomografía en 480 habitantes de un pueblo en Honduras, se mostró que solamente el 23% de casos serológicos positivos tenían NC, y que sólo el 54% de los casos con NC eran serológicamente positivos (Sánchez *et al*; 1999).

Además de estas limitaciones este procedimiento presenta características que limitan su uso extensivo. Requiere la utilización de antígenos purificados a partir de cisticercos con la variabilidad que implica el uso de parásitos de diferentes orígenes, aspecto de especial interés en vista de la posible variabilidad del parásito (Yakoleff-Greenhouse *et al*; 2002).

La detección de anticuerpos tiene la limitación de que pueden encontrarse en sujetos sanos de países endémicos que hayan estado en contacto con el parásito o que tengan cisticercos en sitios anatómicos inconspicuos clínicamente. Otro factor importante en los falsos ensayos serológicos positivos es la presencia de reacciones cruzadas en especial cuando se utilizan preparaciones de antígenos completos o parcialmente purificados como consecuencia de la extensa compartición de antígenos entre diferentes céstodos y helmintos (Larralde *et al*; 1989).

Mientras tanto, la detección de antígeno parece ser una alternativa adicional para la optimización de ensayos diagnósticos. La presencia de antígenos del parásito en circulación resulta compatible con la presencia del cisticerco viable (Harrison *et al*; 1989 ; García *et al*; 1998; Erhart *et al*; 2002). Para la detección de antígenos se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal capaz de detectar un antígeno de secreción del cisticerco. Diferentes evaluaciones de la capacidad

diagnóstica de este anticuerpo indican que podría ser una herramienta de interés para el diagnóstico y el seguimiento del tratamiento de los pacientes (Harrison *et al* 1989; García *et al*; 1998). Sin embargo, este procedimiento aunque de alta especificidad no parece mostrar alta sensibilidad en especial en muestras de suero (García *et al*; 1998).

Los resultados mencionados anteriormente marcan las limitaciones de la serología para la detección de NC y enfatizan la necesidad de desarrollar métodos serológicos más sensibles y específicos que los actualmente existentes.

Es por ello que se requiere conocer con detalle el repertorio de antígenos reconocidos por los individuos neurocisticercosos y asociarlo al estatus clínico e imagenológico de los pacientes con el propósito de consolidar la información necesaria para el desarrollo de nuevas estrategias para el diagnóstico de la neurocisticercosis y el conocimiento de la respuesta inmune que subyace a esta patología.

HIPÓTESIS

La Neurocisticercosis se asocia a un conjunto heterogéneo de anticuerpos presentes en suero y LCR al respecto de sus especificidades en las subclases IgG1 e IgG4.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar el repertorio de antígenos del cisticerco de *T. solium* que son reconocidos por las subclases IgG1 e IgG4 en LCR y suero de pacientes con neurocisticercosis caracterizados clínica e imagenológicamente.

Objetivos particulares.

- 1.- Señalar las diferencias en el reconocimiento de antígenos del cisticerco de *T. solium* en diferentes grupos de pacientes neurocisticercosos.
- 2.- Describir las diferencias en el patrón de reconocimiento de antígenos del cisticerco de *T. solium* en muestras de suero y LCR.
- 3.- Identificar las fracciones antigénicas con posible interés para el desarrollo de métodos diagnósticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Antígenos de Cisticercos de *Taenia solium*

Los cisticercos de *T. solium* fueron extraídos del músculo esquelético de cerdos infectados naturalmente provenientes del centro de México y se colocaron en amortiguador de fosfatos (PBS, pH 7.2) frío. Se lavaron con amortiguador de fosfatos e inmediatamente después se rompieron con una aguja estéril y el fluido vesicular fue colectado. Se removió el calcio adicionando 50 μ l de oxalato de amonio (0.3 M) y 25 μ l de amoniaco (1:3, v/v en agua) por cada ml de fluido vesicular. Se centrifugó (2,000 x g, por 4 min a 20°C) y se descartó todo el material precipitado. El sobrenadante que contenía las proteínas fue colectado y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -80°C hasta su uso.

Inmunoblot

Los antígenos utilizados en la electroforesis fueron obtenidos del fluido vesicular de cisticercos de *T. solium*.

a) Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida (PAGE), de acuerdo al protocolo de Laemmli V. K. (1970), utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS) y mercaptoetanol como agente reductor. La electroforesis se realizó a 4 °C a 20-40 mA, por tres o cuatro horas. El gel concentrador se preparó al 3 % de acrilamida y 0.062 % de SDS de dos centímetros de largo. El gel separador se realizó al 7 % de acrilamida y 0.01 % de SDS de 13 cm de largo por 13 cm de ancho. Se cargaron 3 mg de proteínas del fluido vesicular por gel (Larralde *et al*; 1989, Larralde *et al*; 1990).

b) Inmunoelectrotransferencia

El inmunoblot se llevó a cabo por la transferencia electroforética de las proteínas del gel separador a hojas de papel de nitrocelulosa (Bio Rad 0.45

micras) por una 1h 30 min a 25 volts en amortiguador de glicina y Tris base pH 8.35. Concluida la transferencia el papel conteniendo a las proteínas se sumergió en una solución de PBS albúmina al 3% más leche descremada al 5% durante toda la noche a 4°C y rotación constante para bloquear los sitios inespecíficos de fijación. El papel con las proteínas transferidas se corto en tiras de 3 mm de ancho. Cada tira se incubó con un ml de suero diluido 1:50 en PBS Tween 0.3% más BSA al 1 % y leche descremada al 5 %, ó 1 ml de LCR diluido 1:10 en PBS Tween 0.03 %, durante toda la noche a 4°C.

La unión de los anticuerpos a los antígenos transferidos en las tiras de nitrocelulosa se visualizó mediante la inmersión de las tiras en un ml de solución de anticuerpos monoclonales de ratón anti IgG1 ó anti IgG4 (ZYMED Laboratories, INC) humanas diluidos 1:500 y 1:1500 respectivamente, por 1 h 30 min a temperatura ambiente, se lavó y se sumergieron nuevamente en un mililitro de solución de streptoavidina acoplada con fosfatasa alcalina (ZYMED Laboratories, INC) diluida 1:1500 en PBS tween 0.03 % por 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo y la actividad enzimática en el papel de nitrocelulosa se reveló por la incubación en una solución de sustrato para la fosfatasa alcalina, las bandas antigénicas aparecen entre los siguientes 15 minutos. Por último se lavan con agua bidestilada para eliminar el exceso de sustrato. Para preservar las tiras de nitrocelulosa con las bandas de precipitación por tiempos largos estas fueron conservadas en desecador y en ausencia de la luz.

Material biológico

En este trabajo se colectaron muestras de suero y de LCR de pacientes neurológicos neurocisticercosos y no neurocisticercosos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. De cada paciente se recopiló información referente a sus datos generales, el cuadro clínico expuesto, ensayos de laboratorio realizados y la presentación imagenológica de cada individuo valorada por una neuróloga experta.

Los pacientes NC fueron clasificados según dos criterios:

- 1) Estadio de cisticercos
 - a) Presencia de cisticercos vesiculares (NC activa)
 - b) Presencia de cisticercos calcificados o dañados (NC inactiva)

- 2) Celularidad de LCR
 - a) Inflamatorios (>5 células/ml)
 - b) No inflamatorios (<5 células/ml)

La condición de NC o no NC, así como el estadio de los cisticercos, se confirmó de acuerdo a la presentación imagenológica de cada individuo (TAC y/o IRM),.

Se incluyeron un total de 63 muestras de LCR y 18 muestras de suero. Las 18 muestras de suero correspondían a individuos de los cuales también se contaba con una muestra de LCR (muestras pareadas).

Subclases de Inmunoglobulinas Estudiadas

Para este trabajo se decidió evaluar el perfil de reconocimiento de fracciones antigénicas reconocidas por dos subclases de inmunoglobulina G (IgG), IgG1 e IgG4. La IgG1 fue seleccionada considerando que de acuerdo a estudios previos es la inmunoglobulina que se presenta con mayor frecuencia en el suero y LCR de los individuos con neurocisticercosis. La IgG4 fue seleccionada tomando en cuenta que esta subclase de Inmunoglobulina fue capaz de distinguir entre individuos que estuvieron en contacto con el parásito e individuos que presentaban neurocisticercosis calcificada en un estudio realizado en suero de habitantes de una comunidad rural endémica para la neurocisticercosis (Chavarría et al., 2003).

Análisis de imágenes de inmunoblot

Las tiras de nitrocelulosa con las bandas de precipitación fueron digitalizadas directamente con un scanner convencional para un posterior análisis con el programa Gene Profiler. El programa se basa en establecer criterios para el reconocimiento de bandas de acuerdo a umbrales establecidos de densidad óptica a la que se le resta un valor de fondo para determinar las bandas de precipitación presentes en el inmunoblot.

Inmunoplot

El inmunoplot es un procedimiento gráfico para analizar los antígenos que son reconocidos con diferentes criterios. En este caso se utilizó para comparar los antígenos reconocidos por los diferentes grupos de sueros y líquidos cefalorraquídeos. Para ello se calcula la frecuencia con la que cada fracción antigénica es reconocida por los sueros o LCR de diferentes grupos de individuos. Los resultados se grafican confrontando a los grupos que se desee comparar. La posición de los puntos correspondientes a cada banda en el plano de la gráfica otorga a cada fracción antigénica un significado inmunológico inmediato (Figura 6).

Las fracciones con baja frecuencia en un eje pero alta frecuencia en el otro, son antígenos específicamente reconocidos por uno de los grupos comparados, de acuerdo con valores de umbral seleccionados arbitrariamente, las bandas con alta frecuencia en ambos ejes representan antígenos igualmente reconocidos por individuos de ambas categorías. Las bandas con baja frecuencia son de escaso interés para el desarrollo de pruebas diagnósticas siendo reconocidas solo por algunos individuos. Si los puntos se distribuyen por todo el plano de la gráfica, es claro que la inmunogenicidad de la mezcla antigénica es heterogénea. La pendiente lineal de la gráfica debe reflejar la existencia de alguna tendencia de los antígenos a reaccionar con un grupo dado de sueros y LCR (Larralde *et al.*, 1989).

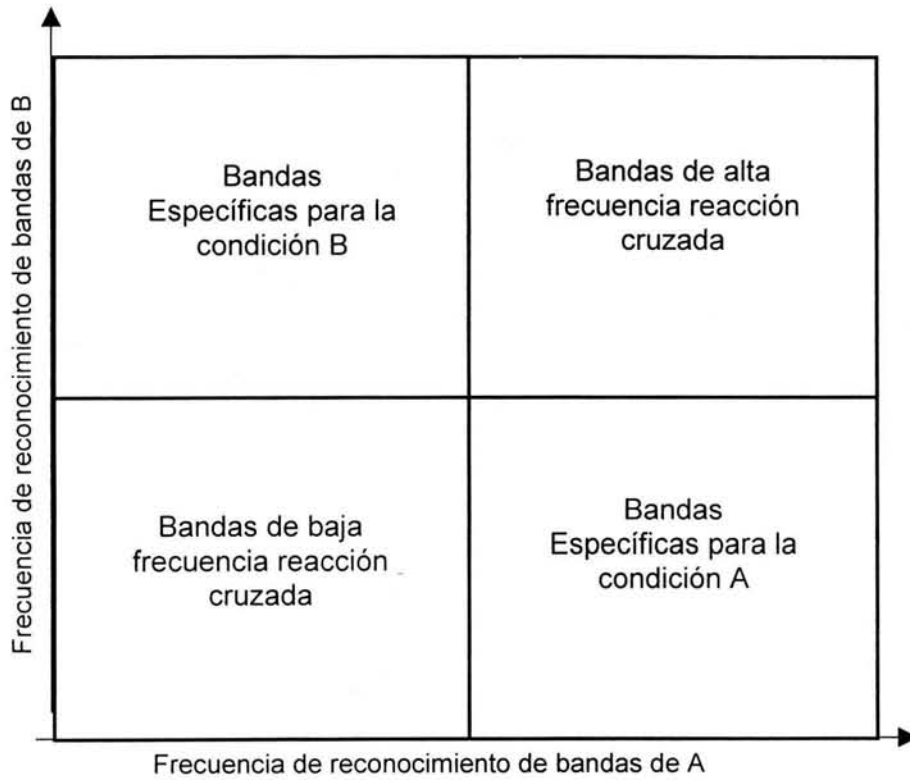


Figura 6. Immunoplot. A y B pueden ser dos condiciones distintas, p. ej. NC vs. no NC

RESULTADOS

Perfil de fracciones antigénicas obtenidas

Se obtuvieron un total de 20 fracciones antigénicas a partir de la electroforesis del fluido vesicular del cisticerco de *T. solium* en geles de poliacrilamida al 7%. El peso molecular estimado de las fracciones antigénicas, obtenido a partir del análisis con el programa Gene profiler, oscila entre 248 y 12 kD (Fig. 7, Cuadro 1).

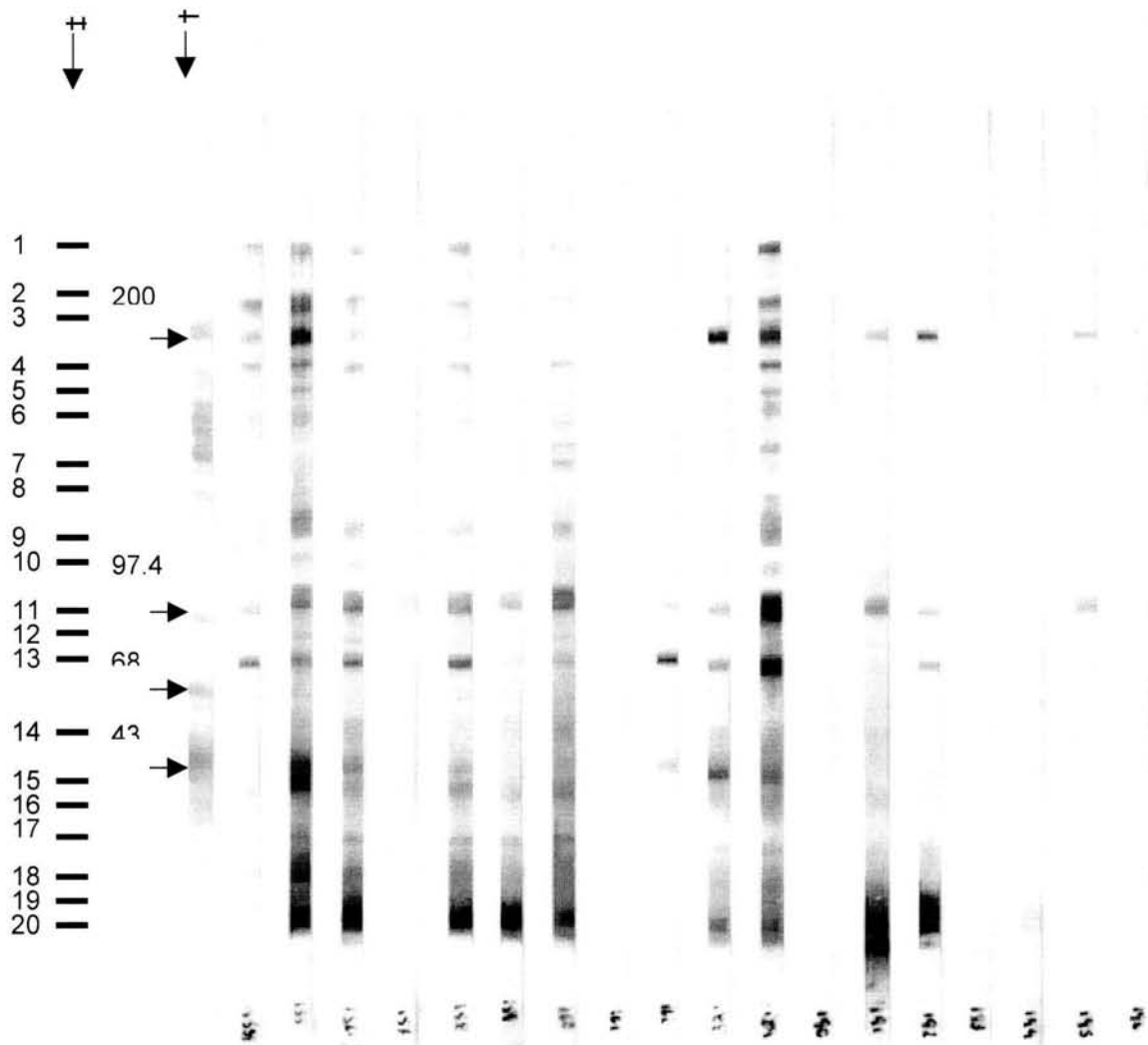


Figura 7. Inmunoblot representativo
 ‡ Patrón maestro del total de las fracciones antigénicas reconocidas
 † Estándar de peso molecular (kDa)

Cuadro 1. Pesos moleculares estimados de las fracciones antigénicas obtenidas

No. de Fracción antigénica	P.M. estimado (kDa)
1	248
2	217
3	199
4	185
5	173
6	165
7	150
8	132
8'	144
9	119
10	110
11	100
12	89
13	78
14	53
15	38
16	31
17	22
18	17
19	12

Identificación de fracciones antigénicas

La identificación de fracciones antigénicas se realizó mediante la comparación de frecuencias de reconocimiento del conjunto de las 20 fracciones por los anticuerpos presentes en el suero y en el LCR de pacientes con neurocisticercosis (NC) según las señales obtenidas en las inmunoelectrotransferencias (Fig. 7). Con el propósito de identificar las fracciones

potencialmente más específicas y que fueran reconocidas en el mayor número de pacientes (con mayor sensibilidad) se seleccionaron aquellas que fueron reconocidas por más del 30% de los individuos NC y que no fueran reconocidas por los individuos no cisticercosos (100% específicas) con dos subclases de inmunoglobulina G, la inmunoglobulina G1 (IgG1) y la inmunoglobulina G4 (IgG4).

CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS

De acuerdo con los criterios antes mencionados las muestras de suero y líquido cefalorraquídeo se agruparon en las siguientes categorías:

Cuadro 2. Grupos y número de muestras incluidas en el estudio

	NC Activa	NC Inactiva	NC Inflamatoria	NC No inflamatoria	Controles (no-NC)
LCR	29	12	34	15	12
Suero	7	3	9	5	5

Repertorio de fracciones antigénicas 100% reconocidas en LCR y sueros de pacientes NC

En LCR

Considerando solo las fracciones antigénicas 100% específicas para antígenos de cisticerco (fracciones no reconocidas en muestras de individuos sin neurocisticercosis que padecían otras enfermedades neurológicas) reconocidas en muestras de LCR de individuos NC se obtienen los porcentajes de reconocimiento expuestos en el cuadro 3.

Cuadro 3. Reconocimiento de las distintas fracciones antigénicas en LCR de individuos NC

	NC activa (n=29)	NC inactiva (n=12)	NC inflamatoria (n=34)	NC no Inflamatoria (n=15)
IgG1	12 [†] (64 ^{††})	2 (43)	12 (73)	-----
	4 (56)	4,12 (36)	4 (52)	-----
	2 (40)		2 (46)	-----
	8(32)			-----
IgG4	19 (56)	19 (50)	19 (70)	-----
	15 (46)	3 (43)	1(49)	-----
	1 (44)	12 (36)	3,4,12,18 (43)	
	4,18 (40)			
	9,12,2 (32)			-----

[†]Número de fracción antigénica

^{††}Porcentaje de individuos NC que reconocen la fracción antigénica (solo se incluyen los % de reconocimiento de las fracciones no reconocidas por los no NC)

En LCR la subclase IgG1 reconoce los antígenos de 12, 4, 2 y 8 con diferentes frecuencias que aumentan si los casos son inflamatorios o activos. Mientras tanto, en la NC activa y/o inflamatoria, la subclase IgG4 reconoce un conjunto adicional diferente y más extenso de antígenos (19, 18, 15, 12, 9, 4, 3, 2 y 1), compartiendo con IgG1 sólo las fracciones 12, 2 y 4.

El perfil de reconocimiento parece indicar que las distintas fracciones de antígenos son capaces de promover diferentes subclases de anticuerpos. La respuesta de IgG1 parece ser inducida preferentemente por solo cuatro fracciones de un total de 20 diferentes fracciones identificadas (12, 4, 2 y 8). Mientras tanto, estas fracciones más 6 fracciones adicionales pueden inducir IgG4.

Así el repertorio de antígenos que induce y reconoce IgG4 es más heterogéneo que el que induce y reconoce IgG1.

Cabe señalar que en los casos no inflamatorios ninguna fracción fue reconocida por más del 30% de los individuos.

En relación con el perfil de reconocimiento y la inactividad se distinguen pocas modificaciones en IgG1 que se reflejan esencialmente en disminución de las frecuencias de reconocimiento. Mientras tanto, en IgG4 se reduce la heterogeneidad de la respuesta encontrándose en la NC inactiva solo 3 fracciones antigénicas. Una de ellas, la fracción 3 es reconocida sólo en los casos inactivos.

En Suero

Tomando en cuenta sólo a las fracciones antigénicas reconocidas exclusivamente por pacientes NC (100% específicas para NC) en muestras de suero se obtienen los porcentajes expuestos en el cuadro 4.

Cuadro 4. Reconocimiento de las distintas fracciones antigénicas en suero de individuos NC.

	NC activa (n=7)	NC inactiva (n=4)	NC inflamatoria (n=9)	NC no Inflamatoria (n=4)
IgG1	12 [†] (38 ^{††})		12 (38)	14 (50)
IgG4	19 (63) 6 (49) 3 (38)	1,2,14,19 (50)	9 (63) 1,2,3,6 (38)	19 (50)

[†] Número de fracción antigénica

^{††} Porcentaje de individuos NC que reconocen la fracción antigénica (solo se incluyen los % de reconocimiento de las fracciones no reconocidas por los no NC)

En suero se observa en general, el reconocimiento de un número menor de fracciones y con menor frecuencia. Nuevamente, la respuesta de IgG1 es más homogénea y solo dos fracciones son reconocidas (12 y 14). Mientras tanto, IgG4 reconoce 7 fracciones diferentes (19, 9, 14, 2, 1, 6 y 3).

Existen fracciones que son reconocidas exclusivamente en el LCR (4, 18) o en el suero (14, 6) de pacientes NC.

También se puede observar la mayor sensibilidad que se obtiene utilizando IgG4 respecto a IgG1.

Repertorio de fracciones antigénicas con más de 80% de reconocimiento en LCR y sueros de pacientes NC

Con el propósito de identificar fracciones antigénicas adicionales que no siendo 100% específicas tuvieran alta especificidad (>80 % de reconocimiento) y por lo tanto pudieran ser de interés para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis se realizó un análisis adicional.

En LCR.

Los porcentajes de reconocimiento de las fracciones antigénicas que presentan especificidad hacia antígenos del cisticerco mayores a 80 % en LCR se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Fracciones antigénicas con mas de 80 % de reconocimiento en LCR de individuos NC.

	NC activa (n=29)	NC inactiva (n=12)	NC inflamatoria (n=34)	NC no Inflamatoria (n=15)
IgG1	†12, 1 ††(64)	1(50)	12 (73)	
	4, 15 (56)	2 (43)	1(70)	
	3, 9 (52)	4, 12, 3 (36)	15 (61)	
	17(48)		3 (58)	
	2 (40)		4, 9 (52)	
	8, 5 (32)		17(49)	
			2 (46)	
			5 (30)	
IgG4	19 (56)	19 (50)	19 (70)	
	15 (46)	3 (43)	1(49)	
	1 (44)	12 (36)	3, 4, 12, 18 (43)	
	4,18(40)		5(36)	
	9,12,2 (32)		15(33)	
			2,9,17(30)	

†Número de fracción antigénica

††Porcentaje de individuos NC que reconocen la fracción antigénica (solo se incluyen los % de reconocimiento de las fracciones no reconocidas por los no NC)

Se observa un incremento en el número de fracciones antigénicas reconocidas por IgG1 en el líquido cefalorraquídeo como resultado de disminuir el umbral de especificidad.

IgG1 reconoce nueve fracciones antigénicas, diferentes (12, 1, 4, 15, 3, 9, 17, 2, 8 y 5). El repertorio de reconocimiento es mayor en los grupos de NC activa y NC inflamatoria, siendo las fracciones de mayor porcentaje de reconocimiento

las bandas 1, 12 y 15. En el grupo de NC inactiva solo se reconocen cinco fracciones antigénicas (1, 2, 4, 12 y 3). Por otra parte en el grupo de NC no inflamatoria no se observa el reconocimiento de ninguna fracción.

Para el caso de IgG4 en LCR se observa un ligero aumento en el número de fracciones reconocidas por el grupo de NC inflamatoria al disminuir la especificidad a un 80 %, esto como resultado que la mayor parte de las fracciones identificadas por IgG4 en LCR son 100 % específicas.

En suero

Los porcentajes de reconocimiento de las fracciones antigénicas que presentan especificidades mayores a 80 % hacia antígenos del cisticerco de *T. solium* en suero se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 6. Fracciones antigénicas con mas de 80 % de reconocimiento en suero de individuos NC.

	NC activa (n=7)	NC inactiva (n=4)	NC inflamatoria (n=9)	NC no Inflamatoria (n=4)
IgG1	†12,17,18 ††(38)		12,18 (38)	14 (50)
IgG4	19 (63) 6 (49) 3 (38)	1,2,14,19 (50)	9 (63) 1,2,3,6 (38)	19 (50)

†Número de fracción antigénica

††Porcentaje de individuos NC que reconocen la fracción antigénica (solo se incluyen los % de reconocimiento de las fracciones no reconocidas por los no NC)

En suero se observa un ligero incremento del repertorio de fracciones antigénicas reconocidas por IgG1 (12, 17 y 18) al disminuir el umbral de especificidad a 80 %, en los grupos de NC activa y de NC inflamatoria, mientras que para el grupo de NC inactiva no se detecta ninguna fracción antigénica aún

disminuyendo el valor de especificidad. En la NC no inflamatoria IgG1 solo reconoce a la fracción 14.

Con IgG4 no se modifica el número de fracciones antigénicas reconocidas en ninguno de los grupos al disminuir la especificidad.

Perfil de reconocimiento según la subclase de IgG

En la comparación del reconocimiento de antígenos entre IgG1 e IgG4 a partir de los resultados obtenidos en el inmunoplot, se observa en la NC activa en LCR una mayor frecuencia de reconocimiento por parte de IgG1 que por la IgG4 con tres excepciones (8,6 y 10), aunque todas las fracciones antigénicas son reconocidas por ambas inmunoglobulinas (Figura 8).

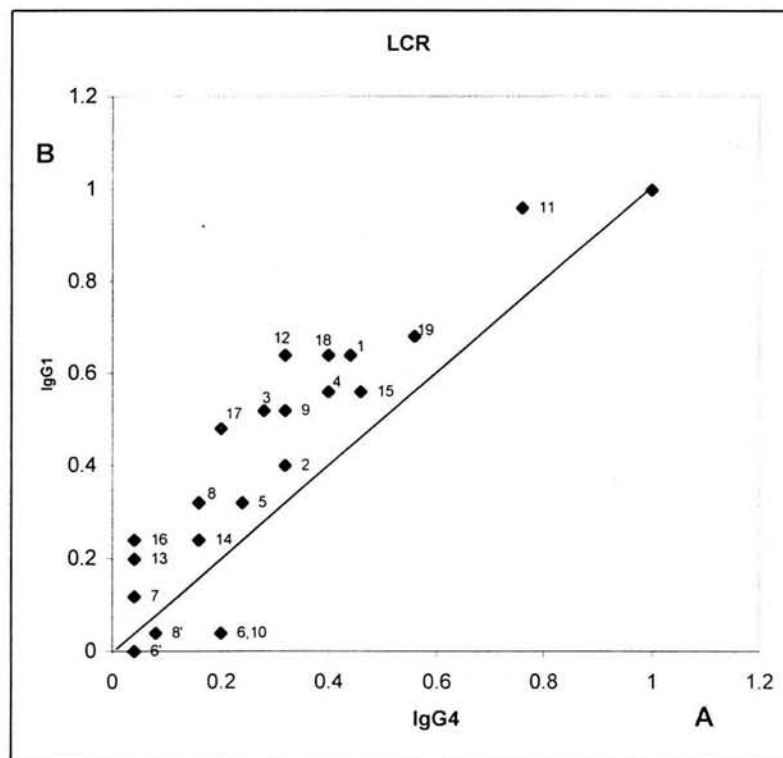


Figura 8. Inmunoplot. A) Frecuencias de reconocimiento de IgG4 en LCR de individuos NC activa. B) Frecuencias de reconocimiento de IgG1 en muestras de LCR de individuos NC activa.

En el análisis de los resultados del inmonoplot de LCR de pacientes con NC inactiva se observa una frecuencia similar de reconocimiento de las fracciones antigénicas por parte de IgG1 e IgG4, y solo algunas fracciones antigénicas son preferentemente reconocidas solo por IgG4, aunque en bajas frecuencias (Figura9).

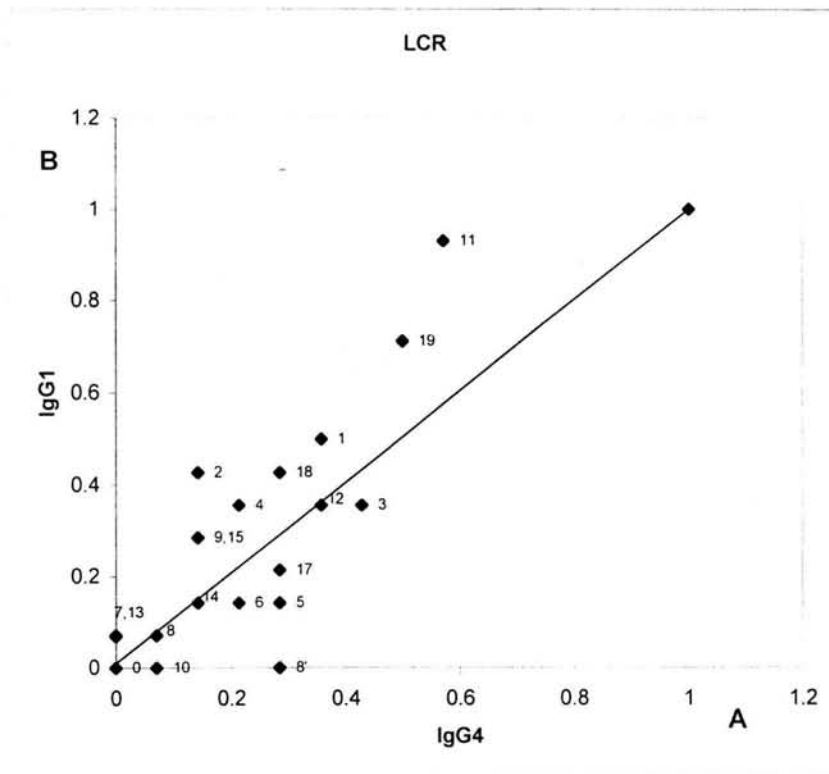


Figura 9. Inmunoplot. A) Frecuencias de reconocimiento de IgG4 en LCR de individuos NC inactiva. B) Frecuencias de reconocimiento de IgG1 en muestras de LCR de individuos NC inactiva.

Análisis de muestras pareadas

En este estudio se incluyeron 18 muestras de LCR y 18 muestras de suero que correspondían al mismo paciente para determinar si existen diferencias significativas en el reconocimiento en la respuesta local en SNC (LCR) y en la respuesta periférica (suero).

En el cuadro 7 se ilustra las fracciones antigénicas que son reconocidas exclusivamente por alguna de las dos muestras.

Cuadro 7. Fracciones antigénicas reconocidas en LCR o suero de individuos NC

	NC activa		NC inactiva		NC inflamatoria		NC no inflamatoria	
	LCR n=29	Suero n=7	LCR n=12	Suero n=4	LCR n=34	Suero n=9	LCR n=15	Suero n=4
IgG1	2 [†] (50 ^{††})	6 (13)	18 (75) 1, 4, 14, 17 (50) 12 (25)	13 (50)	----- 6 (13)	13 (50)	18 (100) 1, 4, 15, 17 (25)	9, 13 (50)
IgG4	14 (34)	17 (25) 15 (13)	8' (25)	2 (50) 10 (25)	5, 12 (25)	-----	-----	9, 18 (50) 1, 2, 3, 4, 5, 17 (25)

[†]Número de fracción antigénica

^{††}Porcentaje de individuos NC que reconocen la fracción antigénica

Se observó que en la NC activa hay un número reducido de fracciones que son reconocidas por IgG1 en sólo una de las muestras. En el LCR se presentan porcentajes más elevados de reconocimiento que en el suero. La banda 2 es reconocida solo en el LCR (50%), y la fracción 6 es reconocida únicamente en el suero, pero en baja frecuencia (13%). El reconocimiento de la IgG4 presenta un resultado similar, un número reducido de fracciones antigénicas reconocidas y en mayor porcentaje en el LCR que en el suero. Es de destacar que el repertorio de antígenos reconocidos en sólo una de las muestras se realiza de manera diferencial por parte de las dos inmunoglobulinas.

En general, a lo largo de este trabajo se encontró que en la NC inactiva el repertorio de antígenos que son reconocidos en LCR y suero es reducido con respecto a la NC activa, pero cabe resaltar que la mayor parte de las fracciones reconocidas únicamente en suero ó en el LCR se observó en la NC inactiva. Así,

las fracciones 18 (75%), 1, 4, 14 y 17 (50%) y la fracción 12 (25%) son reconocidas solo en el LCR, mientras que la fracción 13 es reconocida solo en el suero de pacientes con NC inactiva (50%), dicho reconocimiento lo lleva a cabo la IgG1.

IgG4 reconoce gran parte de las fracciones antigénicas en mayor porcentaje en suero que en LCR, y las fracciones 2 (50%) y 10 (25%) son reconocidas únicamente en el suero de pacientes con NC inactiva, mientras que la fracción 8' es reconocida solo en el LCR de estos pacientes

Al comparar las muestras pareadas agrupadas en la categoría de NC inflamatoria, se observa que un número reducido de bandas son reconocidas sólo en suero por IgG1, las fracciones reconocidas son 6 (13%) y 13 (50%). Aún cuando los porcentajes de reconocimiento del total de las bandas reconocidas por la IgG1 son mayores en el LCR, dicho reconocimiento no es exclusivo de esta muestra. En contraste, con la IgG4 el reconocimiento de las fracciones 5 y 12 (25%) es exclusivo del LCR y ninguna banda es reconocida sólo en suero por esta inmunoglobulina.

Para el caso de la NC no inflamatoria se observa que hay pocas bandas reconocidas por IgG1 en por ambas muestras (bandas 14 y 19), siendo las fracciones 1, 4, 5 y 17 específicas de LCR, aunque en bajo porcentaje (25%), y la banda 18 es reconocida sólo en el LCR de todos los individuos agrupados en esta categoría (100%). En el suero las bandas específicas de esta muestra son las fracciones 9 y 13 (50%).

En la NC no inflamatoria la mayor parte de las fracciones que reconoce IgG4 se realiza principalmente en suero, siendo las fracciones 1, 2, 3, 4, 5, 17 (25%) y 9 y 18 (50%) exclusivamente reconocidas en esta muestra.

Fracciones antigénicas de interés para el inmunodiagnóstico

Las principales fracciones antigénicas con posible interés para el inmunodiagnóstico, considerando que son reconocidas en suero y LCR, se ilustran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Fracciones antigénicas reconocidas en LCR y Suero de pacientes NC

	NC activa		NC inactiva		NC inflamatoria		NC no inflamatoria	
	LCR n=29	Suero n=7	LCR n=12	Suero n=4	LCR n=34	Suero n=9	LCR n=15	Suero n=4
IgG1	12 [†] , 17 (50 ^{††}), 9(66)	12, 17(38), 9(75)	15(50), 9 (25)	15(25), 9 (50)	18(63), 12(50), 9(63)	18, 12(38), 9(88)	14(25), 19(100)	14, 19(50)
IgG4	18, 19(50), 3, 9(34)	18(50), 19(63), 3(38), 9(50)	14, 18, 19(50)	14, 18, 19(50)	18(50), 19(63), 9, 3(38)	18(63), 19(50), 9(63), 3(38)	19, 13(25)	19(50), 13(75)

[†]Número de fracción antigénica

^{††}Porcentaje de individuos NC que reconocen la fracción antigénica

Seleccionando las bandas que pudieran ser específicas de un estado de la enfermedad se tiene que las fracciones 12 y 17 son marcadores de NC activa con IgG1 y la fracción 3 lo es para IgG4, mientras que la fracción 15 es indicadora de Inactividad en la NC con IgG1, y la fracción 14 lo es para IgG4.

Con respecto a la inflamación, la fracción antigénica 18 pudiera indicar este estado en contexto de la IgG1, y la 3 indicaría lo anterior con la IgG4, como sucede en la NC activa. Por otra parte, en la NC no inflamatoria se reconoce a las fracciones 14 y 19 con IgG1, y la fracción 13 es reconocida en este estado por IgG4.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se señala la clara heterogeneidad de la respuesta inmune humoral asociada a la neurocisticercosis. Esta heterogeneidad se expresa en el conjunto de fracciones antigénicas reconocidas, en las diferentes frecuencias de reconocimiento observadas para cada fracción antigénica, así como en el perfil de fracciones reconocidas en diferentes muestras biológicas (suero y LCR) y por diferentes subclases de inmunoglobulina G (IgG1 e IgG4).

Esta heterogeneidad se describe utilizando un procedimiento potente como lo es la inmunoelectrotransferencia, que permite analizar en una sola reacción la capacidad de reconocimiento con tantos criterios como fracciones antigénicas se incluyan en la reacción, en este caso 20 fracciones antigénicas diferentes, y presenta un alto grado de reproducibilidad (Larralde *et al.*, 1986). Igualmente útil resulta el empleo de un análisis gráfico como el inmunoplot en el que la posición de los puntos correspondientes a la frecuencia de cada banda en el plano de la gráfica otorga a cada fracción antigénica un significado inmunológico inmediato, lo que agiliza el manejo de la gran cantidad de información obtenida de las inmunoelectrotransferencias. Además, este estudio tiene como característica importante que la señal obtenida se procesó con un equipo y programa computacional que permite un análisis no subjetivo y menos vulnerable a error. Así, utilizando el programa Gene Profiler se establecieron las condiciones para definir la presencia o ausencia de una banda y este criterio se utilizó consistentemente en el análisis de todas las imágenes.

Con respecto a la heterogeneidad en el reconocimiento de las fracciones antigénicas obtenidas para los diferentes grupos de pacientes neurocisticercosos, se observó que existe un repertorio de fracciones limitado que identifica la condición de neurocisticercosis en contexto de la IgG1, repertorio que no muestra variación de acuerdo al estado de la enfermedad, es decir, las fracciones 12, 4, y 2 son reconocidas de forma similar por todos los grupos de pacientes, excepto en la condición de neurocisticercosis no inflamatoria, en la que no se observó reconocimiento de antígenos, lo que consolida el estatus no inflamatorio determinado por la ausencia de celularidad, criterio que fue considerado en este estudio para determinar inflamación.

Sin embargo, en el contexto del reconocimiento con la IgG4, el repertorio de antígenos capaz de determinar la condición neurocisticercosa es más amplio y distinto al de la IgG1, y se pueden observar algunas diferencias entre los estados de la enfermedad considerados en este estudio. Cabe resaltar que la condición de NC activa y NC inflamatoria son estados que comparten, de manera general el repertorio de antígenos, siendo las fracciones 19, 18, 12, 4 y 1 indicadoras de ambos estados.

Resulta notable el reconocimiento de antígenos por parte de la IgG1 e IgG4 en el caso de la NC inactiva, etapa de la enfermedad que se ha caracterizado por el bajo nivel de anticuerpos en las muestras biológicas estudiadas (Molinari *et al*; 2002).

Por otra parte, en el suero de pacientes con NC se observó una clara disminución en el repertorio de antígenos que son reconocidos por IgG1 en todos los grupos analizados, así como una sensibilidad menor a la obtenida en el LCR. El reconocimiento de IgG4 mostró un repertorio más amplio que el reconocido por IgG1, repertorio diferente entre inmunoglobulinas y entre estadios, en la NC inactiva se reconocen bandas diferentes que en la NC activa. Aparentemente, la muerte de los parásitos aumenta el número y cambia el repertorio de las fracciones reconocidas (19, 6 y 3 en NC activa vs 1, 2, 14 y 19 de NC inactiva)

como consecuencia de la exposición de estructuras diferentes que no se exhibían antes de la degeneración del parásito.

La disminución de la especificidad al 80%, con el propósito de ampliar el repertorio de antígenos que son reconocidos por la IgG1 y la IgG4, exhibió un incremento en el número de bandas detectadas en LCR por ambas subclases, principalmente en los casos de NC activa y NC inflamatoria, sin embargo, no se observó un reconocimiento diferencial en el número ni en el repertorio identificado por cada inmunoglobulina. En el suero se observa un incremento mínimo en el número de bandas reconocidas al disminuir el umbral de especificidad al 80%, este incremento solo se observa en el contexto de la IgG1 cuando se toma en cuenta a la NC activa y a la NC inflamatoria.

Considerando que el propósito principal de disminuir el umbral de especificidad es el de contar con un mayor número elementos (bandas) que pudieran mejorar la sensibilidad de la prueba, no resulta importante el incremento en el número de fracciones antigénicas reconocidas bajo el criterio del 80 % de especificidad. Debido a que en las muestras donde se da el reconocimiento de las bandas con mayor frecuencia, generalmente se reconocen bandas de frecuencia menor y por ende menos específicas, no se realiza una suma importante de nuevos elementos que aumenten los valores de sensibilidad de la prueba.

La heterogeneidad en las fracciones antigénicas reconocidas entre suero y LCR se determinó a partir de la comparación de las muestras correspondientes a un mismo paciente (muestras pareadas). La relevancia de realizar un análisis de la respuesta inmune humoral mediada por anticuerpos en diferentes compartimentos de un mismo individuo se pone de manifiesto al considerar las discrepancias que se obtienen en los resultados realizados en LCR y suero, en donde la principal desventaja que se ha reportado para el caso del suero es la disminución de la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Bueno *et al*; 2000).

Esta heterogeneidad es muy clara en vista de que existe un repertorio de antígenos reconocido en LCR, totalmente diferente al repertorio identificado en suero, estas diferencias se observan en todos los grupos bajo estudio. Así, la fracción 2 es indicadora de NC activa en LCR, mientras que en suero la fracción 13 nos ilustra esta condición en suero, ambas son reconocidas solo por IgG1. Considerando el mismo estado de la enfermedad pero en contexto de IgG4, la fracción 14 se reconoce únicamente en el LCR mientras que la fracción 17 se identifica solo en el suero.

Los antígenos que solo son reconocidos en LCR podrían representar fracciones que permanecen en el SNC induciendo una respuesta inmune in situ. Mientras tanto, los antígenos que solo son reconocidos en suero podrían representar antígenos que salen a circulación y solo a nivel sistémico son capaces de inducir una respuesta. Por otra parte, este reconocimiento diferencial de fracciones antigénicas podría estar mediado por la síntesis intracranial de anticuerpos específicos en pacientes con NC (Cho et al; 1988, Machado et al; 2002).

Las fracciones antigénicas reconocidas en ambas muestras son de gran interés para fines inmunodiagnósticos considerando las dificultades de realizar pruebas en LCR en población abierta o en sitios de alta endemicidad para la neurocisticercosis. Para este objetivo, las fracciones 12 y 9 son las más sobresalientes debido a que cuentan con los porcentajes de sensibilidad más altos obtenidos en este estudio y, considerando que al igual que las otras fracciones antigénicas analizadas, son 100% específicas de esta enfermedad, además de que son reconocidas por ambas subclases de inmunoglobulina (IgG1 e IgG4).

Con respecto de la heterogeneidad observada entre las fracciones reconocidas por las diferentes subclases, considerando el reconocimiento

observado solo en el LCR se encontró una mayor frecuencia en el reconocimiento por parte de la IgG1 con respecto a la IgG4, esto no resulta sorprendente tomando en cuenta la mayor concentración de IgG1 en muestras biológicas. Ambas inmunoglobulinas reconocieron el mismo repertorio de antígenos con excepción de tres fracciones que reaccionaron solo con IgG4 (8,6 y 10), esta mayor especificidad por parte de IgG4 coincide con lo señalado para el caso de la clonorquiasis, en donde esta subclase de inmunoglobulina G tiene un gran valor para fines de inmunodiagnósticos (Hong *et al*; 1999).

Al considerar solo al grupo de muestras de LCR y suero pareados, se logran observar claras diferencias en el reconocimiento de antígenos que presenta cada subclase de IgG. Tomando en cuenta sólo la condición de neurocisticercosis, IgG1 reconoce exclusivamente a las fracciones 17, 15 y 7, en LCR y suero, mientras que la IgG4 reconoce de manera exclusiva a las fracciones 6, 5, 8' y 13 en LCR y suero.

Esta discrepancia en la heterogeneidad puede ser ocasionada por el menor número de muestras contempladas en el grupo de muestras pareadas que en el total de las muestras de LCR, lo cual solo podría reflejar un estado en el primer grupo que no representa a la totalidad de la población neurocisticercosa. Esto solo se puede determinar si se cuenta con una muestra más amplia de LCR y sueros pareados, condición que se planea para un estudio futuro.

Las diferencias en el reconocimiento de fracciones antigénicas entre subclases de IgG pueden estar mediadas, más que por las diferencias estructurales entre inmunoglobulinas, presentes en la cadena pesada de la fracción constante de estas moléculas, por el tipo de respuesta inmune que inducen. Así, en el caso de la NC inactiva, en donde el repertorio de fracciones reconocidas por la IgG4 es mayor al que reconoce la IgG1, puede estar asociada a una respuesta tipo Th2, en donde la interleucina 4 induce un aumento en la producción de la IgG4 (Chavarria *et al*; 2003)

Cabe señalar que los tamaños relativos de las fracciones antigénicas no parecen estar relacionadas con la subclase que inducen ni son preferentemente las más pequeñas o las más grandes las más inmunogénicas en suero o en LCR. Sin embargo, se observó que en algunos casos las fracciones antigénicas de menor peso molecular presentaban las frecuencias de reconocimiento más elevadas (banda 12 \approx 89 kDa, banda 19 \approx 12 kDa). De acuerdo con lo reportado por Sako y Yang, fracciones antigénicas purificadas de bajo peso molecular tienen un gran valor para el diagnóstico considerando su especificidad e inmunogenicidad (Sako *et al*; 2000, Yang *et al*; 1998), sin embargo, la reproducibilidad de estos resultados no ha sido ampliamente confirmada.

En este contexto, es factible que más que el tamaño, resulte de importancia la concentración relativa de cada antígeno en el total de la muestra antigénica, lo cual puede afectar la capacidad de ser reconocidas por alguna de las dos subclases incluidas en el presente estudio, en especial si consideramos la capacidad para ser reconocidas en forma sistémica.

La baja frecuencia de reconocimiento específico de fracciones así como el no aumento de la sensibilidad utilizando criterios adicionales de reconocimiento señala la dificultad de establecer criterios de diagnóstico empleando estos procedimientos. Esto contrasta con lo que ocurre en otras enfermedades infecciosas como es el caso del VIH en la cual se ha establecido desde los comienzos de su diagnóstico patrones muy específicos y sensibles para detectar a los infectados (Tebourski F. *et al*; 2004).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que:

Existe una clara heterogeneidad de la respuesta inmune humoral asociada a la neurocisticercosis.

Esta heterogeneidad se expresa:

En el conjunto de las 20 fracciones antigénicas reconocidas.

En las diferentes frecuencias de reconocimiento observadas para cada fracción antigénica.

En el perfil de fracciones reconocidas en diferentes muestras biológicas (suero y LCR) y por diferentes subclases de inmunoglobulina G (IgG1 e IgG4).

REFERENCIAS

1. Aguilar-Rebolledo F, Meza-Lucas A, Torres J, Cedillo-Rivera R, Enciso A, Garcia RC, Munoz O, Correa D. Evaluation of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for diagnosis of neurocysticercosis in children. *J Child Neurol.* 2002 Jun;17(6):416-20.
2. Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives Med Res.* 25:325-330.
3. Bern C, Garcia HH, Evans C, Gonzalez AE, Verastegui M, Tsang VC, Gilman RH. Magnitude of the Disease Burden from Neurocysticercosis in a Developing Country. *Clin Infect Dis* 1999; 29:1203-1209.
4. Bowditch RD, Tani P, McMillan R. Characterization of autoantigenic epitopes on platelet glycoprotein lib/IIIa using random peptide libraries. *Blood* 1996; 88:4579-4584.
5. Bueno E, Vaz A, Machado L, Livramento J, Mielle R. Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples. 2000. *J Clin Microbiol.* 38 :146-151.
6. Cho S, Kim S, Kang S, Park A. Intracranial synthesis of specific IgG antibody in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients. 1988. *The Korean Journal of Parasitology.* 26: 15-26.
7. Correa MD, Flisser A, Sarti E. Teniasis y cisticercosis. En: *Enfermedades Tropicales en México.* Valdespino Gómez JI, Del Tio-Zolezzi A, Velasco-Castrejón D, Escobar A, Ibáñez-Bernal S, Magos-López E, ed. México DF SSA. 1994. 335-334.
8. Cortese I, Tafi R, Grimaldi LME, Martino G, Nicosia A, Cortese R. Identification of peptides specific for cerebrospinal fluid antibodies in multiplesclerosis by using phage libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:11063-11067.

9. Chung JY, Yun DH, Eom KS, Kang SY, Kong Y, Cho SY. *Taenia solium*: identification of specific antibody binding regions of metacestode 10-kDa protein. *Exp Parasitol*. 2002 Feb;100(2):87-94.
10. Davis LE, Neurocysticercosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *The Neurologist*. 1996; 2:356-3640.
11. da Silva AD, Quagliato EM, Rossi CL. A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the immunodiagnosis of neurocysticercosis using a purified fraction from *Taenia solium* cysticerci. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000 Jun;37(2):87-92.
10. Dekumyoy P, Anantaphruti MT, Nuamtanong S, Watthanakulpanich D, Waikagu J, Danis M. Neurocysticercosis: utilizing the cystic fluid antigen from *Taenia solium* metacestodes for diagnosis by IgG-ELISA. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2000;31 Suppl 1:21-5.
12. Dybwad A, Forre O, Kjeldsen-Kragh J, Natvig JB, Sioud M. Identification of new B cell epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. *Eur J Immunol* 1993; 23:3189-3193.
13. Erhart A, Dorny P, Van De N, Vien HV, Thach DC, Toan ND, Cong le D, Geerts S, Speybroeck N, Berkvens D, Brandt J. *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Viet Nam: seroprevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002. 96(3):270-2.
14. Ev LV, Maia AA, Pianetti G, Nascimento E. Immunological evaluation of a 26-kDa antigen from *Taenia solium* larvae for specific immunodiagnosis of human neurocysticercosis. *Parasitol Res*. 1999 Feb;85(2):98-102.
15. Fleury A., Beltran C., Garate T., Harrison L., Parkhouse, M, Garcia E., Fragoso, G. , Biondi G., Lana and Sciutto E. Neurocysticercosis: identification of epitopes for the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. Renviado para su publicación al *Trans R Soc Trop Med Hyg*
16. Garcia HH, Harrison LJ, Parkhouse RM, Montenegro T, Martinez SM, Tsang VC, Gilman RH. 1998. A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of

human neurocysticercosis. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1998; 92(4):411-4

17. Gekeler F, Eichenlaub S, Mendoza EG, Sotelo J, Hoelscher M, Loscher T. Sensitivity and specificity of ELISA and immunoblot for diagnosing neurocysticercosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Mar;21(3):227-9.

18. Gevorkian G, Manoutcharian K, Almagro JC, Govezensky T, Dominguez V. Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura-related epitopes using phage-display peptide library. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 86:305-309.

19. Gevorkian G, Manoutcharian K, Govezensky T, Cano JA, Dominguez V, Santamaria H, Larralde C. Identification of Mimotopes of Platelet Autoantigens Associated with Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *J Autoimm* 2000; Aug;15(1):33-40.

20. Gevorkian, G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernández M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, García E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunological Letters* 1996; 49:185-189.

21. Gevorkian, G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernández M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, García E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunological Letters* 1996; 49:185-189.

22. Gevorkian, G., Viveros, M., Zamudio, F. and Larralde, C. Solid-phase synthesis of a peptide comprising the 605-611 disulfide loop of gp41, transmembrane glycoprotein of HIV-1. *Org Prep Proc Int* 1995; 27:375-377.

23. Harrison LJ, Joshua GW, Wright SH, Parkhouse RM. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1989;11(4):351-70.

24. Hernández M, Beltrán C, Garcia E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, Parkhouse M, Harrison L, Sotelo J, Sciutto E. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett* 2000; 71:13-17.

25. Hong S, Lee M, Sung N, Cho S, Chai J, Lee S. Usefulness of IgG4 subclass antibodies of human clonorchiasis. 1999. The Korean Journal of Parasitology. 37: 243-248.
26. Hubert K, Andriantsimahavandy A, Michault A, Frosch M, Muhlschlegel FA. Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 Jul;6(4):479-82.
27. Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Wills K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. 1992. En : Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Wills K, Laclette JP, Larralde C, Riadura C, Beltran F (eds). New York, Academic Press, Inc. New York, 375-387.
28. Larralde C, Laclette JP, Owen C, Madrazo I, Sandoval M, Bojalil R, Sciutto E, Contreras L, Arzate J, Diaz ML, Govezensky T, Montoya RM, Goodsaid F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. Am J Trop Med Hyg 1986; 35:965-973.
29. Larralde, C, Montoya, RM, Sciutto, E, Díaz, ML, Govezensky, T, Coltorti, E. Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hidatidic disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; 40:282-290.
30. Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.L., Govezensky, T., and Coltorti. Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg 1989; 40 (3):284-292.
31. Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutiérrez, E., Tapia-Conver, R., Salvatierra, y Sepúlveda, J., Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública Mex. 1992;34:197-210.
32. Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., et al. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. Arch. Pathol. Lab. Med. 1990; 114:926-928.

33. Machado L, Livramento J, Vaz A, Bueno E, Mielli S, Bastouly V, Nóbrega J. IgG intrathecal síntesis and specific antibody index in patients with neurocysticercosis. 2002. Arq Neuropsiquiatr. 60: 395-399.
34. Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E. Identification and cloning of protective recombinant Antigens. J Parasitol 1996; 82:250-254.
35. Manoutcharian K, Sotelo J, Garcia E, Cano A, Gevorkian G. Characterization of Cerebrospinal Fluid Antibody Specificities in Neurocysticercosis Using Phage Display Peptide Library. Clin Immunol 1999; 91:117-121.
36. Manoutcharian, K, Larralde, C, Aluja, A, Fragoso, G, Rosas, G, Hernández, M, Villalobos, N., Rodarte, LF, Govezensky, T, Baca, M, Sciutto, E, Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. In Chanock, RM, Brown, F, Ginsberg, HS and Norrby, E. (editors) Vaccine 95. Molecular Approaches to the control of infectious diseases. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 1995, pp 63-68.
37. Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF and Sciutto E. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. J. Parasitol. 1996; 82:250-254.
38. Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium* description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infection. 1998. J. Parasitol. 84:681-685
39. Merrifield RB. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154.
40. Mittal V, Singh VK, Ichhpujani RL. Detection of antibodies to *Taenia solium* in sera of patient with epilepsy using ELISA. J Commun Dis. 2001 Mar; 33(1):23-7.
41. Molinari JL, Garcia-Mendoza E, de la Garza Y, Ramirez JA, Sotelo J, Tato P. Discrimination between active and inactive neurocysticercosis by metacestode excretory/secretory antigens of *Taenia solium* in an enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg. 2002 Jun;66(6):777-81.

42. Nascimento E, Nogueira PM, Tavares CA. Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. *Parasitol Res.* 1987;73(5):446-50.
43. Nunes CM, Biondi GF, Heinemann MB, Richtzenhain LJ. Comparative evaluation of an indirect ELISA test for diagnosis of swine cysticercosis employing antigen from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes. *Vet Parasitol.* 2000 Nov 10;93(2):135-40.
44. Pardini AX, Peralta RH, Vaz AJ, Machado Ldos R, Peralta JM. Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Jan;9(1):190-3.
45. Peralta RH, Vaz AJ, Pardini A, Macedo HW, Machado LR, De Simone SG, Peralta JM. Evaluation of an antigen from *Taenia crassiceps* cysticercus for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Acta Trop.* 2002. 83(2):159-68.
46. Proano-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, Garcia-Jeronimo RC, Correa D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: double-blind comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and electroimmunotransfer blot assay. *J Clin Microbiol.* 2002 Jun;40(6):2115-2118.
47. Ramos K, Montoya M, Padilla A, Govenzensky M, Sciutto E, Sotelo J y Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. 1992. *Arch, Neurol.* 49:633-636.
48. Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A. Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes. *J Clin Microbiol.* 2000 Dec;38(12):4439-44.
49. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA. In "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (J.Sambrook, E.F.Fritsch and T.Maniatis, Eds), pp.4.29-4.30.Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

50. Sanchez AL, Lindback J, Schantz PM, Sone M, Sakai H, Medina MT, Ljungstrom I. A population-based, case-control study of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999 Apr;93(3):247-58.
51. Sciutto E, Hernández M, Garcia G, de Aluja AS, Villalobos AN, Rodarte LF, Parkhouse M, Harrison L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet Parasitol*. 1998 Aug 14;78(3):185-94.
52. Sciutto, E, Aluja, A, Fragoso, G, Rodarte, LF, Hernández, M, Villalobos, MN, Padilla, A, Keilbach, N, Baca, M, Govezensky, T, Díaz, S, Larralde, C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol*. 1995; 60:53-67.
53. Sciutto, E, Fragoso, G, Fleury, A, Lacleste, JP, Sotelo, J, Aluja, A, Vargas, L, Larralde, C. *Taenia solium* disease of humans and pigs: an ancient parasitic disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* 2000; 2:1875-1890.
54. Sciutto, E, Fragoso, G, Trueba, L, Lemus, D, Montoya, RM, Díaz, ML, Govezensky, T, Lomelí, C, Tapia, G, Larralde, C. Cysticercosis vaccine: cross-protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol*. 1990; 12:687-696.
55. Secretaría de Salud, Boletín semanal de epidemiología, 1994-1996, México DF, Dirección General de epidemiología, 1996.
56. Shiguekawa KY, Mineo JR, de Moura LP, Costa-Cruz JM. ELISA and western blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. *Trop Med Int Health*. 2000 Jun;5(6):443-9.
57. Smyth JD. Introduction to animal parasitology. 1994. 3rd ed. Cambridge University Press, Gran Bretaña, 277-367.
58. Sotelo J., Del Brutto O., Roman G., in: Remington J., Swartz M. (Eds.), *Cysticercosis: Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, Blackwell Science, 1996; 240-259.

59. Tam JP, Zavala F. Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J Immunol Methods* 1989; 124:53-61.
58. Tam JP. Recent advances in multiple antigen peptides. *J Immunol Methods* 1996; 196:17-32.
60. Tebourski F, Slim A, Elgaaied A. The significance of combining World Health Organization and Center for Disease Control criteria to resolve indeterminate human immunodeficiency virus type-1 Western blot results. 2004. *Diagn Microbiol Infect.* 48:59-61.
61. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun.* 2001; 69(3):1766-73.
62. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Garfias CK, Vazquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 1999; 67:2522-2530.
63. Tsang V.C., Brand, J.A., Boyer, A.E. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*), *J. Infect. Dis.* 1989; 59 50-59.
64. Valdez F, Hernández M, Govezensky T, Fragoso G, Sciutto E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 1994; 80:931-36.
65. Vester A. A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linneaus 1758 s. str. 1969. *Onderstepoort J Vet Res* 36:3-58.
66. White AC, Jr., Neurocysticercosis: Updates on Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Annu Rev Med* 2000; 51:187-206.

67. Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A, Larralde C. Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J Parasitol* 1982; 68:39-47.
68. Yang H, Chung J, Yun D, Kong Y, Ito A, >MA L, Liu Y, Lee S, Kang S, Cho S. Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. 1998. *Parasite Immunology*. 20:483-488.